

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ  
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)  
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS  
PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

**PREPUBERTAL SIÇAN TESTİSLERİNDE CİSPLATİN  
MARUZİYETİNİN NEDEN OLDUĞU SEMİNİFER  
TÜBÜL HASARI VE ERİŞKİN SPERM  
PARAMETRELERİ ÜZERİNE L-KARNİTİNİN  
KORUYUCU ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Özge YAMAN**

Referans no: 10043734

EDİRNE – 2015

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ  
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)  
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS  
PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

**PREPUBERTAL SIÇAN TESTİSLERİNDE CİSPLATİN  
MARUZİYETİNİN NEDEN OLDUĞU SEMİNİFER  
TÜBÜL HASARI VE ERİŞKİN SPERM  
PARAMETRELERİ ÜZERİNE L-KARNİTİNİN  
KORUYUCU ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Özge YAMAN**

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2014/87

Tez No :

EDİRNE – 2015

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Özge YAMAN tarafından tez başlığı "Prepubertal Sıçan Testislerinde Cisplatin Maruziyetinin Neden Olduğu Seminifer Tübül Hasarı ve Erişkin Sperm Parametreleri Üzerine L-Karnitinin Koruyucu Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 05/11/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Turan KARACA

ÜYE

Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

ÜYE

Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca beni yetiştiren, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, çalışmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın, Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR'a, araştırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Turan KARACA, Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ ve Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e, yüksek lisans eğitimin süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Trakya Üniversitesi Üremeye Yardımcı Teknikler Merkezi ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca projenin gerçekleştirilmesinde sağladığı katkılardan dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
<b>TESTİSİN YAPISI</b> .....	<b>4</b>
<b>SIÇAN TESTİS DOKUSUNDAKİ YAPISAL DEĞİŞİMLER</b> .....	<b>6</b>
<b>CİSPLATİN</b> .....	<b>9</b>
<b>L-KARNİTİN</b> .....	<b>12</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>16</b>
<b>BULGULAR</b> .....	<b>21</b>
<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>47</b>
<b>SONUÇLAR</b> .....	<b>56</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>58</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>60</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>62</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>71</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>73</b>
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ATP</b>	: Adenozintrifosfat
<b>ATPaz</b>	: Adenozintrifosfataz
<b>CAT</b>	: Catalase
<b>DAB</b>	: 3-3' - Diaminobenzidine
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>dUTP</b>	: Deoksiuridine Triphosphate
<b>FSH</b>	: Folikül Stimülan Hormon
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin-Salgılatıcı Hormon
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>H+E</b>	: Hematoksilen+Eozin
<b>HMG1</b>	: Histon Olmayan Kromozomal Grup 1
<b>HMG2</b>	: Histon Olmayan Kromozomal Grup 2
<b>i.p</b>	: İntraperitoneal
<b>KoA</b>	: Koenzim A
<b>LH</b>	: Lüteinizan Hormon
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>PAS+HL</b>	: Periodik Asit Schiff+Hemalen
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	: Reactive Oxygen Species
<b>SOD</b>	: Süperoksid Dismutaz
<b>TBP</b>	: TATA Bağlanma Proteini
<b>TdT</b>	: Deoksinukleotidyl Transferase

**TNF- $\alpha$**  : Tümör Nekroz Faktör  $\alpha$   
**TUNEL** : TdT-Mediated-dUTP Nick End Labeling  
 **$\beta$**  : Beta

## GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; önemi günden güne giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunudur. Normal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile ortaya çıkan kanser, kalp hastalıklarından sonra ölüme yol açan nedenler arasında ikinci sırayı almaktadır (1). Kanser; çeşidine ve gelişim evresine bağlı olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin tek başına ya da birlikte uygulamalarıyla tedavi edilmektedir (2). Antineoplastik kemoterapi; tümör hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını durdurarak tamamen yok edebilen, bununla birlikte normal hücre ile tümör hücresi arasındaki yapısal benzerlikler nedeniyle normal hücrelere de zarar verebilen bir tedavi şeklidir (1).

Son yıllarda kanserli hasta sayısındaki artışa rağmen, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesiyle sağ kalım oranları da her geçen gün artmaktadır. Kemoterapötik ajanların kullanımı, ölüm oranını azaltmanın yanı sıra uzun dönem sağ kalımlarda; büyüme, kardiovasküler problemler ile ikincil malign tümörler gibi yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen, çok ciddi endikasyonları ortaya çıkarmaktadır. Kemoterapötik ilaçların over ve testisler üzerindeki etkileri nedeniyle, tedavi sonrasında fertilitenin de olumsuz yönde etkilendiği gösterilmiştir (3).

Cisplatin, çeşitli malign tümörlere karşı yetişkin, genç ve çocuklarda yaygın şekilde kullanılan kemoterapötik bir ajandır (4). İlacın sağlıklı dokular üzerindeki sitotoksik etkisi; reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, mitokondriyal hasar ve apoptozis aracılığı ile olmaktadır (5). Bununla birlikte nefrotoksisite, nöropati, ototoksisite ve gonadotoksisite cisplatinin doz sınırlayıcı yan etkileridir (6). Cisplatine bağlı testiküler hasarda direkt olarak spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri etkilenmekte, Leydig hücrelerinde ise fonksiyon bozukluğu görülmektedir (7).



Cisplatinin, DNA sentezinin inhibisyonu ile spermatogenezin farklı aşamalarında, germ hücre apoptozisini indüklemek ve Leydig hücre hasarı aracılığı ile testosteron salınımını azaltmak suretiyle, spermatogenez etkilediği ve böylece sperm morfolojisi ve motilitesinde bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir (8,9). İlacın, spermatogenez üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, cisplatin kemoterapisinin çocuk veya genç hastaların erişkin dönemdeki üreme kapasiteleri ve semen kaliteleri üzerinde potansiyel bir risk oluşturduğu görülmektedir (10). İnfertilite, kemoterapötik ilaçların hem erkek hem de dişilerde meydana getirdiği en önemli yan etkilerden biridir. Cinsel isteksizlik, oligospermi, azospermi, astenospermi ve teratospermi ile birlikte testiküler yapı, spermatogenez ve steroidogenezdeki bozukluklar, gonadotropin düzeylerindeki değişiklikler, sperm DNA ve kromozomlarındaki hasarlar hem kanserli erkekler (11), hem de deney hayvanlarında (5,8,9) bildirilen kemoterapi kaynaklı yan etkilerdir. Kemoterapötiklere bağlı infertilitenin azaltılması amacıyla, tedavi öncesi sperm ve germ hücrelerinin dondurularak saklanması ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi birtakım yöntemler kullanılmaktadır (10). Bu şekilde erişkin hastaların gebelik şansı artırılabilirse de, bu yöntemler prepubertal hastalar için uygun değildir. Bu nedenle gonadotoksik tedavilerden sonra, spermatogenezin iyileştirilmesini temel alan koruyucu alternatif yöntemler geliştirilmelidir.

Hücrelerde doğal olarak bulunan karnitin, çeşitli patofizyolojik durumlarda güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra, özellikle son yıllarda önemli bir antiapoptotik ajan olduğu gösterilmiştir (12). Antiapoptotik etkisini, oksidatif stres aracılı mitokondriyal hasarı önleyerek, apoptozisi inhibe etmek suretiyle meydana getirmektedir (13). Testiküler dokularda özellikle epididimde yüksek konsantrasyonda bulunan L-karnitin, sperm respirasyonu ve motilitesi için enerji üretiminde kullanılan mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu artırır, sperm olgunlaşması ve direkt olarak Sertoli hücre fizyolojisi üzerine etki ederek, germ hücre gelişimini destekler (14). Bu özellikleri nedeniyle, çeşitli çalışmalarda, erkek infertilitesinin tedavisinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (15-17).

Son yıllarda henüz çocuk sahibi olmayan genç-erişkinlerde, uygulanan sitotoksik kemoterapilerle uzun süreli remisyon ve kanserden tamamen kurtulma oranları oldukça artmıştır. Dolayısı ile bu hastalarda yan etki olarak ortaya çıkan fertilité potansiyelindeki azalma ve cinsel fonksiyon bozuklukları daha önemli hale gelmiştir. Hayatta kalan kanserli hastalar için infertilite, temel bir sorundur. Bu nedenle, prepubertal dönemde cisplatin kemoterapisi uygulanan hastaların tedaviden sonra yaşam kalitelerini arttırmak amacıyla, cisplatin gonadotoksitesini önlemeye yönelik araştırmaların yapılması oldukça önemlidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, prepubertal veya erişkin dönemde cisplatin

maruziyetinin, testis dokusuna olan etkileri çalışılmış (5,18) ancak, prepubertal cisplatin maruziyetinin, erişkin dönemdeki testis dokusu ve sperm parametrelerinde meydana getirdiği değişikliklere ve önleyici tedavilere değinilmemiştir (5,18). Bu fikirden yola çıkararak, güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar olduğu bilinen L-karnitinin, prepubertal dönemde cisplatin maruziyeti sonucunda oluşan testiküler hasar ve buna bağlı infertilitenin azaltılmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Bu amaçla çalışmamızda, prepubertal dönemde cisplatine maruz kalan sıçanların testisleri üzerinde L-karnitinin muhtemel koruyucu etkilerini ve bu etkinin erişkin dönemdeki sperm kalitesi üzerindeki yansımalarını araştırarak, bu ajanın erkek infertilitesindeki koruyucu rolünü değerlendirmeyi planladık.

## GENEL BİLGİLER

### TESTİSİN YAPISI

Testisler karın boşluğunun dış kısmında skrotum içinde yer alır. Bu yerleşim şekilleri normal bir spermatogenez için gerekli olan ısıda (34-35°C) olmalarını sağlar (19,20). Testisler dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza ile çevrilidir. Olgun testisin posteriyor yüzü epididimis ile ilişkilidir. Testis ve epididimis skrotal kese içerisinde vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır. Testis, rete testisin yer aldığı bölgede kalınlaşan ve mediastinumu oluşturan tunika albuginea ile çevrilidir. Mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar ile doku, 250-300 lopçuğa bölünür. Her bir lopçuk 1-4 adet seminifer tübül içerir. Seminifer tübüller yaklaşık 150 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) çapta ve 80 cm uzunlukta olup iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar gibi seminifer epitelin ürünlerini toplayan kanallar ağıdır. Seminifer tübüller, Sertoli hücreleri ve spermatogonik hücreleri içeren seminifer epitel ile döşeli, merkezi bir lümeden oluşur (19,20).

Sertoli hücreleri, puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücre türüdür. Puberteden sonra hücrelerin %10'unu oluşturan ve tübüller arası boşluk ile seminifer tübül lümeni arasında köprü fonksiyonu gören hücrelerdir. Gelişmekte olan spermatogonik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran apikal ve lateral uzantılara sahiptirler. Bazolateral bölgelerinde, komşu Sertoli hücreleri ile okludens bağlantıları oluştururlar. Bazolateral okludens bağlantıları seminifer epiteli, bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır ve gelişmekte olan spermatozoid ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerini oluşturur (19,20).

Seminifer epitelde yer alan diğer hücreler, farklı olgunlaşma aşamasındaki spermatogenik hücrelerdir. Bazal membrandan lümene doğru üst üste dizilmiş şekilde sıralanan bu hücreler sırasıyla spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermler şeklinde bulunurlar. Spermatogonyumlar, spermatogonyal kök hücrelerden farklılaşan ve puberteden başlayarak mitotik hücre bölünmeleri geçiren hücrelerdir. Tip A spermatogonyum ve Tip B spermatogonyum olmak üzere iki temel morfolojik spermatogonyal hücre tipi gözlenebilir. Bu hücreler mitoz bölünmelerle yeni spermatogonyumları ve primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler 1. mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri, sekonder spermatositler de 2. mayoz bölünme ile haploid hücreler olan spermatidleri oluştururlar. Bu haploid hücrelerin olgun bir sperm şekline dönüşme süreci spermiyogenezdir. Bu süreçte kamçı ve akrozom gelişir, nükleus son halini alır ve böylece olgun bir sperm meydana gelir. İnsanlarda bu süreç yaklaşık 74 gün sürer (19,21).

Seminifer tübülleri birbirinden ayıran interstisyel dokuda, kollajen lifler, kan ve lenf damarları, sinir lifleri, fibroblast, makrofaj, mast hücreleri, farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve Leydig hücreleri bulunur. Kan kapillerlerine yakın yerleşimli Leydig hücrelerinin temel fonksiyonu testosteron salgılamaktır. Bu fonksiyonları, ön hipofizinin iki hormonu ile ayarlanır: lüteinizan hormon (LH), testosteron üretimini uyarırken, prolaktin, LH reseptör ekspresyonunu başlatır. Testosteron, spermatogenezi, erkek libidosunu ve erkek aksesuar bezlerinin fonksiyonlarını düzenler. Ayrıca testosteron; fetusta, gonadların normal gelişimi, ergenlik döneminde; yardımcı genital bezlerin salgılama fonksiyonlarının başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi, yetişkinlerde ise, genital boşaltım kanallarının ve yardımcı genital bezlerin fonksiyonlarının sürdürülmesi ve spermatogenezin devamlılığı için gereklidir (19,20).

### **Spermin Yapısı**

Spermatogenez sürecinin sonunda oluşan olgun sperm hücresi, yaklaşık 60 µm uzunluğunda olup, baş ve kuyruk olmak üzere iki parçadan oluşur. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlıdır. Spermin baş ve kuyruk kısımları bir plazma membranı ile sarılıdır (20).

Plazmalemma ile çevrili baş kısmı, 4-5 µm uzunluğunda, 2,5-3,5 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında olup, akrozom ile nükleusu içerir. Akrozom, nükleusun ön yarısını örter ve hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler, oositi saran korona radyata ve zona pellusidadan spermin geçişini kolaylaştırmak için fertilizasyon anında salınır (20).

Bağlantı parçasında yer alan distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar. Kuyruk; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu kısım olan orta parça, 9+2 mikrotübüler yapısındaki aksonem ile yoğun dış fibrilleri içerir. Kuyruğun en uzun parçası olan esas parça, yedi dış yoğun fibril ile sarılı bir aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşurken, son parça sadece aksonemi içerir (20).

### **SIÇAN TESTİS DOKUSUNDAKİ YAPISAL DEĞİŞİMLER**

Sıçanlarda, seminifer tübüllerin gelişimi gonadın anterior bölgesinde ve 13. günde, germ hücrelerinin ve Sertoli hücre öncüllerinin ortaya çıkışı ile başlar. Bunu bazal membranın, spermatik kordonlar etrafında gelişimi takip eder. Daha sonra 15. gün civarında mezenkimal hücrelerden Leydig hücrelerinin farklılaşmasıyla fetal rat testisleri testosteron üretmeye başlar (22-24). Fetal Leydig hücrelerinin doğumdan sonraki 1. ve 2. hafta boyunca azaldığı, 2. haftadan sonra ya dejenere olarak yetişkin tip Leydig hücrelerine dönüştüğü (25) ya da postnatal dönem boyunca özel bir grup hücre şeklinde kaldığı düşünülmektedir (26).

Sıçanlarda, prepuberteden puberteye geçişle birlikte testis yapısında önemli değişikliklerin görüldüğü bildirilmiş ve sıçanlarda testis gelişiminde üç ayrı evre incelenmiştir (27):

1. 0-37 günlük dönem; prepubertal dönem,
2. 42-75 günlük dönem; pubertal dönem,
3. 90-365 günlük dönem; erişkin dönem.

Yapılan çalışmalarda, sıçan testisinde tunika albugineanın prepubertede kollajen liflerden fakir, gevşek bağ dokudan zengin bir yapıda olduğu, puberte ve erişkin döneme doğru giderek kalınlaşarak fibröz bir yapı kazandığı bildirilmektedir (28).

Tübüller arası interstisyel alandaki büyük poligonal şekilli Leydig hücrelerinin, eozinofilik sitoplazmaya ve gevşek kromatinli bir nükleusa sahip olduğu gözlenmiştir. Sıçanlarda Leydig hücre gelişiminin postnatal 10. günde başladığı ve bu süreçte 5 hücre tipinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (29):

1. Mezenkimal prekürsör hücreler,
2. Progenitör hücreler,
3. Yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri,
4. Genç erişkin Leydig hücreleri,
5. Olgun erişkin Leydig hücreleri.

Bu aşamalardan ilki olan mezenkimal prekürsör hücrelerin progenitör hücrelere farklılaşması LH'dan bağımsız, diğer tüm aşamalar ise LH bağımlıdır. Gelişim esnasında hücrenin boyutu ile birlikte, steroidogenez için gerekli organelleri geliştiğinden testosteron salgılama kapasitesi artar. Ayrıca hücrenin sahip olduğu LH reseptör sayısındaki artışa paralel olarak, hücrenin bu hormona karşı duyarlılığı da artmaktadır (29). Leydig hücrelerinin LH ve FSH'nin kontrolü altında gerçekleşen postnatal gelişimi, üç ayrı dönemde incelenir (30);

1. Mezenkimal hücrelerin progenitör hücrelere dönüştüğü (14-21. günler) dönem,
2. Hücrelerin steroidogenik organel yapısı ve enzim aktivitesine sahip genç Leydig hücrelerine dönüştüğü (22-35. gün) dönem,
3. Erişkin Leydig hücrelerinin oluştuğu (36-90. gün) dönem.

İlk steroid sentezi yapan genç Leydig hücrelerinin ürettiği testosteronun çoğunun metabolize olduğu, aktif hormon üretiminin ise erişkin Leydig hücreleri tarafından sağlandığı bilinmektedir (28,30).

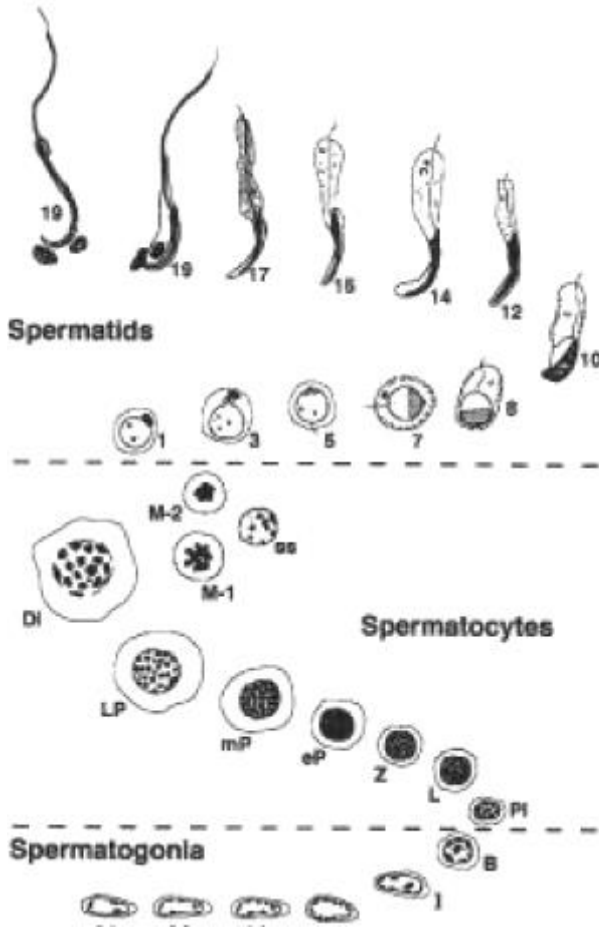
Pubertal ve erişkin döneme kıyasla prepubertal dönemde, seminifer tübül çapının dar, boyunun kısa, duvar kalınlığının ise ince olduğu gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin bu yapısı, prepubertal dönemde spermatogenezin (spermatidlerin spermiuma dönüşme süreci) henüz başlamamasıyla ilişkilendirilmiştir. Prepuberteden puberteye gidildikçe tübüllerin daha kalın, uzun ve heterojen bir görünüm aldığı, tübül duvarında spermatogenezin seriye ait hücre sayısının ise arttığı bildirilmiştir (28).

Sıçanlarda spermiyogenezin başlangıcına ilişkin veriler tartışmalıdır. Sıçanlarda farklı gelişim evrelerine ait testis dokularının histolojik olarak incelendiği bir çalışmada, prepubertal (10 günlük) dönemde, seminifer tübüllerde spermatositlerin varlığına rağmen şekillenmekte olan spermiumlara rastlanmamıştır (28). Benzer olarak, Hansson ve ark.'da (31) prepubertal döneme (3-37 günlük) ait sıçan testisinde spermatogenezin hücrelerin arttığını ancak spermiumların henüz şekillenmediğini belirtmişlerdir. Risbridger ve ark. (32) 26 günlük sıçan testislerinde seminifer tübül duvarında erken spermatidlerin farklı şekillerinin varlığı ile spermiyogenezin başladığını göstermişlerdir. Bununla birlikte çeşitli çalışmalar spermiyogenezin başlangıcındaki farklılıkları, sıçan testislerinde erken spermatidlerin ilk olarak 25. günde (33) ve ya 27. günde (34) tespit edilmesiyle ortaya koymuştur.

Sıçanlarda testisin postnatal gelişimi üzerine yapılan bir çalışmada (27), 30 günlük prepubertal sıçanların seminifer tübüllerinde, bazal membran üzerine oturan Tip A ve Tip B spermatogonyumların yanı sıra, primer spermatositlerin farklı mitotik figürlerine rastlanmıştır. Sekonder spermatosit döneminin kısa sürmesinden dolayı tespit edilemediği,

lümene doğru spermatogenez sürecindeki spermatidlerin genç veya erken evrelerinin görüldüğü bildirilmiştir. 37. günde ise, erken spermatidlerin geç spermatidlere dönüştüğü görülmüştür. Puberteye geçiş dönemi olan 42. günde, bağ dokusu hücrelerinin olgun şekillerini aldığı, kompakt yapıda bir tunika albuginea olduğu, normal çap ve tübül yapısına ulaşan seminifer tübül lümeninde ise, ilk kez spermiyumların görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca bu aşamada, Leydig hücrelerinin de olgun şekillerini alarak heterokromatin yapıdaki nükleusların ökromatin yapıya dönüştüğü belirlenmiştir. Gelişimin 45. gününde, tübül lümeninde sperm sayısının 42. güne oranla arttığı, fakat yeterli miktara ulaşmadığı bildirilmiştir. 60 günlük sıçan testislerinde, tübül lümeninin, spermatidlerle birlikte, baş kısmı çengel şeklinde olan ve uzun bir kuyruk yapısına sahip olgun spermle dolu olduğu gözlenmiştir. 90. günde seminifer tübüllerin, lümene yakın bölümlerinde, farklı aşamadaki spermatidlerin bir kısmının akrozomal kep, bir kısmının ise maturasyon fazında olduğu ve spermle birlikte tübül lümenini doldurduğu gözlenmiştir. Gelişimin 365. gününde incelenen testis dokusunda ise, spermatogenezin yavaşladığı, seminifer tübül yapısının bozularak incelendiği ve buna bağlı olarak, lümen içerisinde sperm sayısının azaldığı bildirilmiştir (27).

Sıçanlarda spermatogenez süresinin yaklaşık 49-51 gün, spermilerin maturasyon sürecinin ise 14 gün sürdüğü, bu periyotta germ hücrelerinin farklılaşarak olgun hale geldikleri bildirilmiştir (35). Sıçanlarda germ hücre gelişimi proliferasyon, mayoz ve diferansiasyon fazı olmak üzere 3 fazda gerçekleşir. Proliferasyon fazı, Tip A spermatogonyumlardan Tip B spermatogonyumların meydana geldiği tekrarlanan spermatogonyal bölünmelerin gerçekleştiği fazdır. En geniş faz olan mayoz fazı, Tip B spermatogonyumların oluşmasıyla başlar ve bu spermatogonyumlardan preleptoten spermatositlerin oluşmasıyla devam eder. Preleptoten spermatositlerin bölünmesiyle sırasıyla leptoten, zigoten, pakiten, diploten fazları gerçekleşir. Diploten fazından sonra, birinci mayoz bölünme sonucunda sekonder spermatositler oluşur. İkinci mayoz sonunda ise haploid yapıda spermatidler meydana gelir. Son faz olan diferansiasyon fazında ise spermatidler önce erken (yuvarlak) spermatidlere daha sonra geç (uzamış) spermatidlere ve son olarak da spermle dönüşürler (Şekil 1) (36). Sıçanlarda spermiler baş ve kuyruk olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Bu iki kısım arasındaki bağlantı orta kısım ile sağlanır. Baş kısmı yaklaşık 2,5 µm uzunluğunda ve kanca görünümünde olup yoğun bir nükleus ve akrozom olarak adlandırılan daha az yoğunlukta bir uç kısımdan oluşur. Orta kısım sentrioller ve mitonkondri içeren sarmal bir yapıdır. Kuyruk kısmı sperm hareketini sağlayan, uzun aksiyal filamentler içerir (37).



Şekil 1. Sıçanlarda germ hücre gelişimi (36)

## CISPLATİN

Cisplatin, 1960'lı yıllarda elektromanyetik radyasyon uygulamasının, bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesi üzerine etkisini araştıran Barnett Rosenberg tarafından, tesadüfen keşfedilmiştir. 1968 yılında sarkomalı bir fare üzerinde yapılan çalışmada, intraperitoneal cisplatin uygulanması sonrasında tümör boyutunda anlamlı bir küçülme gözlenmiştir. Kanser hastalarında ilk kez 1971 yılında kullanılmaya başlanılan cisplatin, 1978 yılında Amerika Gıda ve İlaç kurumundan onay almış ve günümüzde kanser tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir antineoplastik ajandır (38). Cisplatin, baş-boyun, akciğer, testis, ovaryum ve meme kanseri gibi erişkin dönem tümörlerinin yanı sıra, Wilms tümörü, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, nöroblastom, osteosarkom gibi çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (38,39).



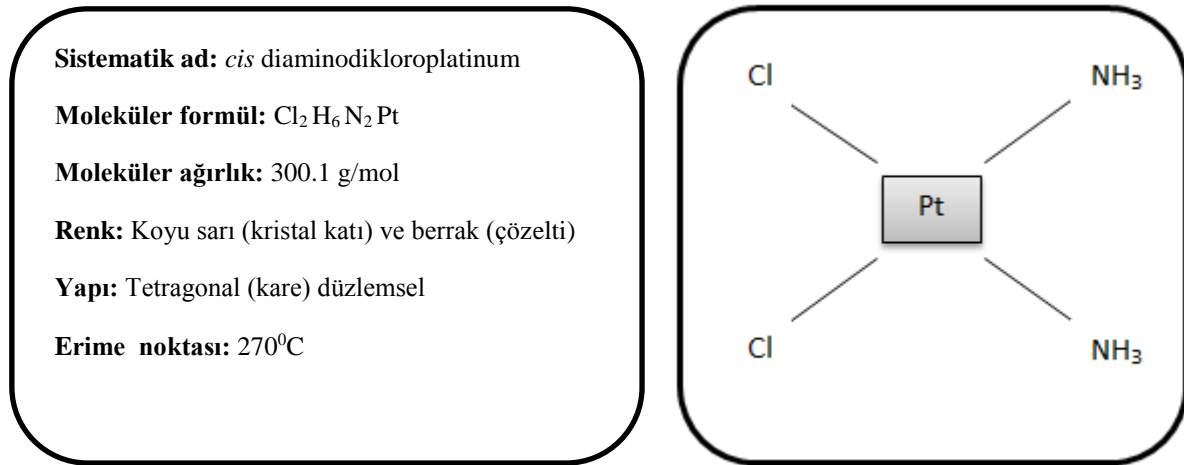
## Cisplatinin Moleküler Yapısı ve Özellikleri

Cisplatin, “*cis*-diaminodikloroplatinum (II), *cis*-platinum (II), *cis*-DDP” açık formülüne sahip, ortadaki platin atomuna bağlı klor ve amonyum atomları ile çevrili inorganik bir platin kompleksidir (Şekil 2). Bileşiğin *cis* ve *trans* olmak üzere iki izomeri vardır. *Cis* formu sitotoksiktir ve suda çözünme özelliğine sahiptir (40).

Cisplatin, barsak ve mide kanallarından emilemediği için, intravenöz veya intraperitoneal (i.p) olarak uygulanır. Karaciğer, böbrek ve prostatta yüksek oranda bulunur. Anne sütü ve plevral sıvılara geçebilmesinin yanı sıra, plasentayı da geçme özelliğine sahiptir. Enzimatik olmayan yollarla, hücre içerisinde reaktif monoquo-diammine-platin veya diaquo-diammine-platin türlerine hidrolize olarak aktif metabolitlere dönüştürülür. İlacın %27-43 kadarı, uygulandıktan sonra ilk 5 gün içerisinde idrar ile birlikte vücuttan atılır. Geri kalan kısmı, daha uzun süre vücutta etkisini gösterir. Yaklaşık 180 güne kadar dokularda ilaç saptanabilir (41).

Cisplatinin hücre içine alınma ve hücreden atılma mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olup, ilk zamanlarda pasif difüzyon yoluyla hücre içine alındığı düşünülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise, cisplatinin, hücre içine aktif olarak alınmasında, bakır transport proteininin (copper transporter 1) etkili olduğunu göstermektedir (40).

İlacın aktivitesi, ortamda bulunan klor iyonu konsantrasyonundan etkilenir. Kanda ve ekstrasellüler sıvılarda klor iyonu konsantrasyonu yaklaşık 100 mM'dır ve cisplatin bu ortamda daha az etkindir. Hücre içi klor konsantrasyonundaki ani düşüşler cisplatin aktivitesini artırır (42).



Şekil 2. Cisplatinin kimyasal özellikleri ve moleküler yapısı

### **Cisplatinin Etki Mekanizması**

Cisplatin, ister istirahat evresinde, ister bölünme evresinde olsun hücre üzerinde her zaman etkilidir (1). Sitotoksik özelliğini, nükleer DNA'ya bağlanıp, DNA transkripsiyon ve replikasyonunu bozmak ve bir takım sinyal yollarını aktive etmek suretiyle sağlar. Mitokondriyonları hasarlayarak hücre döngüsünü duraklatır, ATPaz aktivitesini engeller, hücresel taşıma sistemlerini değiştirerek apoptoz, nekroz, inflamasyon ve hücre ölümüne sebep olur (40). Hücreye giren tüm platinleyici ajanlar, ya klor ya da oksalat iyonlarını kaybederek su molekülü kazanırlar ve böylece hücre içindeki DNA, RNA, proteinler gibi nükleofilik moleküllerle etkileşebilme özelliğine sahip olurlar. İlaç DNA'da N7 pozisyonundaki pürin bazlarıyla reaksiyona girmek suretiyle tekli bağ, DNA-protein bağı, zincirler arası ve zincir içi kovalent çapraz bağlar oluşturur. DNA ile kovalent bağların oluşması sonucu, DNA'nın yapısı bozulur ve sarmalın bozulan yerlerine hasarı farkedilen hücre içi proteinler bağlanır. Bu proteinler arasında en önemlileri; yanlış eşleşme onarım (mismatch repair) kompleksi yapısında olan hMSH2 ve hMutS $\alpha$  proteinleri, histon olmayan kromozomal grup 1 ve 2 (nonhistone chromosomal group (HMG1ve HMG2)) proteinleri, transkripsiyon faktörü RNA polimeraz 1 ve TATA bağlanma protein (TBP) dir. DNA hasarını fark eden ve sarmal üzerine bağlanan proteinler, birçok sinyal ileti yolağını aktive etmek sureti ile hücre hasarı ve ölümüne yol açmaktadır (43).

Cisplatin'in hücre DNA'sında meydana getirdiği sitotoksik etkilerin yanı sıra, mitokondriyonların işlevini bozarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine ve tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )'nın artmış ekspresyona neden olarak, hücrede inflamasyonu ve apoptozu tetiklediği bilinmektedir (40).

Cisplatin sitotoksitesinde, oksidatif stres hasarının önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır. Oksidatif strese neden olan ROS; mitokondriyonlar, ksantin-ksantin oksidaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) tarafından üretilmektedir. Cisplatinin etkisi ile tüm bu yollarca üretilen ROS, proteinler, lipidler ve DNA gibi önemli biyolojik moleküllere zarar verir. İlaç aynı zamanda glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi aktif antioksidan enzimlerini inhibe ederek antioksidan defans sistemlerini hasarlar. Ortaya çıkan serbest radikaller, hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna ve proteinlerin denatürasyonuna yol açarak enzimatik inaktivasyona ve mitokondriyal disfonksiyona sebep olur (44). Sonuç olarak serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidasyonun etkisiyle mitokondriyal membranların permeabilitesi değişir ve sitokrom C mitokondriyon membranlarından ayrılır. Mitokondriyal

hasara cevaben sitosole salınan sitokrom C, kaspaz-9'un aktivasyonu aracılığı ile kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozis aracılı hücre ölümüne neden olur (45).

Cisplatinin antineoplastik etki mekanizmaları, aynı zamanda normal dokular üzerindeki toksisitesinde temelini oluşturmaktadır. Cisplatinin en önemli doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisite olmakla beraber ototoksisite, gonadotoksisite, periferik nöropati ve miyelosupresyon önemli yan etkileri arasındadır (6). Bu etkileri önlemek için ilacın hızlı enjeksiyonu yerine uzun süreli infüzyonu tercih edilir. Cisplatine bağlı olarak gelişen toksisiteyi azaltmada kullanılan bir diğer yöntem ise ilacın verilmesi sırasında ve sonrasında salın (%0,9 NaCl) ile hidrasyon yapılmasıdır. Bu uygulama ile cisplatinin vücuttan atılımı hızlandırılır ayrıca içerdiği yüksek klor iyonu sayesinde, salın klor iyonlarının cisplatinden ayrılmasını önleyerek cisplatinin aktif türevlerinin oluşumunu engeller. Toksisitenin bu şekilde durdurulmadığı durumlarda doz azaltılır veya ilaç kesilir (41). İlacın kullanımının şart olduğu durumlarda ise ilaç toksisiteyi önleyici bir ajan ile birlikte verilir. E ve C vitaminleri, L-karnitin, melatonin gibi birçok antioksidanın, cisplatin toksisitesini azalttığı kanıtlanmıştır (5,46-48).

### **L-KARNİTİN**

L-karnitin, farklı dokularda fizyolojik olarak sentezlenen, suda iyi çözünen, yapı olarak aminoaside benzeyen vitamin benzeri bir moleküldür. Sitoplazmadan mitokondri matriksine transfer edilecek uzun zincirli yağ asitlerinin iç mitokondriyon zarından geçişinde görev alır (49).

İlk olarak 1905 yılında Gulewitsch ve Krimberg adlı Rus araştırmacılar tarafından kas dokudan izole edilmiş olup Latince et anlamına gelen "carnis" kelimesinden esinlenilerek "karnitin" adı verilmiştir. 1952 yılında Carter ve ark. tarafından Tenebrio molitor adlı kurtçukların büyümesi için gerekli bir molekül olduğu belirlenmiş, vitamin benzeri bir etki göstermesinden dolayı vitamin BT adı verilmiştir (49).

### **L-Karnitinin Moleküler Özellikler**

L-karnitin (3-hidroksi-4-N-trimetil azonumil bütanoat), bir asimetric karbon atomu içermesi nedeniyle D ve L formlarına sahiptir (Şekil 3). Ancak dokularda metabolik olarak aktif olan, L formu sentez edilir. Enerji gereksinimlerini karşılamak için özellikle yağ asitlerini kullanan dokular açısından karnitin, esansiyel bir metabolittir (50). Büyük ölçüde diyetle alınır ve iskelet kası içinde depolanır. Hayvansal besinler bitkisel besinlere oranla daha fazla L-karnitin içermekte olup, kırmızı et ve süt ürünleri başlıca karnitin kaynaklarıdır (51).



L-karnitin serbest uzun zincirli yağ asitlerinin,  $\beta$  oksidasyona girebilmesi için mitokondriyon matriksine geçişini sağlar.  $\beta$  oksidasyon sonucu oluşan Asetil KoA, trikarboksilik asit döngüsüne girer ve bu döngüde fazla miktarda oksijen tüketilip, ATP üretilir. Bunun sonucunda suya indirgenen oksijenin konsantrasyonu azalır ve böylece ROS oluşumu azalmış olur (53,60).

Hücre içi oksidatif hasar, lipid peroksidasyonu ve fosfolipid yıkımına neden olurken aynı zamanda serbest yağ asidi miktarını da arttırır. Serbest uzun zincirli yağ asitleri hidrofobik anyonlardır ve doku düzeyinde bu anyonların artışı, hücre zarı yapı ve fonksiyonlarında değişime sebep olur (61). L- karnitinin; hücre membran geçirgenliğindeki değişiklikleri, mitokondriyal disfonksiyonu, lipid peroksidasyonunu ve apoptozu engellediği gösterilmiştir (62). Bunun yanında L-karnitin, membran oluşumu ve bütünlüğü için gerekli olan fosfolipidlerin sentezini de arttırmaktadır. Fosfolipidlerin reaçilasyonu sayesinde membran onarımında önemli fonksiyona sahiptir (63).

### **L-Karnitin ve İnfertilite**

Karnitinlerin erkek üreme sistemi üzerine olan etkileri oldukça iyi bilinmekle birlikte, erkek infertilitesinin kontrolünü hangi mekanizmayla sağladığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. Karnitinler; spermatogenez, sperm motilitesi ve olgunlaşması için spermatozoa tarafından kullanılmak üzere hazır enerji kaynağı sağlayarak sperm metabolizması üzerinde etkin bir rol oynarlar (64,65).

L-karnitin, erkek üreme sisteminde en yüksek düzeyde epididimal sıvıda bulunmaktadır (66,67). Eritelden epididimal plazma içine salgılanan L-karnitin, daha sonra spermatozoa tarafından alınarak, kısmen asetil karnitin şeklinde esterifiye edilir. Spermatozoa içerisinde, serbest ve asetillenmiş L-karnitin şeklinde biriktirilir. Epididimal sıvı ve spermatozoada, L-karnitin konsantrasyonu, dolaşımdakinden (10-50  $\mu$ mol) 2000 kat daha fazla olup 2-100 mmol kadar yüksek oranda bulunmaktadır (68).

Yapılan çalışmalar, L-karnitinin epididimde spermatozoanın olgunlaşması ve fertilizasyon yeteneğinin gelişmesinde önemli rolü olduğunu göstermiştir. Spermin motilitesini kazanması ile L-karnitin artışının paralel olduğu bildirilmiştir (69). Testiste üretilen spermatozoa, epididimise girdiği zaman hareketsiz olup fertilizasyon yeteneğine sahip olmadığı, bu dönemde L-karnitin içeriği de düşüktür. Fertil hale gelebilmesi için epididimal lümen içerisinde postgonadal modifikasyona uğraması gereklidir. Epididimden geçişi sırasında, epididimal sıvıda L-karnitin artışına paralel olarak spermatozoanın kuyruk hareketi başlar (70).

İnfertil hastalarda seminal plazma total karnitin düzeyinin düşük bulunması ve karnitin tedavisiyle üreme fonksiyonlarında olumlu gelişmelerin saptanması bu konudaki hipotezleri destekler niteliktedir (71). L-karnitin uygulamaları sonrasında infertil erkeklerde sperm konsantrasyonu, hareket ve miktarında artış gözlenmiştir. Astenospermi gözlenen hastalarda karnitin takviyesinin sperm kalitesini ve sayısını arttırdığı bildirilmiştir (72).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmanın deneysel prosedürü için Trakya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra (27.06.2014 tarih ve TÜHDYEK-2014/21 protokol nolu onay belgesi) (Ek-1), Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilmiş ve standart laboratuvar koşullarında ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, benzer biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, 44 adet prepubertal (30 günlük) Wistar albino erkek sıçan kullanılarak, rastgele 3 grup oluşturuldu.

**I. Grup (n=12):** 0,2 ml, i.p, plasebo salin verilen, kontrol grubu.

**II. Grup (n=16):** Salin içinde hazırlanmış tek doz i.p. 5 mg/kg cisplatin (Sigma Aldrich, Almanya) verilen, cisplatin grubu.

**III. Grup (n=16):** Tek doz cisplatin (5 mg/kg, i.p.) uygulamasından 1 saat önce ve sonraki 3 gün boyunca her gün distile su içerisinde hazırlanmış i.p. 250 mg/kg L-karnitin (Sigma Aldrich, Almanya) verilen, cisplatin + L-karnitin grubu.

Deney gruplarının her biri cisplatin enjeksiyonundan 24 saat ve 60 gün sonra (denekler 90 günlük iken, erişkin) ksilazin-ketamin anestezisi altında sakrifiye edilmek üzere ikiye ayrıldı. Deneyin 24. saatinde sakrifiye edilen deneklerin testisleri çıkartılarak, ışık mikroskopik ve germ hücre apoptozisi değerlendirmeleri için rutin işlemlere tabi tutuldu. Deneyin 60. gününde sakrifiye edilen deneklerin kardiyak kan örnekleri alınarak, serum testosteron düzeyleri ölçüldü. Testisleri ışık mikroskopik değerlendirmeler ve morfometrik ölçümler için çıkartılarak, işlemlendirildi. Sperm parametre değerlendirmeleri için epididimisin kauda kısmından sperm örnekleri elde edildi. Deney başında ve sakrifikasyon zamanlarında tüm deneklerin testis ağırlıkları ile vücut ağırlıkları ölçüldü.

## **Işık Mikroskopik İncelemeler**

Işık mikroskopik incelemeler için; Bouin solüsyonunda fikse edilen testis doku örneklerinin, parafin inklüzyonu ile hazırlanan bloklarından 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere Hematoksilen+eozin (H+E) ve histokimyasal periodik asit Schiff+hemalen (PAS+HL) boyası uygulanarak morfometrik analizler ve histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Cisplatine maruziyet sonucunda, testiste meydana gelen histopatolojik değişikliklere karşı L-karnitin tedavisinin etkilerini göstermek amacıyla, prepubertal ve erişkin sıçan testisleri aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi;

- Ayrılma (spermatozoid hücre kitlesinin seminifer epitelden koparak ayrılması),
- Dökülme (germ hücre kümesinin seminifer epitelden ayrılarak dökülmesi),
- Vakuolizasyon (seminifer tübüller içinde vakuoller oluşması).

Bu değerlendirmeler, her hayvana ait H+E boyalı iki testis kesiti üzerinde, her kesitte rastgele seçilmiş 5 farklı alanda, 10 tübül olmak üzere toplam 100 tübül enine kesitinin, X400 büyütmede incelenmesiyle yapıldı. Her parametre için normal ve hasarlı tübüllerin yüzdesi hesaplandı (73).

Morfometrik değerlendirmeler için, deneyin 24. saatinde ve 60. gününde sakrifiye edilen deneklerin H+E boyalı testis kesitleri kullanıldı. Testis dokusunda seminifer tübül çapları ve iki tübül arasında kalan interstisyel alanlar, Görüntüleme Analiz Sistemi (Versiyon 2.11.5.1, Kameram, Argent, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bu ölçümler her hayvana ait iki testis kesiti üzerinde, her kesitte rastgele seçilmiş 5 farklı alanda, yuvarlak ya da yuvarlağa yakın 10 tübül olmak üzere toplam 100 tübül enine kesitinin X100 büyütmede değerlendirilmesiyle yapıldı (74). Aynı alanlarda 100 farklı interstisyel saha ölçüldü. Sonuçlar grup başına düşen ortalama değerler olarak ifade edildi.

## **İn Situ DNA Uç İşaretleme Metodu (TUNEL) Analizi**

TUNEL analizi, 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler üzerinde ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (S7101-KIT, Millipore) kullanılarak yapıldı. Deparafinize edilmiş doku kesitleri, proteinaz K (20 µg/ml) ile inkübe edilerek, kesitler endojen peroksidaz inhibisyonu için %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildikten sonra, oda ısısında 30 dakika dengeleme tamponunda inkübe edildi. Digoksinin işaretli dUTP kuyruğunun bağlanması için 37°C'de 1 saat terminal deoksinükleotidil (TdT) transferaz enzim solüsyonu ile inkübe edilip, ardından kesitler oda ısısında 10 dakika durdurma/yıkama tamponunda yıkandı. Oda ısısında 30 dakika antidigoksinin peroksidaz antikoru ile inkübe edilen



kesitler, peroksidaz substrat için 3,3-diaminobenzidine (DAB) kullanılarak boyandıktan sonra, hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.

TUNEL metodu, sadece apoptozise spesifik olmadığından ve nekrotik hücrelerin de TUNEL (+) reaksiyon gösterebildiği bilindiğinden (75,76), apoptozis değerlendirilmesi, koyu-kahverengi boyanmış TUNEL (+) reaksiyon veren hücreler göz önüne alınarak yapıldı. Zayıf reaksiyon gösterenler ise, nekrotik hücre olarak kabul edilerek elimine edildi (77). Değerlendirmeler 24. saatte sakrifiye edilen prepubertal sıçanlara ait TUNEL boyalı testis kesiti üzerinde, rastgele seçilmiş 100 seminifer tübül; 1-2 adet apoptotik hücre içeren, 3 ve daha fazla apoptotik hücre içeren ve hiç apoptotik hücre içermeyen tübüller olarak ayrı ayrı skorlandı. Ayrıca 100 seminifer tübüldeki toplam apoptotik hücre sayısı tespit edildi.

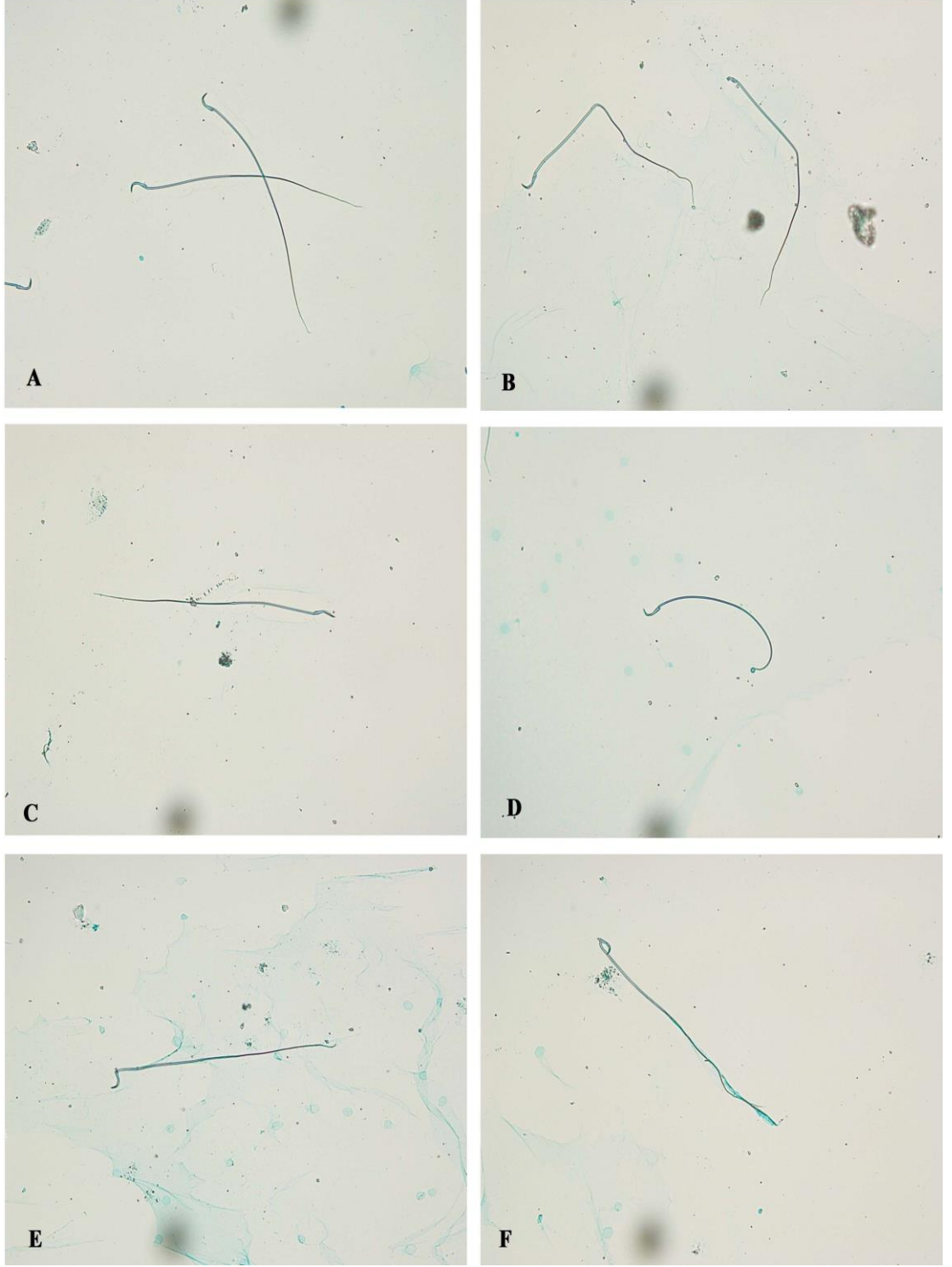
### **Sperm Değerlendirmesi**

Bu değerlendirmeler için, erişkin (90 günlük) her bir deneğin sağ epididimisi kullanıldı. Epididimisin kauda kısmı alt ve üst uçlarından kesilerek çıkartıldı. Bir petri kabı içerisine alınarak, penset yardımıyla tek yönde sıvazlanarak spermilerin dışarı çıkması sağlandı. Alınan 10 µl sperm örneği, içerisinde 0,5 ml G-IVF plus medyumunu (Vitrolife, Sweden) bulunan tüpler içerisine konuldu (78). Bu şekilde hazırlanan örneklerde sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfoloji ve vitalitesi değerlendirildi.

Sperm konsantrasyonu ve motilite değerlendirmeleri; makler çemberinin (Makler Counting Chamber, Sefi Medikal, Haifa, İsrail) lamı üzerine 10 µl örnek damlatılarak Olympus XL-31 marka ışık mikroskopuyla yapıldı. Makler çemberi üzerinde rastgele 10 kareye denk gelen spermiler, X200 büyütmede sayıldı. Elde edilen sonuç 1 milyon ile çarpılarak, mililitredeki sperm sayısı milyon cinsinden hesaplandı. Ayrıca sperm motilitesinin tayini için, 100 karedeki spermilerden hareketli ve hareketsiz olanlar ayrı ayrı sayılarak, yüzde oranları hesaplandı (78, 79).

Sperm morfoloji değerlendirilmesi için, elde edilen örneklerden lam üzerine 20 µl damlatıldı, yayılarak kurutuldu. Her denek için bu şekilde hazırlanan lamlar Spermac Stain boya seti (Box 152. Wellington, 7654, South Africa) ile boyandı. Boyama protokolü; spermilerin temiz bir lam üzerine yayılıp, kurutulmasının ardından, 5dk %10 luk formolde fiksasyon amacıyla bekletildikten sonra distile su ile yıkanarak elde edilen lamların sırasıyla stain A, B ve C ile birer dakika muamele edilmesi şeklinde uygulandı. Elde edilen preparatlar üzerinde, Olympus BX-51 ışık mikroskopunda X400 büyütmede morfoloji tayini yapıldı. Her denek için 100 sperm sayıldı ve bunlar morfolojik açıdan normal veya anormal (baş, boyun ve

kuyruk defektli) olarak sınıflandırıldı. Normal sperm yüzdesi hesaplandı (5). Değerlendirmeler esnasında farklı morfolojiye sahip spermier fotoğraflandırıldı (Şekil 4).



**Şekil 4. Farklı sperm morfolojileri; normal morfolojili (A), küçük başlı ve kırık kuyruklu (B), düz başlı (C), kıvrık kuyruklu (D), kırık boyunlu (E ve F) spermier görülmektedir (X400)**

Sperm canlılık testi için, eosin-nigrosin boyama yöntemi uygulandı. Bu boyama tekniği, cansız hücrelerin eozini alıp kırmızıya boyanmaları prensibine dayanır. Nigrosin ise, arka planı siyah yaparak değerlendirmeyi kolaylaştırır. Her denek için, VitalScreen sperm vitalite testi (VitalScreen, FertiPro, Belgium) prosedürüne uygun olarak preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar, Olympus BX-51 ışık mikroskopunda, X400 büyütmede kurutulmadan hızlıca değerlendirildi. Sperm başları kırmızı (koyu pembe) boyanan spermiler cansız, boyanmayanlar ise canlı sperm olarak belirlendi. Her denek için 100 sperm sayıldı ve canlılık oranı hesaplandı (80).

Boyama protokolü:

- Test tüpü içerisinde, 50 µl sperm ve 2 damla Eosin Y karıştırıldı ve 30 saniye bekletildi,
- Karışıma 3 damla nigrosin eklenerek tekrar 30 saniye bekletildi,
- Karışımından 20 µl alınarak bir lam üzerine yayıldı, üzeri kapatılarak kurumadan mikroskop altında değerlendirildi.

### **Total Testosteron Ölçümü**

Deneyin 60. günü sakrifiye edilen hayvanların kardiyak kan örnekleri alınarak, serumda total testosteron düzeyleri, Trakya Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda kimyasal immunoassay (Chemiluminescence Immunassay-Architect i2000SR, Abbott, Almanya) yöntemi ile ölçüldü.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

Sonuçlar Ortalama  $\pm$  Standart Sapma olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Tek Örneklem Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Grupların (Kontrol, CP, CP + L-Karnitin) vücut ve testis ağırlığı, morfometrik ölçüm, histopatolojik skor, TUNEL analizi ile sperm parametre değerlerinin karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı, anlamlı farklılık saptandığında farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için grup varyanslarının homojenlik durumları incelenerek Tukey ya da Tamhane post-hoc testleri kullanıldı. İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanılarak yapıldı.  $P < 0.05$  istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi.

## **BULGULAR**

### **AĞIRLIK BULGULARI**

Çalışmada, deneyin 1. ve 60. gününde sakrifiye edilen hayvanların vücut ağırlıkları ile testis ağırlıkları ölçülmüş ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı hesaplanarak elde edilen sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir. Prepubertal dönemde cisplatin grubunun vücut ağırlığında kontrol grubuna kıyasla gözlenen anlamlı derecede artışın ( $p<0.01$ ), grupların oluşturulması esnasında vücut ağırlığı fazla olan deneklerin cisplatin grubuna rastgelmesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünüldü. Cisplatine maruziyetin, deneklerin testis ağırlıkları ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranında bir artışa ( $p=0.094$ ) neden olduğu, ancak sadece testis ağırlıklarındaki artışın ( $p=0.026$ ) istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi. Erişkin dönemde gelişime bağlı olarak tüm gruplarda, vücut ağırlığı ve testis ağırlığında artış gözlenirken, gruplar arasında bu parametreler açısından anlamlı bir farkın olmadığı dikkati çekti.

### **MORFOMETRİK BULGULAR**

Deneyin 1. ve 60. gününde sakrifiye edilen prepubertal ve erişkin deneklerin H+E boyalı testis kesitlerinde, seminifer tübül çapları ve interstisyel alanlar ölçüldüğünde elde edilen sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir. Prepubertal dönemde cisplatine maruziyetin, kontrol grubu ile kıyaslandığında hayvanların seminifer tübül çaplarını değiştirmedığı ancak interstisyel alanlarda anlamlı oranda genişlemeye ( $p<0.001$ ) neden olduğu tespit edildi. L-karnitin tedavisinin ise bu genişlemeyi kısmen önlediği ( $p=0.056$ ) gözlemlendi. Aynı gruplara ait erişkin hayvanların seminifer tübül çaplarının, testiküler gelişime bağlı olarak prepubertal dönemlerindeki kıyasla önemli ölçüde arttığı, bu artışa paralel olarak da interstisyel alanların azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte prepubertal dönemde tek doz uygulanan

cisplatinin, erişkin testislerinde kontrole kıyasla anlamlı olarak, interstisyel alanlarda artışa, seminifer tübül çaplarında ise azalmaya neden olduğu dikkati çekti. Bu parametreler üzerinde L-karnitin tedavisinin önemli ölçüde koruma sağladığı görüldü ( $p<0.01$ ).

**Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının prepubertal ve erişkin döneme ait vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranları ile seminifer tübül çapı ve interstisyel alanlarının karşılaştırılması**

		<b>Kontrol (n=6)</b>	<b>Cisplatin (n=8)</b>	<b>Cisplatin + L- Karnitin (n=8)</b>	<b>P</b>
<b>Prepuberte</b>	<b>Vücut ağırlığı (gr)</b>	72±3.3	86.3±7.0*	80±5.1	0.001
	<b>Testis ağırlığı (gr)</b>	0.26±0.078	0.387±0.046**	0.365±0.053	0.005
	<b>Testis ağırlığı/vücut ağırlığı</b>	0.003±0.001	0.004±0.001	0.004±0.001	0.039
	<b>Seminifertübül çapı (µm)</b>	147.3±18.5	145.8±7.2	152.5±6.6	0.606
	<b>İnterstisyel alan kalınlığı (µm)</b>	49.1±1.7	61.8±5.0*	56.4±3.5	<0.001
	<b>Erişkin</b>	<b>Vücut ağırlığı (gr)</b>	265.5±12.0	263±23.1	258.3±4.6
<b>Testis ağırlığı (gr)</b>		1.286±0.14	1.242±0.097	1.254±0.105	0.794
<b>Testis ağırlığı/vücut ağırlığı</b>		0.004±0.001	0.004±0.001	0.004±0.001	0.315
<b>Seminifertübül çapı (µm)</b>		288.8±5.4	271±5.3*	282.5±3.4†	<0.001
<b>İnterstisyel alan kalınlığı (µm)</b>		33.6±0.8	41.9±0.7††	38±1.1†	<0.001

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

\* $p<0.01$  kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $p<0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında

† $p<0.01$  cisplatin ile karşılaştırıldığında

†† $p<0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında

## HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

### Prepubertal Döneme Ait Bulgular

**Kontrol grubu bulguları:** Prepubertal kontrol grubu deneklerinin, H+E ve PAS+HL boyalı kesitlerine ait ışık mikroskopik görüntüler Şekil 5-8'de gösterilmiştir. İncelemelerde, testisleri saran tunika albugineanın erişkinine kıyasla daha ince ve bağ doku hücrelerinden

zengin bir yapıda olduğu gözlemlendi. Bu kapsülden içeriye uzanarak seminifer tübüleri birbirinden ayıran interstisyel bağ dokusu, genel bağ doku hücrelerinin yanı sıra, kan kapillerleri yakınında gruplar ya da kordonlar oluşturmuş, yuvarlak şekilli, eozinofilik sitoplazmalı Leydig hücreleri ile kemirgenlere özgü geniş lenfatik sinüzoidleri içermekte idi (Şekil 5,7). Bu alanlar arasında genellikle lümenleri açılmış, oblik ya da yuvarlak şekilli, küçük çaplı seminifer tübüleri izlenmekte idi (Şekil 5-7). Etrafı PAS (+) ince bazal lamina ile çevrelenmiş seminifer tübüllerin duvarında, Sertoli hücrelerinin arasına yerleşmiş, çok sayıda, bir veya iki sıra spermatogonyumların varlığı dikkat çekiciydi. Bazı tübüllerde spermatogonyumların üzerinde lümeneye doğru yerleşmiş, az sayıda farklı mitotik evrede primer spermatositte rastlandı (Şekil 6-8). Bu hücrelerin leptoten, zigoten ya da kromatidlerin birbirinden uzaklaşması nedeniyle nükleuslarının büyük görünmesi ile ayırt edilebilen pakiten dönemleri tanımlandı (Şekil 7). Mayozun ikinci kısmının kısa sürmesi nedeniyle sekonder spermatositlerin seçilemediği tübüllerin bazılarında, yer yer lümeneye yakın yerleşimli erken (yuvarlak) spermatidler tespit edildi (Şekil 7,8). Bu bulgular neticesinde histopatolojik değerlendirme sonucunda, kontrol grubu deneklerinin seminifer tübüleri %90.5 oranında normal olarak tanımlandı (Tablo 2).

**Cisplatin grubu bulguları:** Prepubertal dönemde (30 günlük) tek doz 5 mg/kg cisplatine maruziyetten 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların testis kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, ince tunika albuginea ile çevrili testislerin farklı çap ve şekillerde dejeneratif tübüleri içerdiği gözlemlendi. İnterstisyel alanda yer yer ödem ve hücre artışı ile birlikte bazı bölgelerde seminifer tübüllerin birbirinden uzaklaştığı görüldü (Şekil 9,10). Hasarlanmış tübüllerin duvarında, germinal hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları sonucu meydana gelen hücre kayıpları nedeni ile, yer yer boşlukların ortaya çıktığı tespit edildi. Bazı tübüllerde, primer spermatositlerin epitelden ayrıldığı ve olgunlaşmamış hücrelerin lümeneye döküldüğü dikkati çekti (Şekil 10,11). Genellikle ince PAS (+) bazal lamina ile çevrili seminifer tübüller arasında, düzensiz sınırlara sahip dejeneratif tübüllerin ondülal bazal lamina yapısı izlendi (Şekil 12). Seminifer tübüller üzerinde cisplatin maruziyetinin yol açtığı hasarlar; ayrılma, dökülme ve vakuolizasyon şeklinde skorlandığında, cisplatin grubunun hasarlı tübül sayısının kontrole kıyasla anlamlı derecede ( $p < 0.001$ ) arttığı gözlemlendi (Tablo 2).

**Cisplatin + L-karnitin grubu bulguları:** Tek doz cisplatin uygulamasından 1 saat önce verilen 250 mg/kg L-karnitin tedavisinin, cisplatine bağlı olarak 24 saat sonra ortaya çıkan akut testisküler hasarı kısmen önlediği görüldü. L-karnitin tedavili grubun prepubertal testis kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, seminifer tübüllerde cisplatinin neden olduğu germinal hücre kayıplarına bağlı olarak ortaya çıkan seminifer epiteldeki boşluk ve

ayrılmalar ile lümende gözlenen hücrel döküntülerin büyük oranda azaldığı dikkati çekti. Büyüklük ve şekil olarak kontrol grubunu andıran seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyel alanlar da normal yapıda izlendi (Şekil 13-16). L-karnitinin koruyucu etkisi nedeniyle, prepubertal deneklerin seminifer tübül hasar skorunun da sadece cisplatin alan gruba kıyasla anlamlı derecede azaldığı ( $p<0.001$ ) tespit edildi (Tablo 2).

### **Erişkin Döneme Ait Bulgular**

**Kontrol grubu bulguları:** Deneyin 60. günü sakrifiye edilen 90 günlük erişkin deneklerin, H+E ve PAS+HL boyalı testis kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, prepubertal döneme kıyasla daha kalın ve fibröz yapıda tunika albuginea ile çevrili testislerde, daha büyük çaplı ve yuvarlak seminifer tübüllerin, düzenli yapıya sahip interstisyel alanlar ile birbirinden ayrıldığı görüldü (Şekil 17). Daha büyük büyütme oranlarında seminifer tübüllerin kalınlaşması neticesinde, tübüller arası mesafenin, prepubertal testislere oranla azalmış olduğu tespit edildi. Bu interstisyel alanlar, kapillerler etrafında toplanmış eosinofilik yapıda, yuvarlak şekilli çok sayıda Leydig hücreleri ve klasik bağ doku hücrelerini içermekte idi (Şekil 18,19). Normal çapa ulaşmış olan seminifer tübüllerin duvarında, aktif spermatogenezin bir göstergesi olarak düzenli organizasyona sahip germinal hücreler tanımlandı (Şekil 19,20). Bu tübüller, spermatogenezin farklı aşamasına göre sırasıyla bazale yakın yerleşimli spermatogonyumları, bunların mitozu ile ortaya çıkan primer spermatositleri, nadiren gözlenebilen sekonder spermatositleri, erken ve geç dönem spermatidleri ile bu hücrelerin farklılaşması ile oluşan lümene atılmış spermleri içermekte idi (Şekil 19). PAS+HL boyalı kesitlerde PAS (+) akrozom yapısı ile kep aşamasındaki spermatidleri ve çengel şeklindeki baş kısımları tübül bazaline dönük, kuyrukları lümene uzanan olgun spermler kolaylıkla tanımlanabilmekte idi (Şekil 20). Histopatolojik değerlendirme ile bu özelliklere sahip tübüllerin oranı %89.8 olarak tespit edildi (Tablo 2).

**Cisplatin grubu bulguları:** Prepubertal dönemde (30 günlük) tek doz 5 mg/kg cisplatine maruz kalan sıçanların 60 günlük bekleme süreci ardından erişkin dönemdeki testis kesitleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde, cisplatinin prepubertal dönemdeki akut etkisiyle ortaya çıkan hasarların erişkin döneme de yansıdığı tespit edildi. Kontrol grubuna yakın çapa sahip seminifer tübüllerin epitelinde, tek doz cisplatinin etkisiyle germinal hücreler arasında boşlukların ve vakuollerin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 21,22). Bu grubun hasarlı tübül oranının, prepubertal döneme oranla kısmen azaldığı ancak yine de erişkin kontrol değerlerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 2). Ayrıca lümenleri boş seminifer tübüllerin yanı sıra düzenli spermatogenezin izlendiği tübüllerin varlığı dikkati çekti (Şekil

22). Bununla birlikte bazı tübüllerin lümeninde henüz sitoplazmasından kurtulamamış spermatidler tespit edildi (Şekil 23). İnce bazal lamina ile çevrili hasarlı ve normal tübüllerin arasındaki interstisyel alanlarda yer yer düzensizlikler ve kayıplar gözlemlendi (Şekil 24).

**Cisplatin + L-karnitin grubu bulguları:** Prepubertal dönemde uygulanan tek doz cisplatin enjeksiyonundan 1 saat önce ve sonraki 3 gün boyunca verilen 250 mg/kg L-karnitin tedavisinin, cisplatinin erişkin dönemde meydana getirdiği testiküler hasarı kısmen önlediği tespit edildi (Şekil 25-28). Bu koruyucu etkinin sonucu olarak da grubun hasarlı seminifer tübül oranının, cisplatin verilen erişkin deneklerinkinden daha az olduğu gözlemlendi (Tablo 2).

**Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarının prepubertal ve erişkin döneme ait testis dokularının histopatolojik olarak değerlendirilmesi**

		<b>Kontrol (n=6)</b>	<b>Cisplatin (n=8)</b>	<b>Cisplatin + L- Karnitin (n=8)</b>	<b>P</b>
<b>Prepuberte</b>	<b>Normal tübül (%)</b>	90.5±4.0	59.8±8.3*	77.2±4.9**	<0.001
	<b>Ayrılan tübül (%)</b>	1±1.3	14.2±5.7*	6.2±3.0**	<0.001
	<b>Dökülen tübül (%)</b>	7.3±3.7	19.8±5.6*	13.2±2.1***	<0.001
	<b>Vakuolize tübül (%)</b>	1.2±1.0	6.2±1.9*	4.2±1.5	<0.001
<b>Erişkin</b>	<b>Normal tübül (%)</b>	89.8±3.1	68.2±3.1*	80.8±2.6†	<0.001
	<b>Ayrılan tübül (%)</b>	6.5±2.3	14±2.9*	11.5±2.4	<0.001
	<b>Dökülen tübül (%)</b>	2.2±1.5	14.7±2.1*	6±1.8†	<0.001
	<b>Vakuolize tübül (%)</b>	1.2±1.2	2.8±0.8††	1.7±1.2	0.044

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

\*p<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*p<0.01 cisplatin ile karşılaştırıldığında

\*\*\*p<0.05 cisplatin ile karşılaştırıldığında

†p<0.001 cisplatin ile karşılaştırıldığında

††p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında



## **TUNEL BULGULARI**

Prepubertal dönemde cisplatin maruziyetinin testis germinal hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini değerlendirmek amacı ile yapmış olduğumuz TUNEL analizi sonuçları Tablo 3'te sunulmuştur. Kontrol grubu testislerinde, seminifer epitelinde 1 veya 2 adet TUNEL (+) hücre içeren az sayıda tübüllün varlığı ile birlikte, %85'nin hiç apoptotik hücre içermediği gözlemlendi. Nükleusu koyu kahverengi boyanmış TUNEL (+) hücrelerin başlıca primer spermatozoid ve spermatogonyumlar olduğu tespit edildi (Şekil 29,30). Tek doz 5 mg/kg cisplatin enjeksiyonunun, 24 saat sonunda deneklerin apoptotik hücre içeren seminifer tübül oranında anlamlı bir artışa (%38.2) neden olduğu ve bu hücrelerin çoğunluğunu primer spermatozoidlerin oluşturduğu görüldü (Şekil 31,32). Bu apoptotik tübüllerin genellikle 3 veya daha fazla TUNEL (+) hücre içerdiği, dolayısı ile 100 tübüldeki toplam apoptotik hücre sayısında kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı ( $p<0.001$ ) dikkati çekti. L-karnitin tedavisinin germinal hücre apoptozisini önlemek suretiyle (Şekil 33,34), hem apoptotik tübül hem de apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı ( $p<0.001$ ) gözlemlendi.

## **EPİDİDİMAL SPERM DEĞERLENDİRME BULGULARI**

Deneyin 60. günü sakrifiye edilen erişkin deneklerin epididimal sperm örneklerinde, sperm sayısı ile hareketli, canlı ve normal morfolojili sperm yüzdeleri değerlendirilerek gruplara ait bulgular fotoğraflandırıldı (Şekil 35-40) (Tablo 4). Tüm bu parametreler göz önüne alındığında, prepubertal dönemde cisplatin maruziyetinin, deneklerin erişkin dönemdeki sperm sayısı ve kalitesini olumsuz yönde etkilediği gözlemlendi. Spermac ile boyanan kontrol grubuna ait preparatlarda, normal morfolojiye sahip spermilerin çoğunlukta olduğu (Şekil 35), buna karşın cisplatin enjeksiyonuyla birlikte baş-boyun ve kuyruk anomalisine sahip spermilerin sayıca arttığı (Şekil 36) dikkati çekti. Ayrıca eosin-nigrosin boyası ile sperm vitalitesi değerlendirildiğinde, kontrole kıyasla (Şekil 38), cisplatin grubu preparatlarında baş kısımlarının koyu pembe boyanması ile canlı olanlardan ayırdedilebilen çok sayıda ölü sperm varlığı gözlemlendi (Şekil 39). İstatistiksel olarak da, kontrol grubuna kıyasla cisplatin grubunun sperm sayısı ( $p=0.001$ ), hareketli ( $p<0.001$ ) ve canlı sperm ( $p<0.001$ ) ile normal morfolojili sperm yüzdesinde ( $p=0.0032$ ) anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. L-karnitin tedavisi ile sperm parametrelerinde iyileşmenin olduğu özellikle sperm sayısı ( $p=0.015$ ), canlı sperm yüzdesi (Şekil 40,  $p<0.001$ ) ile normal morfolojili sperm yüzdesinde (Şekil 37,  $p=0.053$ ) cisplatin grubuna kıyasla bir artışın meydana geldiği görüldü.

**Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarının prepubertal dönemine ait apoptotik seminifer tübül ve germinal hücre sayısı**

	<b>Kontrol (n=6)</b>	<b>Cisplatin (n=8)</b>	<b>Cisplatin+ L Karnitin (n=8)</b>	<b>p</b>
<b>1-2 apoptotik hücre içeren tübül sayısı</b>	11.8±4.8	21.2±4.0*	11.8±3.6**	0.005
<b>≥3 apoptotik hücre içeren tübül sayısı</b>	2.6±1.1	17±1.9†	8.8±3.4††	<0.001
<b>Normal tübül sayısı</b>	85.6±5.4	61.8±4.0†	79.4±3.4††	<0.001
<b>100 tübüldeki toplam apoptotik hücre sayısı</b>	24.6±6.1	107±5.9†	51.8±9.4††	<0.001

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

\*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*p<0.05 cisplatin ile karşılaştırıldığında

†p<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında

††p<0.001 cisplatin ile karşılaştırıldığında

**Tablo 4. Kontrol ve deney gruplarının erişkin dönem epididimal sperm parametreleri ve total serum testosteron düzeyleri.**

	<b>Kontrol (n=6)</b>	<b>Cisplatin (n=8)</b>	<b>Cisplatin+ L Karnitin (n=8)</b>	<b>p</b>
<b>Sperm sayısı (milyon/ml)</b>	379.2±45.9	175±67.1*	320.8±108.9**	0.001
<b>Hareketli sperm (%)</b>	65.8±11.1	40.8±5.8***	41.7±5.2	<0.001
<b>Canlı sperm (%)</b>	88.2±3.1	44.3±7.0***	62.2±4.4†	<0.001
<b>Normal morfoloji (%)</b>	87.2±4.1	74.3±8.3 ††	86±1.4	0.002
<b>Total testosteron (ng/dl)</b>	192.7±76.9	130.7±33.4	128.7±44.7	0.104

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

\*p<0.01 kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*p<0.05 cisplatin ile karşılaştırıldığında

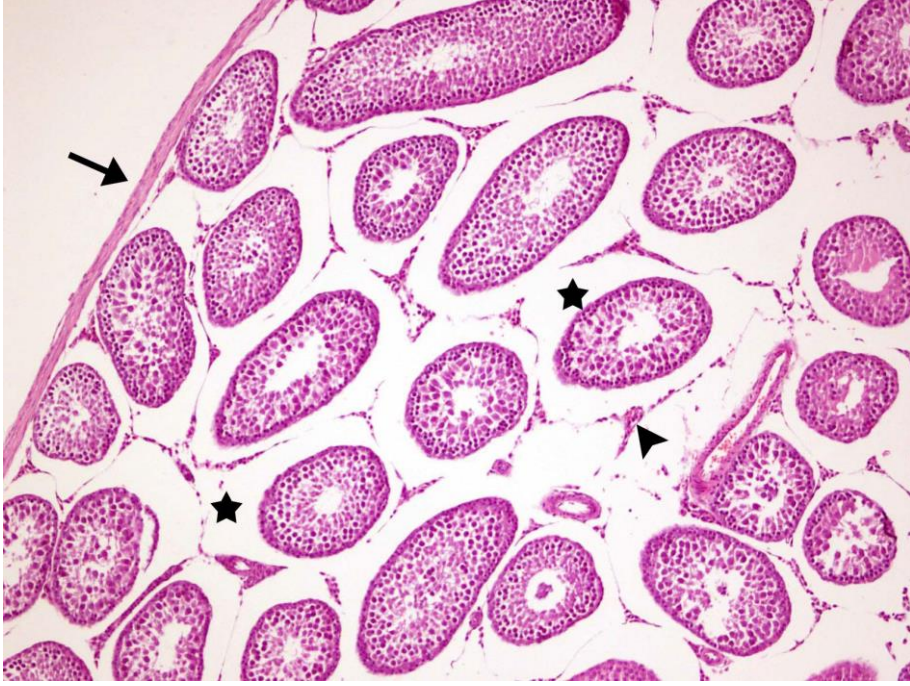
\*\*\*p<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında

†p<0.001 cisplatin ile karşılaştırıldığında

††p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında

## **TOTAL TESTOSTERON DÜZEYİ**

Erişkin dönemde (90 günlük) sakrifiye edilen deneklerin kardiyak kan örneklerinden elde edilen serumlarda total testosteron seviyeleri ölçülmüştür. Prepubertal dönemde tek doz cisplatin enjeksiyonun erişkin dönem serum testosteron düzeylerini düşürdüğü ancak bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ( $p=0.157$ ). L-karnitin tedavisinin ise bu azalmayı önleyici bir etkisinin olmadığı, serum testosteron düzeyleri açısından cisplatin grubundan farklı olmaması ile tespit edildi ( $p=0.998$ , Tablo 4).

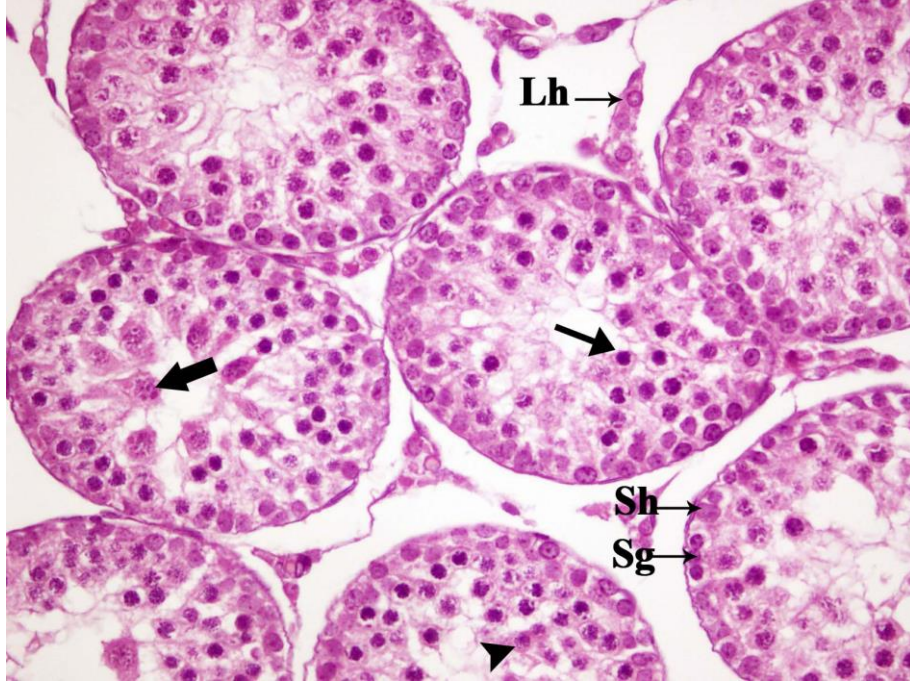


**Şekil 5.** Deneyin 1. gününe ait kontrol grubu prepubertal sıçan testisinde, dıştan ince tunika albuginea (→) ile çevrili seminifer tübüller ve geniş lenfatik sinuzoidler (\*) arasında kalan interstisyel bağ dokusu (▶) izlenmektedir. H+E, X100

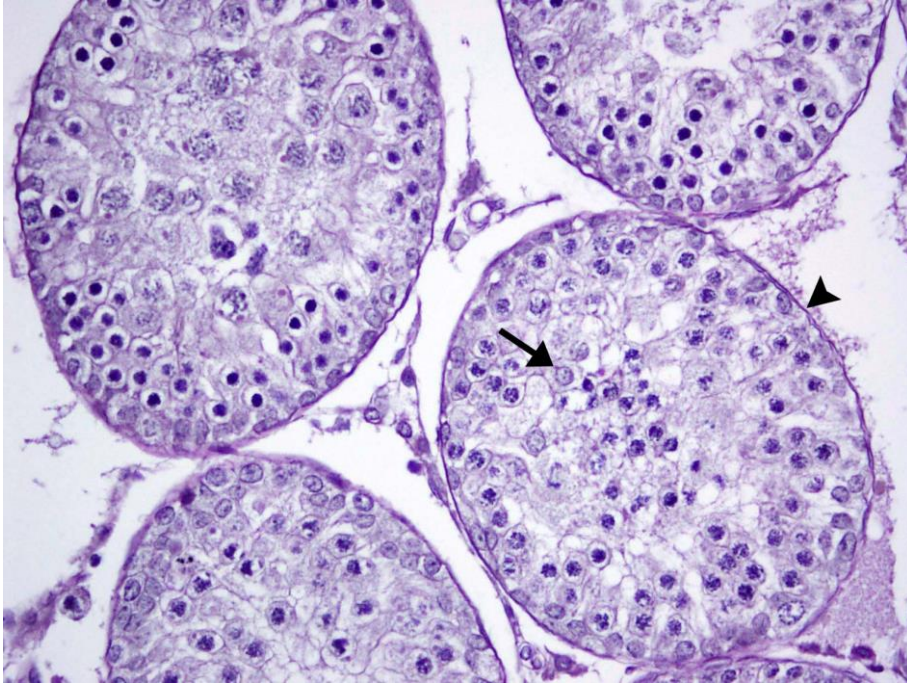


**Şekil 6.** Kontrol grubu prepubertal testislerinde, çoğunlukla primer spermatosit aşamasına ulaşmış ve genellikle lümenleri açık seminifer tübüller (→) görülmektedir. H+E, X200



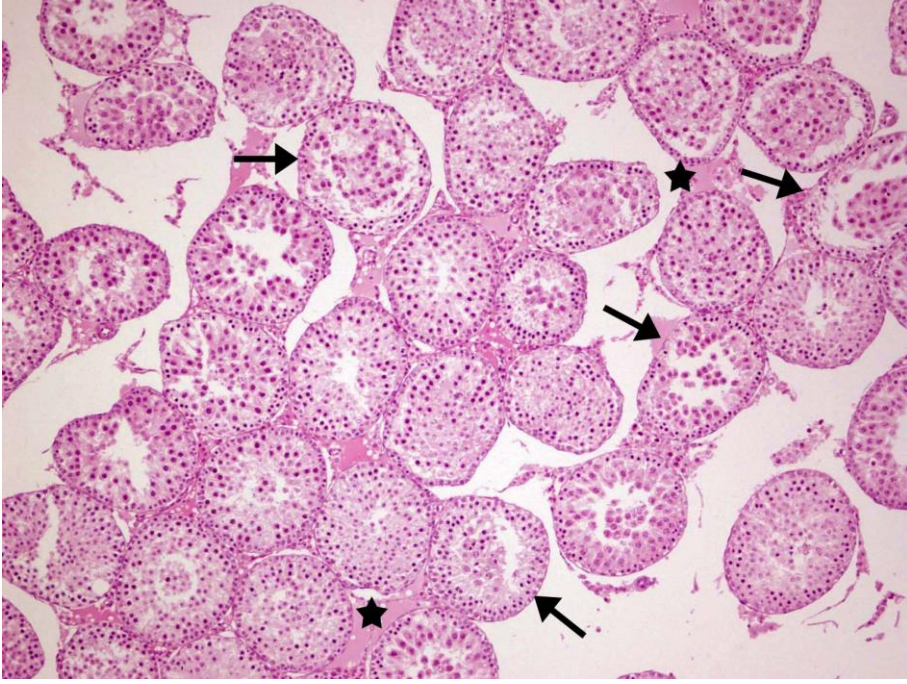


Şekil 7. Kontrol grubunun prepubertal dönemine ait testislerin seminifer tübül epitelinde; Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlar (Sg) ve farklı dönemdeki primer spermatositler (Leptoten veya zigoten(→), pakiten (→)) ile yer yer erken spermatidlerin (▶), interstisyel alanda ise gelişmekte olan Leydig hücrelerinin (Lh) varlığı dikkati çekmektedir. H+E, X400

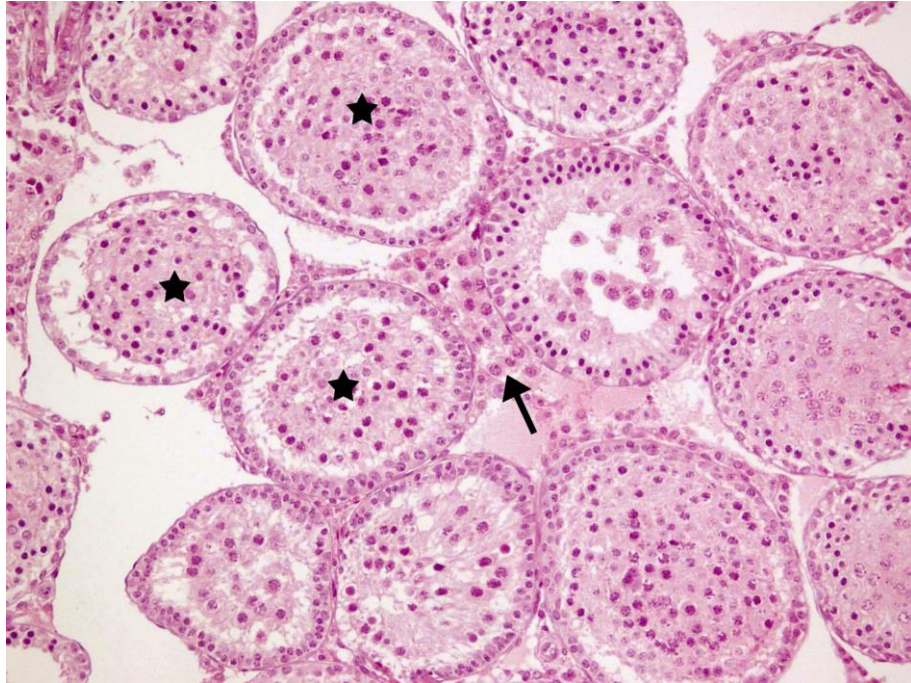


Şekil 8. Kontrol grubu prepubertal sıçan testisinde, ince bazal lamina ile çevrelenmiş (▶), farklı gelişim aşamasında seminifer tübüller izlenmektedir. Erken spermatid (→). PAS+HL, X400



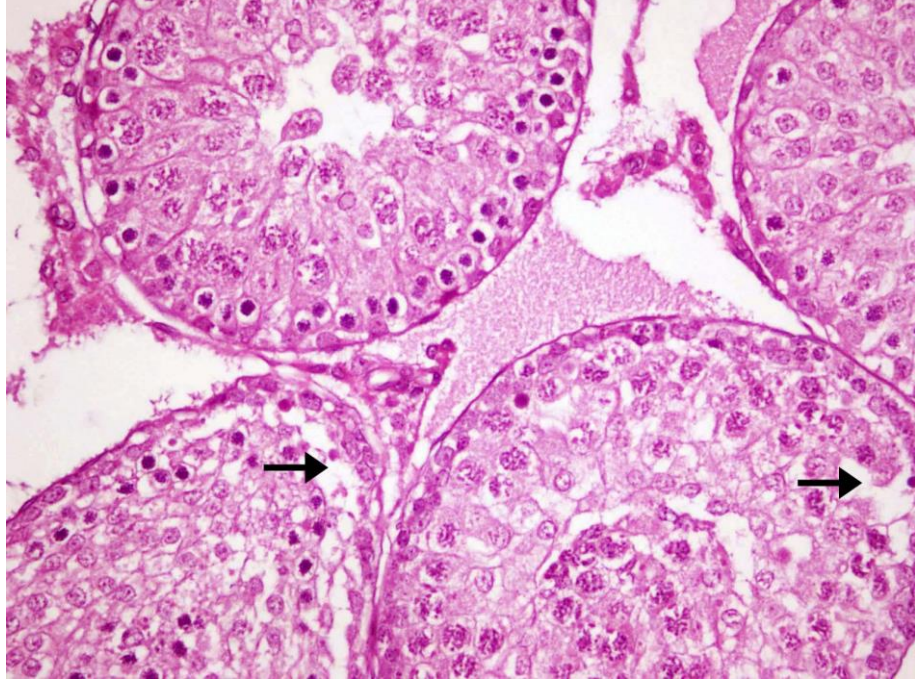


**Şekil 9.** Cisplatin grubuna ait prepubertal sıçan testisinde, farklı çap ve şekillerde dejeneratif seminifer tübüller (→) ile intertisyel alanda ödem (\*) dikkati çekmektedir. H+E, X100

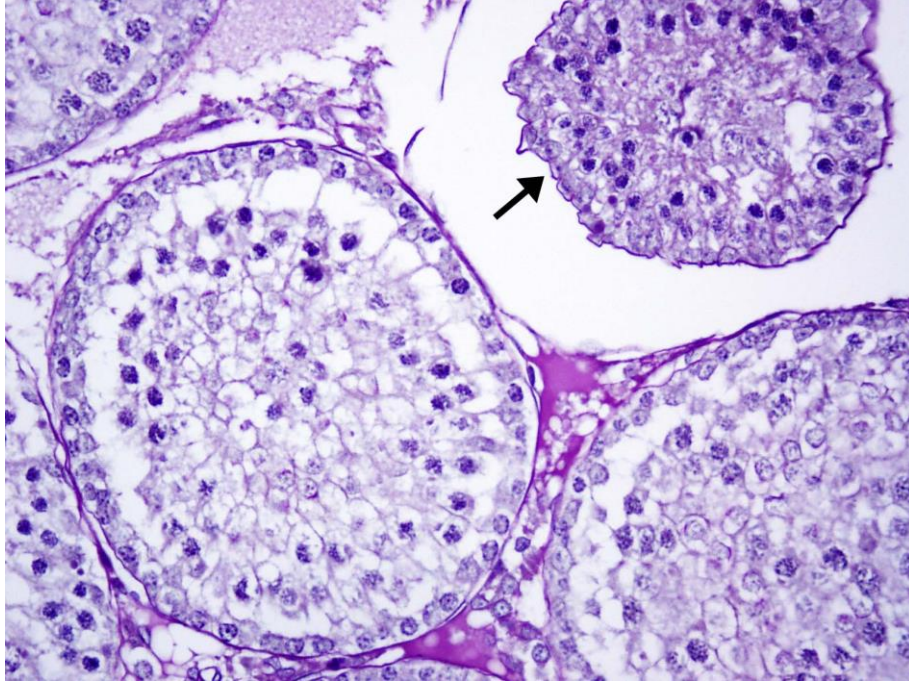


**Şekil 10.** Cisplatin grubu prepubertal testislerin seminifer tübüllerinde, spermatozoid hücre kitlesinin epitelden ayrılarak lümeneye döküldüğü (\*) ve intertisyel alanda hücresel proliferasyon (→) görülmektedir. H+E, X200



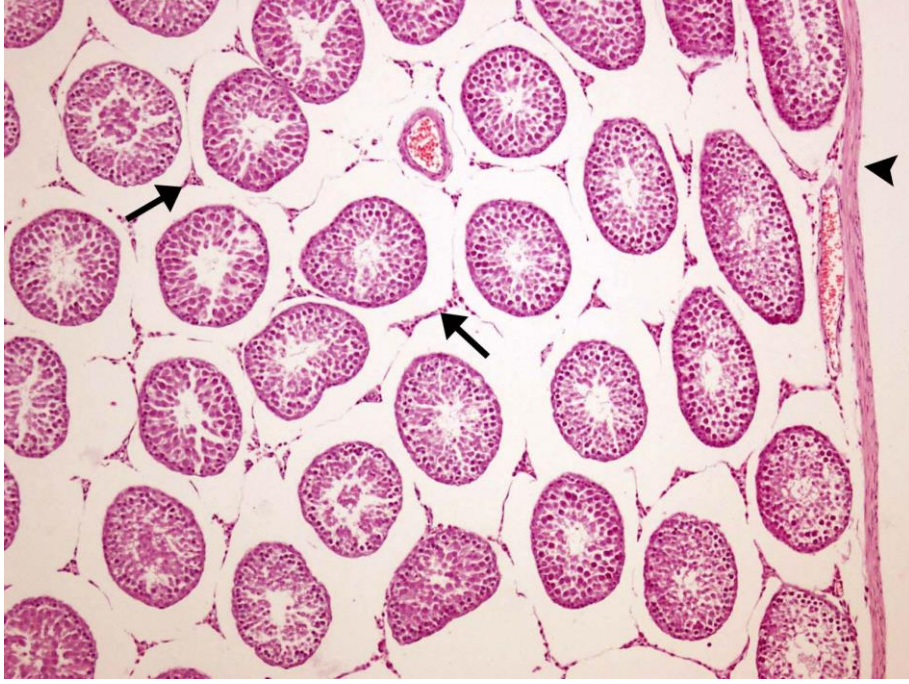


**Şekil 11.** Cisplatin grubu prepubertal sıçan testisinde, dejeneratif tübüllerde germ hücrelerinin birbirlerinden ve bazal membrandan ayrılmaları sonucu seminifer epitelde boşlukların ortaya çıktığı (→) dikkati çekmektedir. H+E, X400



**Şekil 12.** Cisplatin grubu prepubertal sıçan testisinde, normal yapıda bazal lamina ile çevrelenmiş tübüllerin yanı sıra, düzensiz sınırlara sahip dejeneratif tübüllerin etrafında ondülasyon gösteren bazal lamina (→) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X400



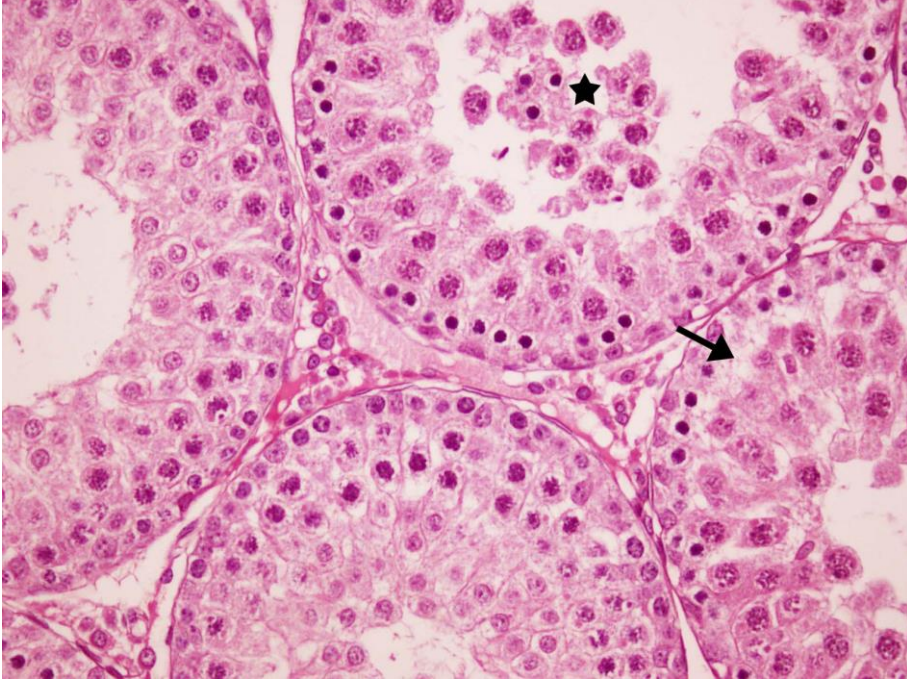


Şekil 13. L-karnitin tedavili gruba ait ince tunika albuginea (►) ile çevrili prepubertal sıçan testisinde, dejeneratif değişikliklerin azalmış olduğu normal konturlara sahip seminifer tübüller ile aradaki interstisyel alanlar (→) izlenmektedir. H+E, X100

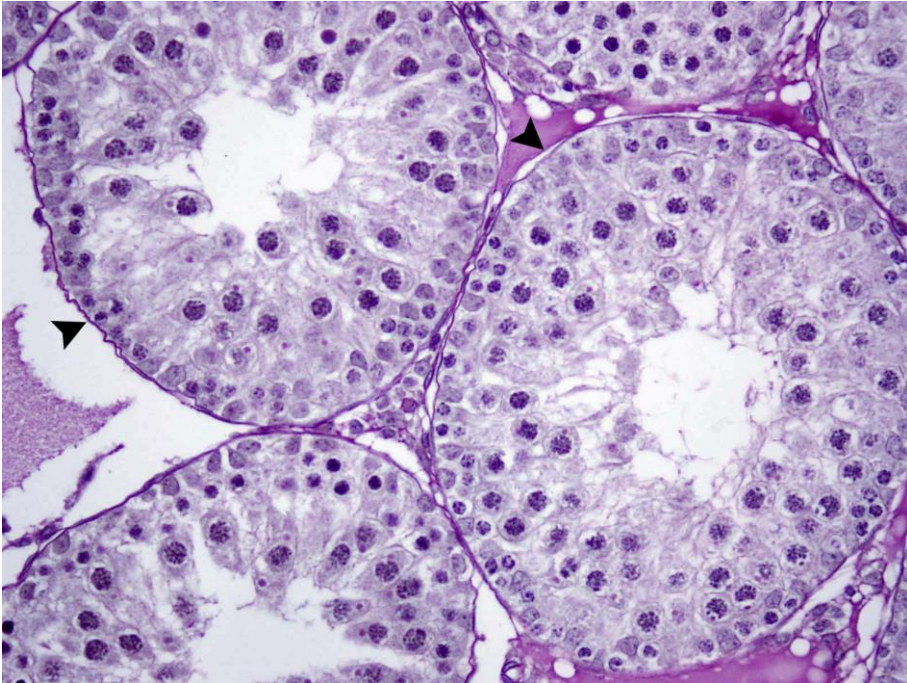


Şekil 14. L-karnitin tedavili gruba ait prepubertal sıçan testisinde, yer yer ödemin izlendiği interstisyel alanlar (\*) ile birbirinden ayrılmış bazı seminifer tübüllerin lümeninde, olgunlaşmamış germ hücreleri (►) gözlenmektedir. H+E, X200



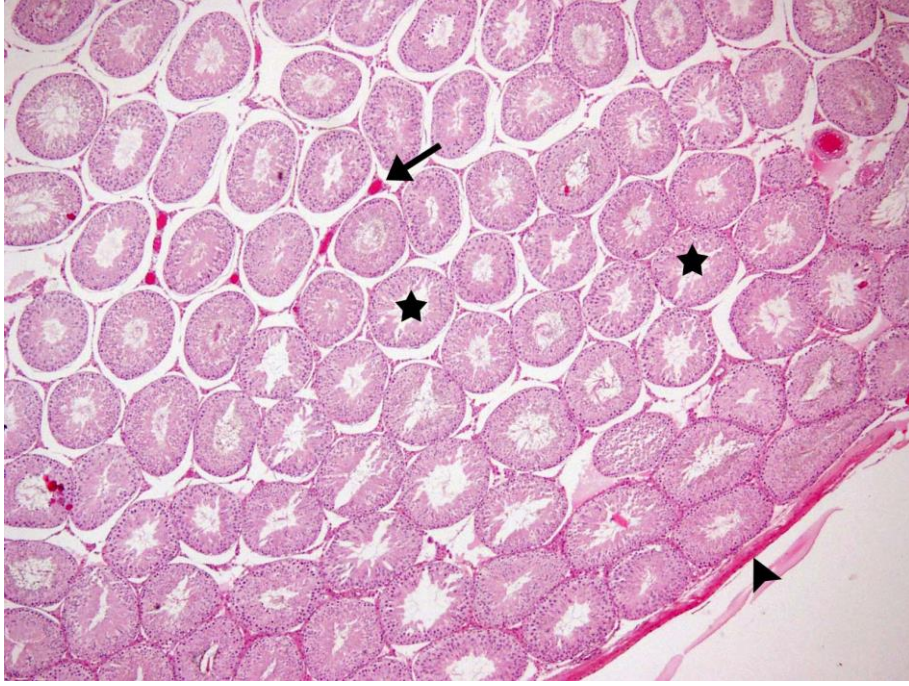


Şekil 15. L-karnitin tedavili grupta prepubertal testisin seminifer tübüllerinde, düzenli yerleşim gösteren germinal hücreler arasında hafif derecede açılmaların (→) ve kopmaların (\*) olduğu görülmektedir. H+E, X400

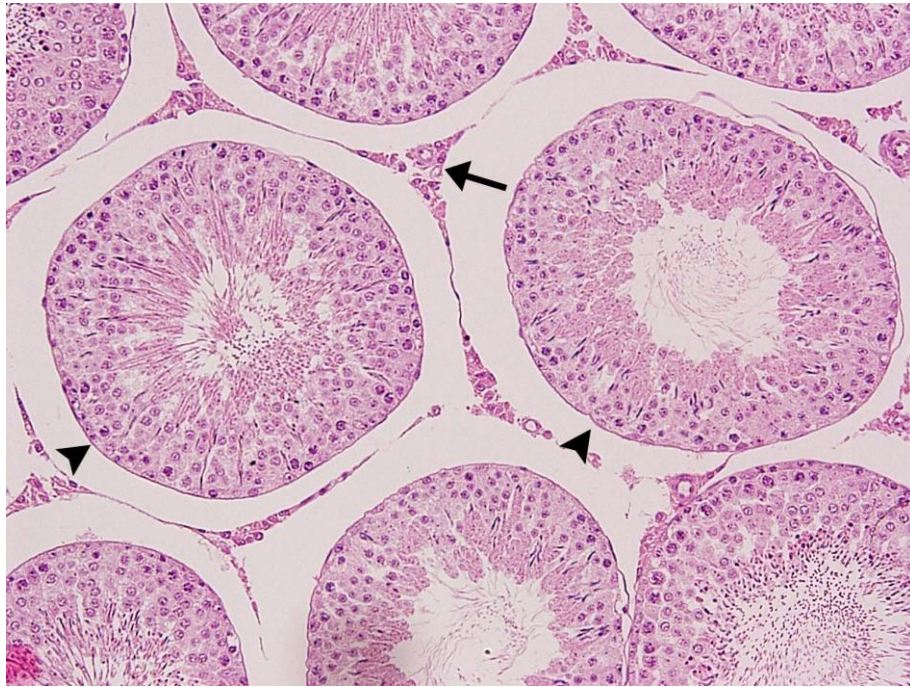


Şekil 16. L-karnitin tedavili grubun prepubertal testis kesitinde, düzenli ve ince bazal lamina (▴) ile çevrelenmiş, nispeten normal yapıda seminifer tübüller izlenmektedir. PAS+HL, X400



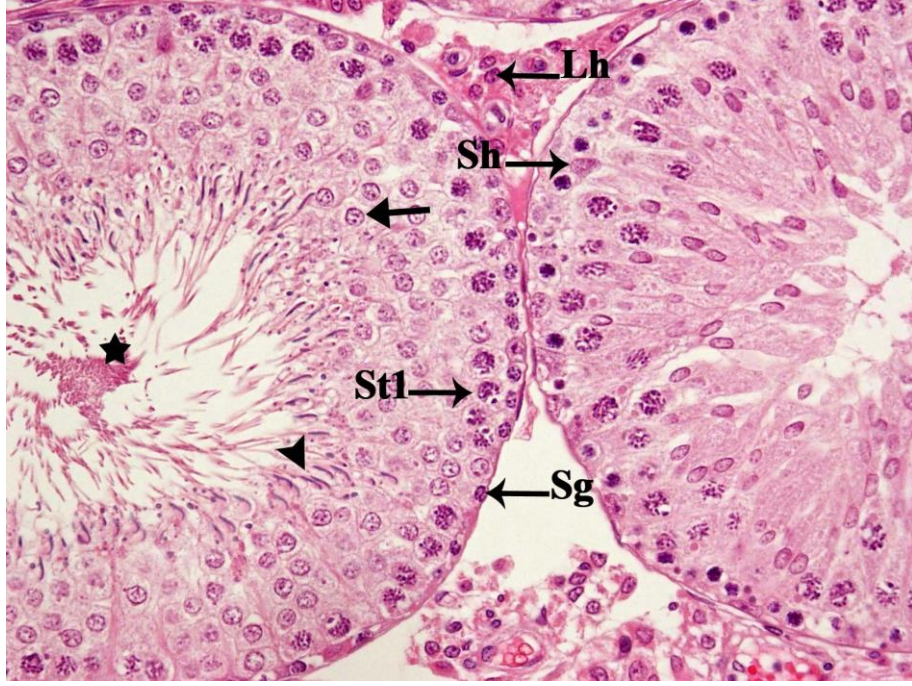


Şekil 17. Deneyin 60. gününe ait kontrol grubu erişkin sıçan testisinde, kompakt yapıda tunika albuginea ile çevrili (▶), düzenli sınırlara sahip, birbirine yakın çapta seminifer tübüller (\*) ile kan damarlarından zengin interstisyel alanlar (→) görülmektedir. H+E, X40

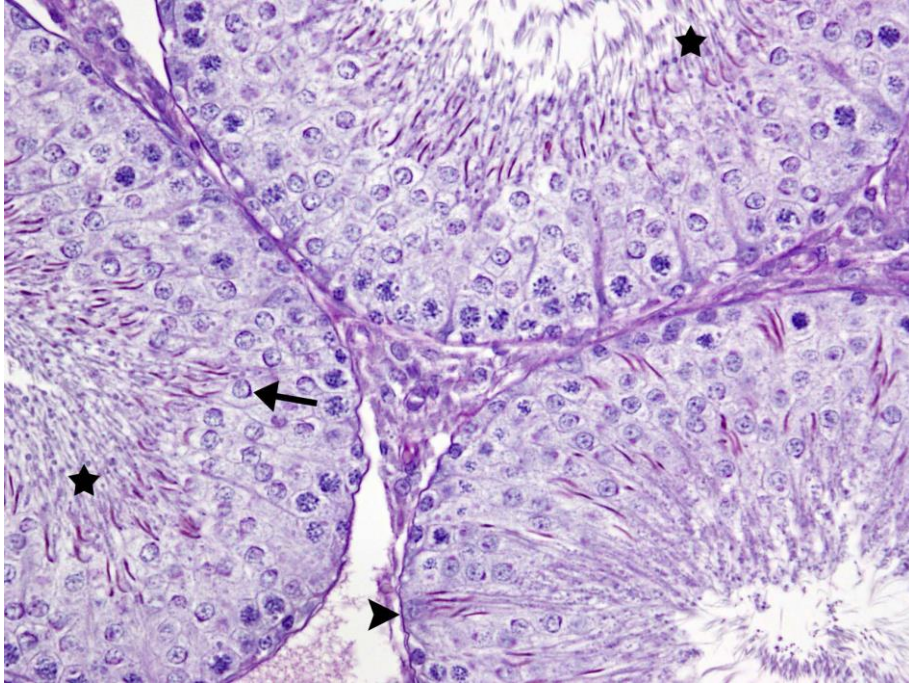


Şekil 18. Kontrol grubuna ait erişkin sıçan testisinde, spermatogenezin farklı aşamalarında olan seminifer tübüller (▶) ile etrafında kan kapillerleri ve Leydig hücrelerini içeren interstisyel alanlar (→) izlenmektedir. H+E, X200



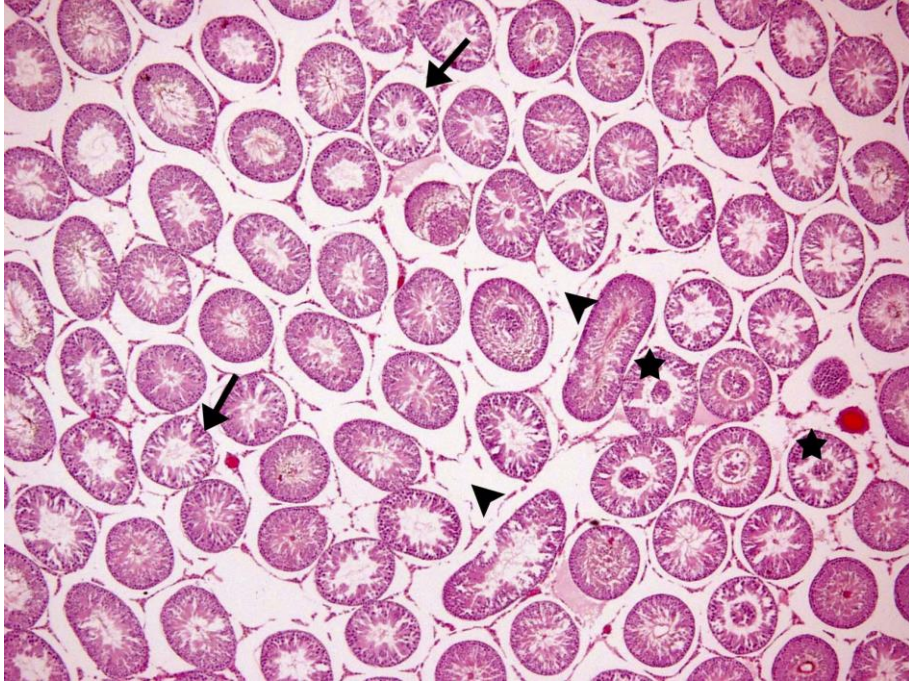


Şekil 19. Kontrol grubu erişkin sıçan testisinde, lümenini olgun spermilerin (\*) doldurduğu düzenli germinal epitele sahip seminifer tübül ile interstisyel alanda, kapillere yakın yerleşimli Leydig hücreleri (Lh) dikkati çekmektedir. Erken spermatid (→), geç spermatid (▶), Sertoli hücresi (Sh), spermatogonyum (Sg), primer spermatosit (St1). H+E, X400

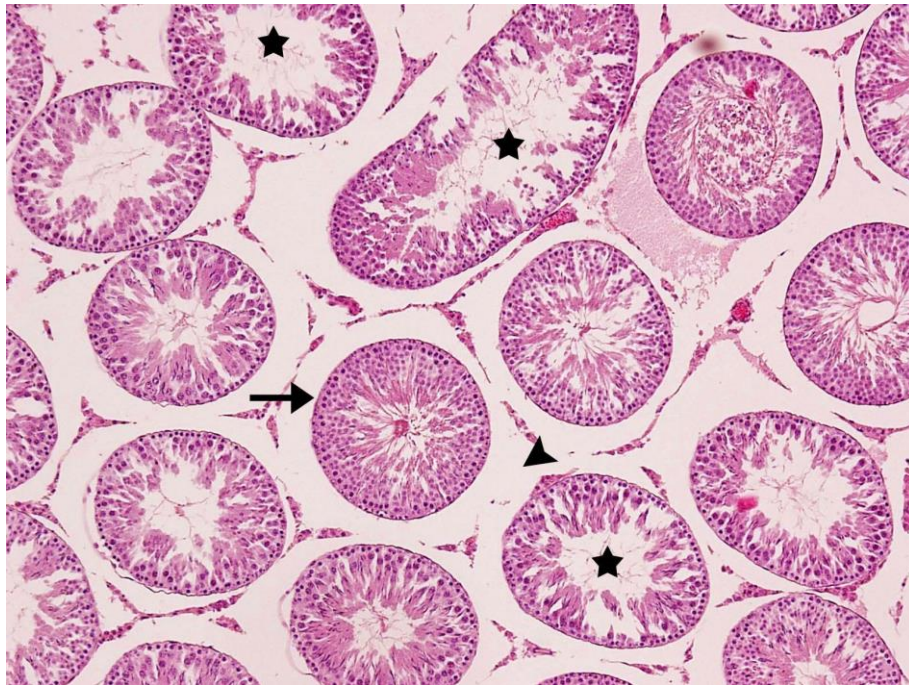


Şekil 20. Kontrol grubu erişkin sıçan testisinde, düzenli spermatogenezin izlendiği ince bazal lamina (▶) ile çevrili seminifer tübüllerde erken spermatidler (→) ve çengel şeklinde baş kısımları ile ayırt edilen spermler (\*) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X400



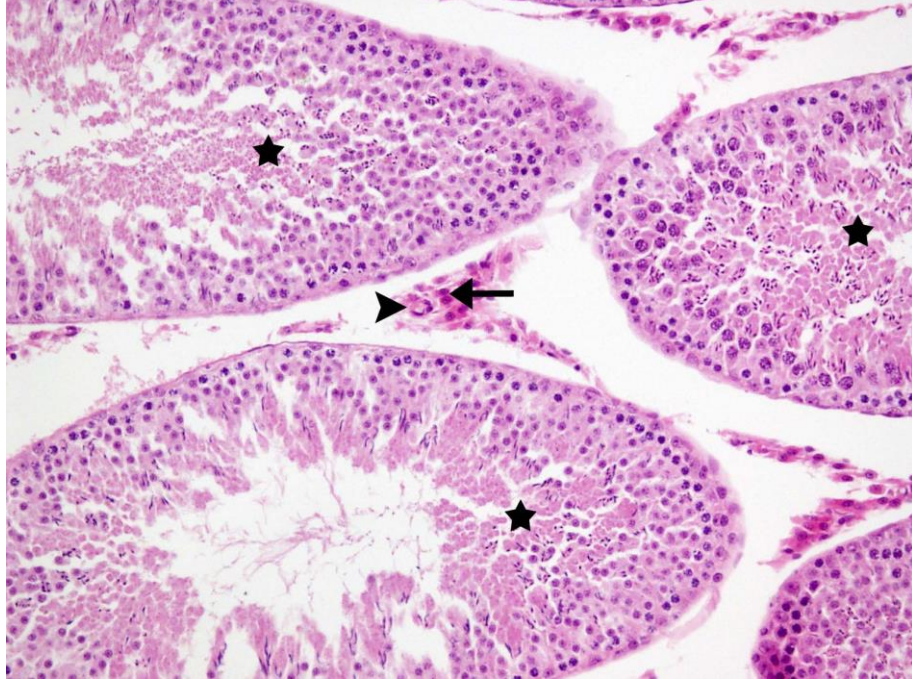


**Şekil 21.** Cisplatin grubuna ait erişkin sıçan testisinde, germinal epitelinde ayrılmaların (→), lümende ise olgunlaşmadan dökülmüş hücrelerin (\*) görüldüğü, farklı büyüklük ve şekillerdeki seminifer tübüller ile yer yer genişlemiş interstisyel sahalarda (▶) gözlenmektedir. H+E, X40

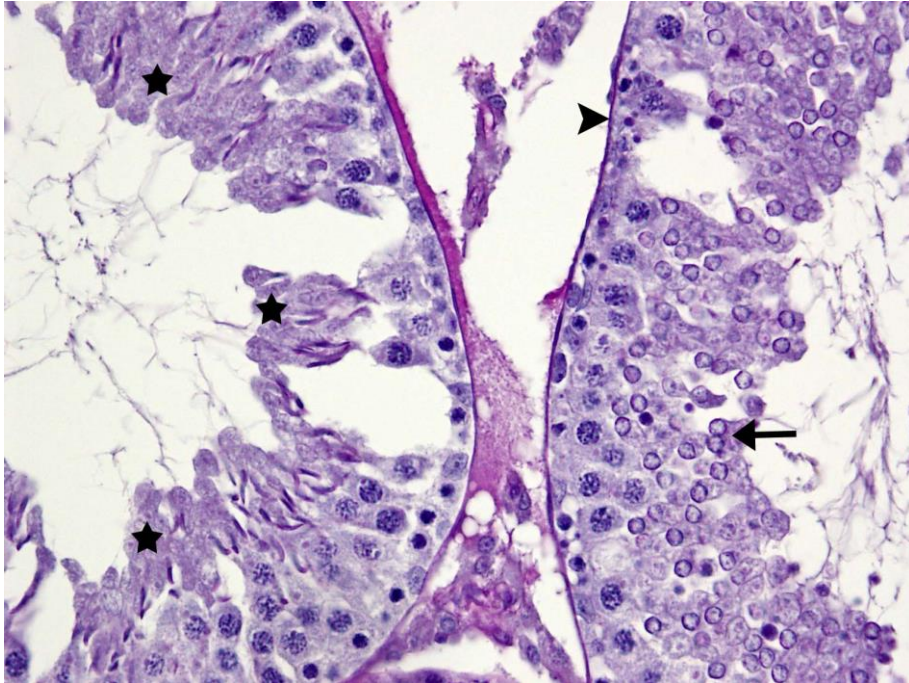


**Şekil 22.** Cisplatin grubuna ait erişkin sıçan testisinde germinal hücre kayıpları nedeni ile duvarında yer yer boşlukların ortaya çıktığı, lümenleri genellikle boş tübüller (\*) ile düzenli spermatogenezin izlendiği seminifer tübüller (→) görülmektedir. Ayrıca bazı interstisyel alanlarda kayıplar ve düzensizlikler (▶) dikkati çekmektedir. H+E, X100



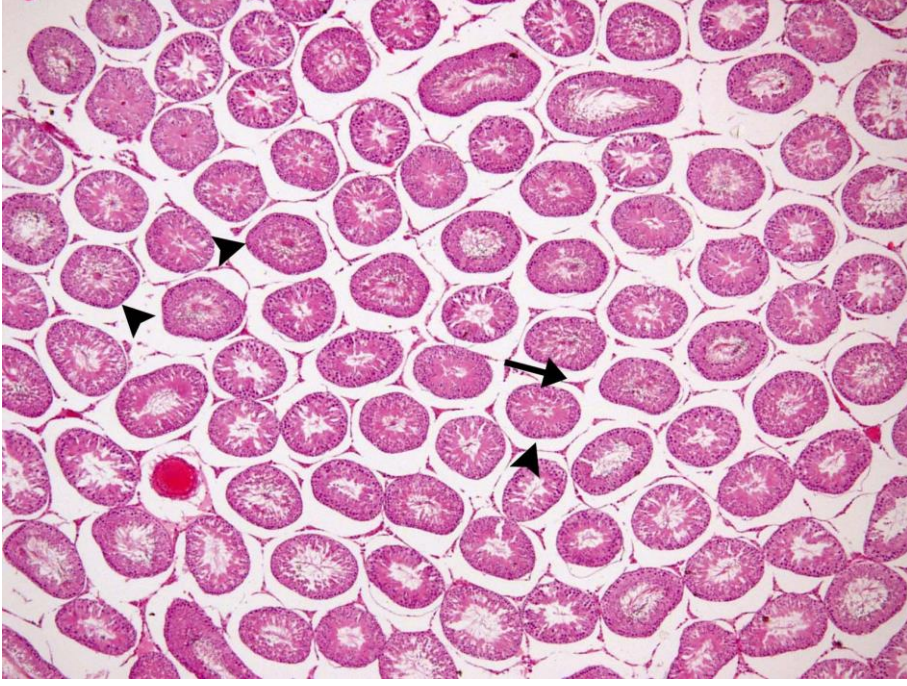


Şekil 23. Cisplatin grubu erişkin testisin seminifer tübül lümeninde, olgunlaşmasını tamamlayamamış geç spermatidlerin varlığı (\*) dikkati çekmektedir. Kan kapilleri (▶), Leydig hücreleri (→). H+E, X200

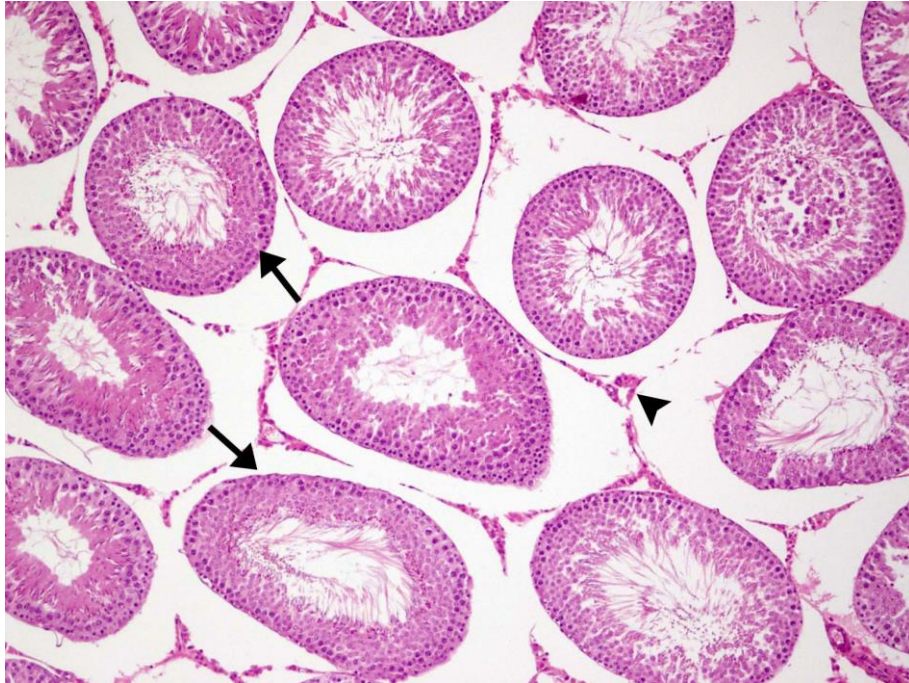


Şekil 24. Cisplatin grubu erişkin testisinde, ince ve düzenli bazal lamina (▶) ile çevrili dejeneratif tübüllerde PAS (+) kep aşamasında olan erken spermatidler (→) ile tam olarak çengel şeklini alamamış ve sitoplazmasından kurtulamamış geç spermatidlerin (\*) varlığı gözlenmektedir. PAS+HL, X400



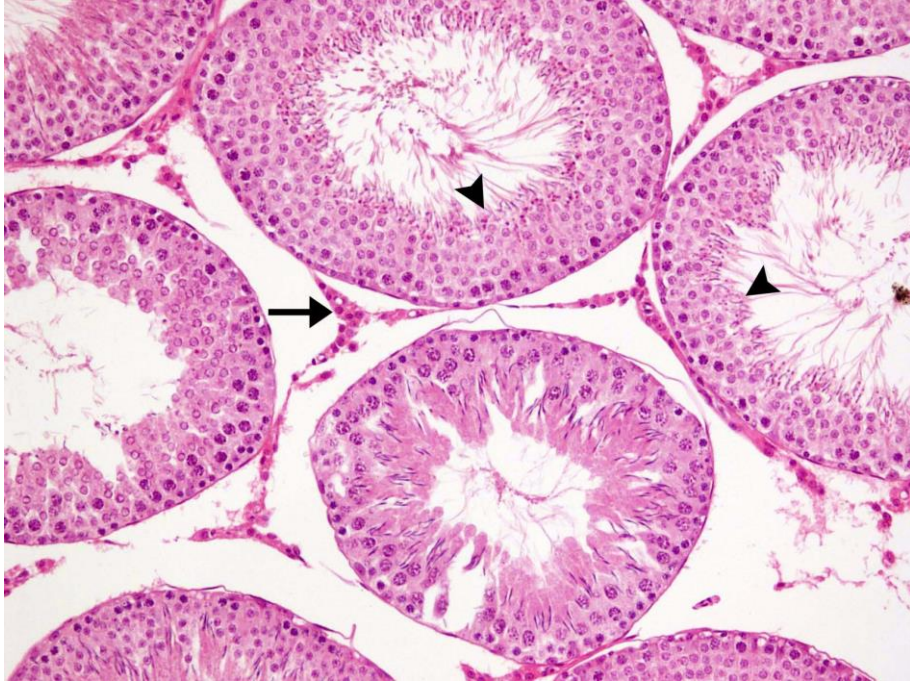


**Şekil 25.** L-karnitin tedavili grubun erişkin testisinde, farklı aşamada spermatogenezin izlendiği, lümenleri genellikle sperm ile dolu seminifer tübüller (▶) ve aradaki interstisyel alanlar (→) görülmektedir. H+E, X40

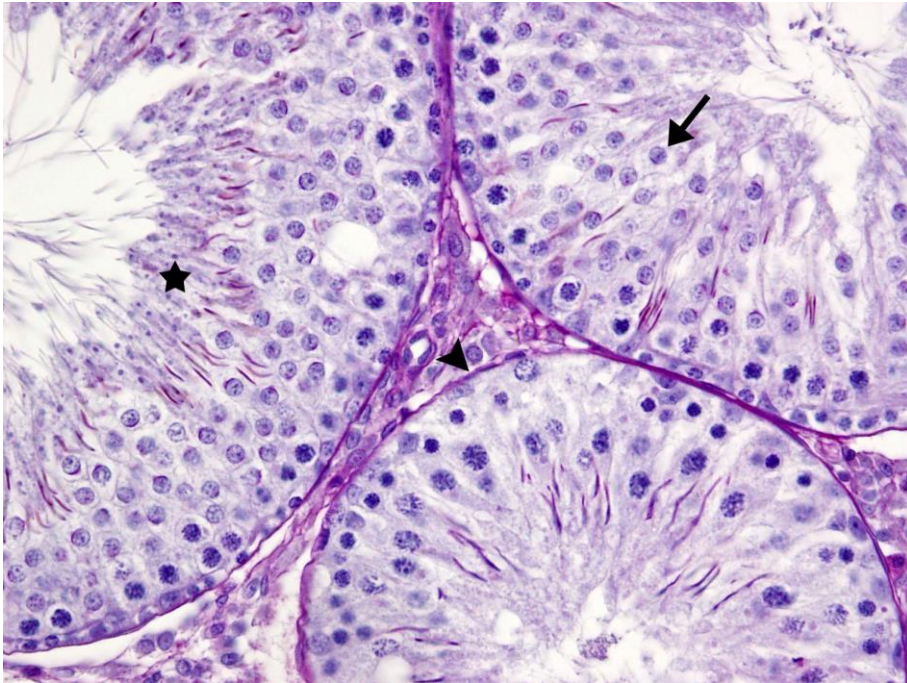


**Şekil 26.** L-karnitin tedavili erişkin testisin aktif spermatogenezin izlendiği seminifer tübüllerinde, ayrılma ve dökülmelerin oldukça azaldığı (→) ve aralarında kısmen düzenli yapıya sahip interstisyel alanlar (▶) dikkati çekmektedir. H+E, X100



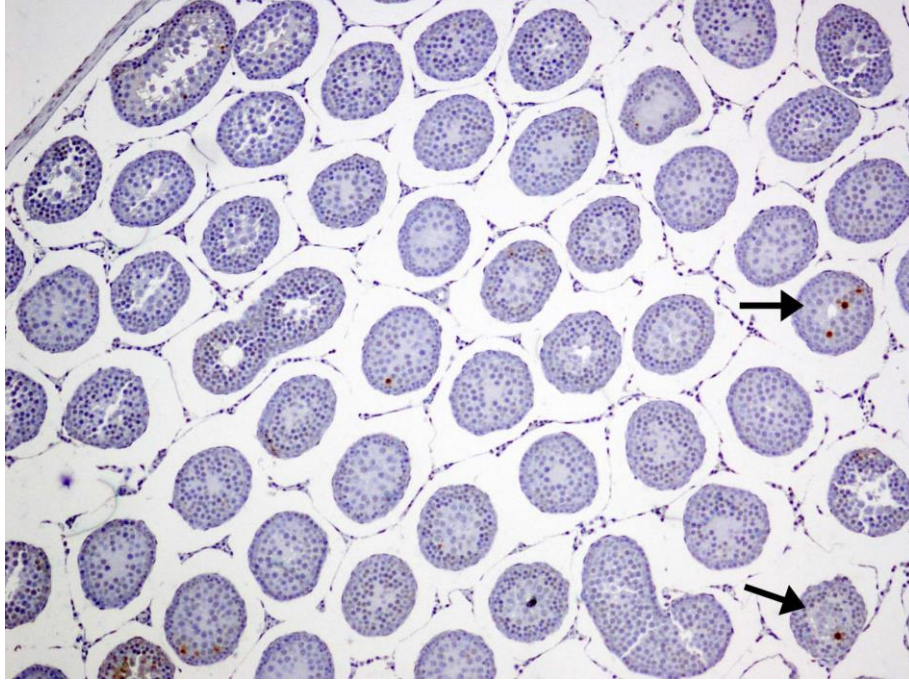


Şekil 27. L-karnitin tedavili erişkin sıçanların seminifer tübül duvarında, düzenli dağılım gösteren germinal hücreler ile birlikte lümeneye yakın yerleşimli geç spermatidler (►) baş ve kuyruk kısımları ile ayırt edilmektedir. İnterstisyel alan (→). H+E, X200

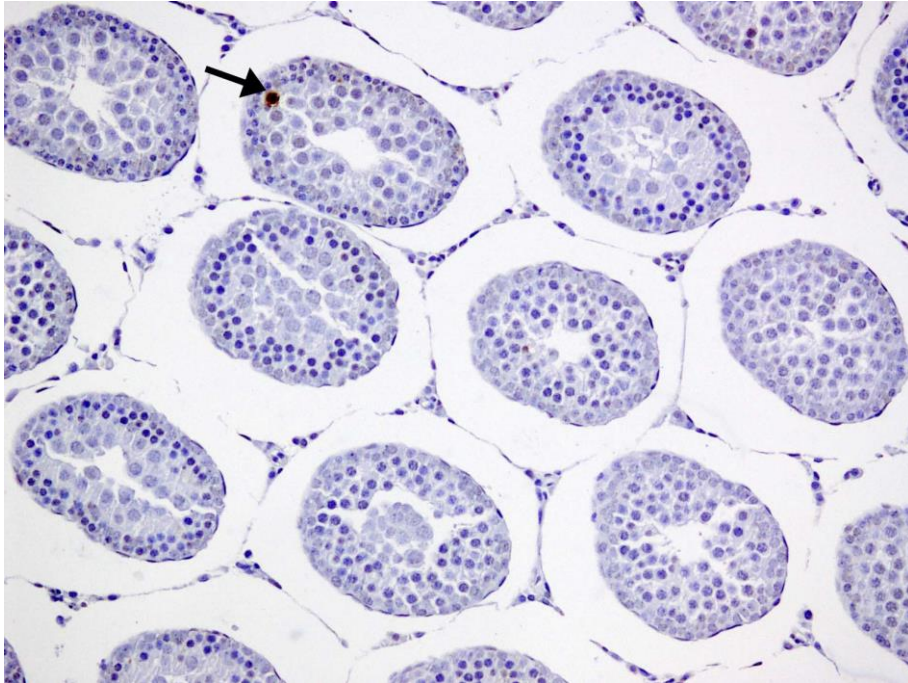


Şekil 28. L-karnitin tedavili erişkin testisinde, spermatogenezin aktif olduğu ve ince bazal lamina (►) ile çevrili seminifer tübüllerinde, PAS (+) akrozom yapıları erken (→) ve geç dönem spermatidleri (\*) izlenmektedir. PAS+HL, X400



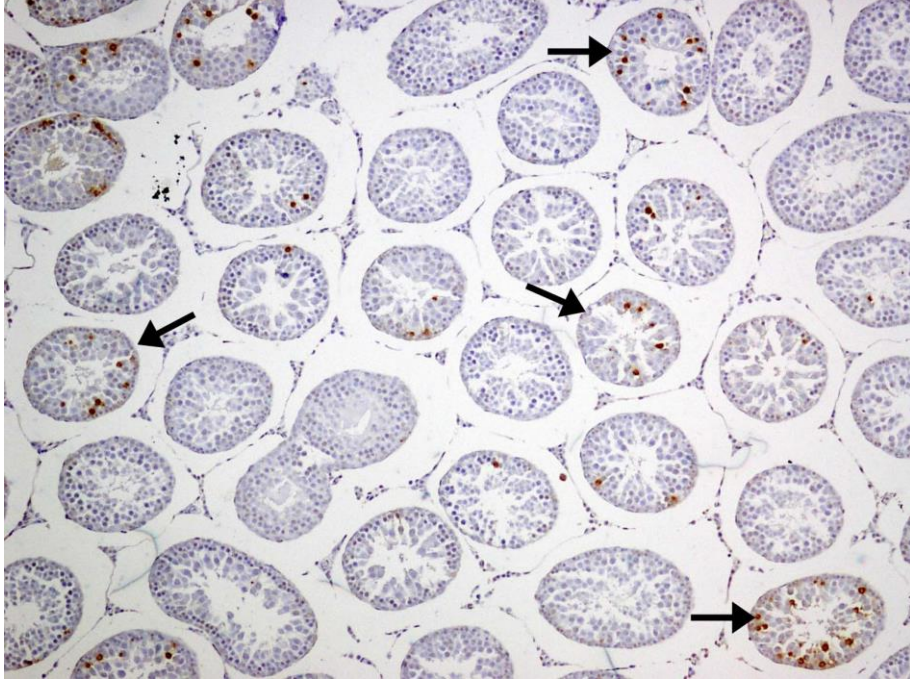


**Şekil 29.** Deneyin 1. gününe ait kontrol grubu prepubertal sıçan testisinde, germinal epitelinde çok az sayıda TUNEL (+) apoptotik hücre içeren birkaç seminifer tübül (→) gözlenmektedir. TUNEL, X100

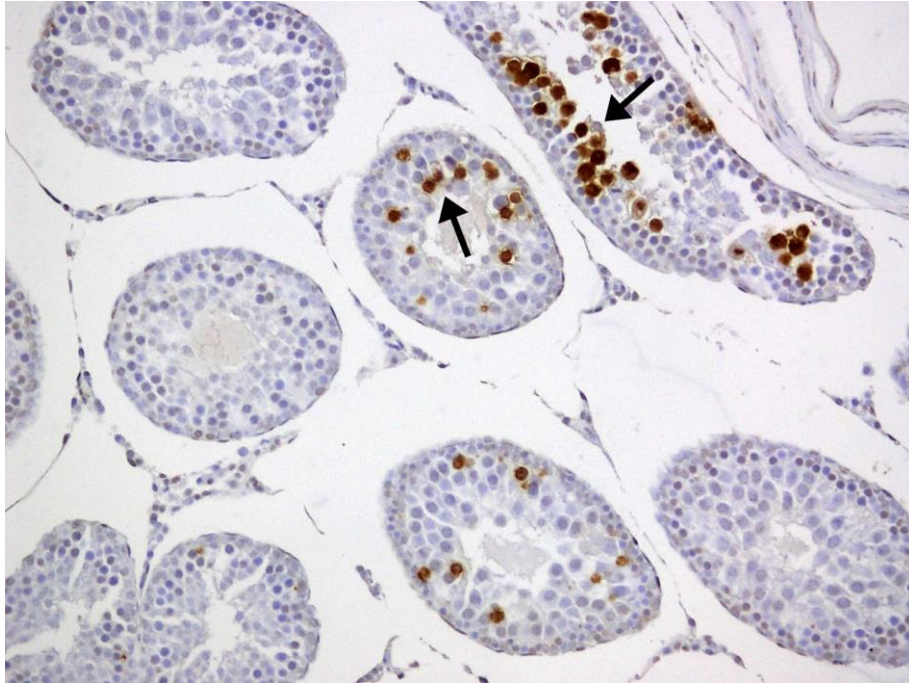


**Şekil 30.** Kontrol grubu prepubertal sıçanların seminifer tübül epitelinde yer alan, koyu kahverengi boyanmış TUNEL (+) apoptotik hücrelerin genellikle primer spermatositler (→) olduğu dikkat çekmektedir. TUNEL, X200

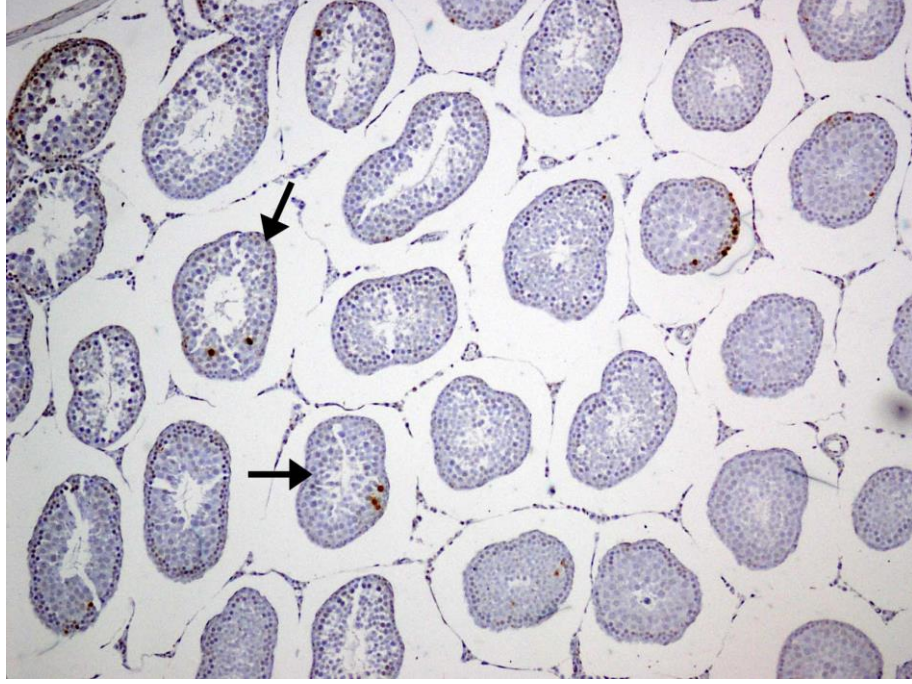




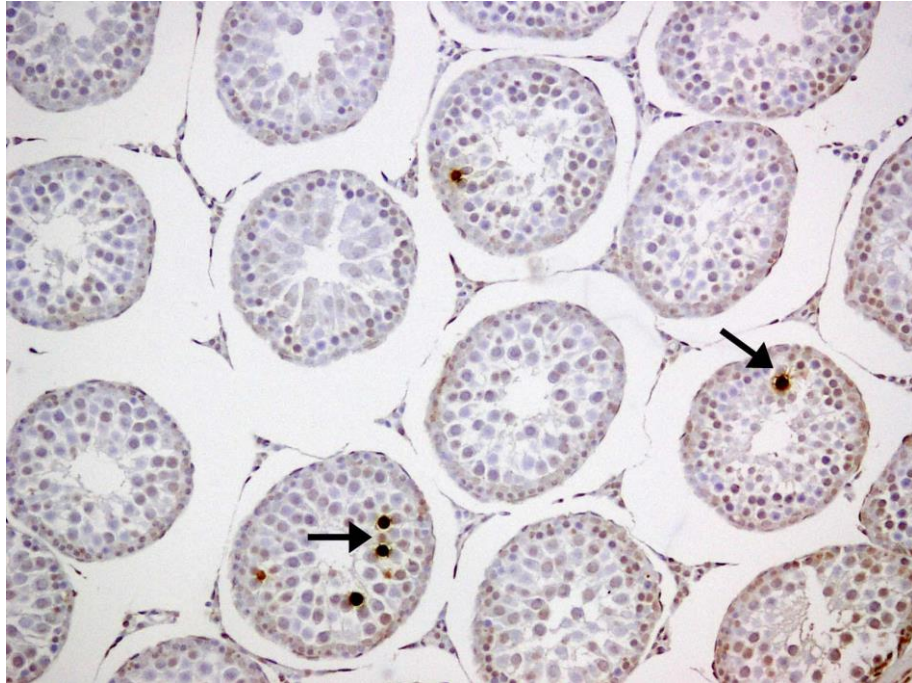
Şekil 31. Cisplatin grubuna ait prepubertal sıçan testisinde, çok sayıda seminifer tübülün genellikle üç veya daha fazla sayıda TUNEL (+) hücre (→) içerdiği görülmektedir. TUNEL, X100



Şekil 32. Cisplatin grubuna ait prepubertal testisin seminifer tübül epitelinde, çoğunluğunu primer spermatositlerin (→) oluşturduğu çok sayıda apoptotik hücre izlenmektedir. TUNEL, X200

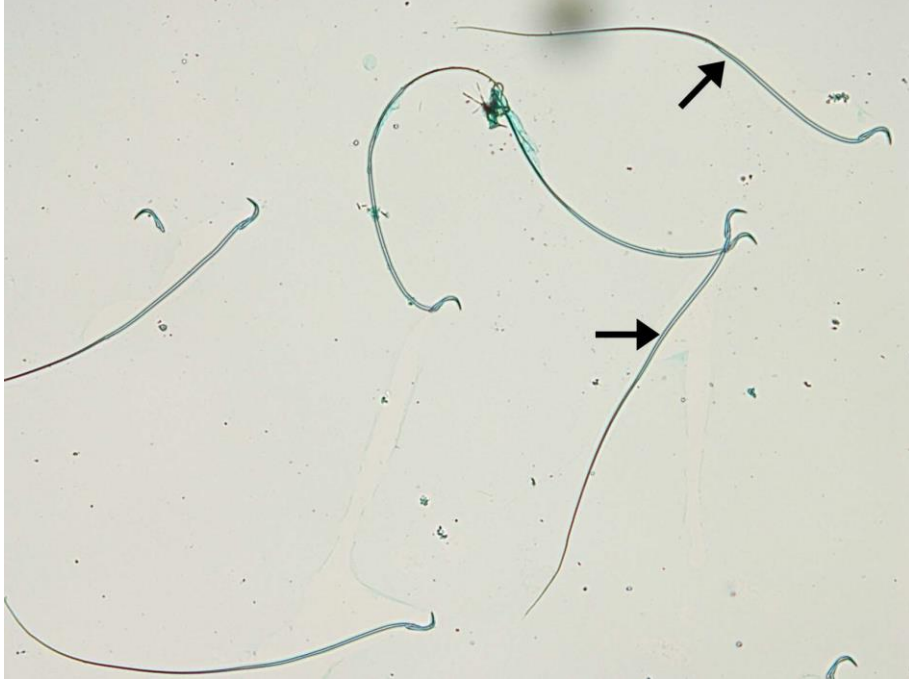


**Şekil 33.** L-karnitin tedavili gruba ait prepubertal sıçan testisinde, apoptozisin izlenmediği tübüllerin arasında, germinal epitelinde TUNEL (+) hücre içeren birkaç seminifer tübül dikkati çekmektedir. TUNEL, X100

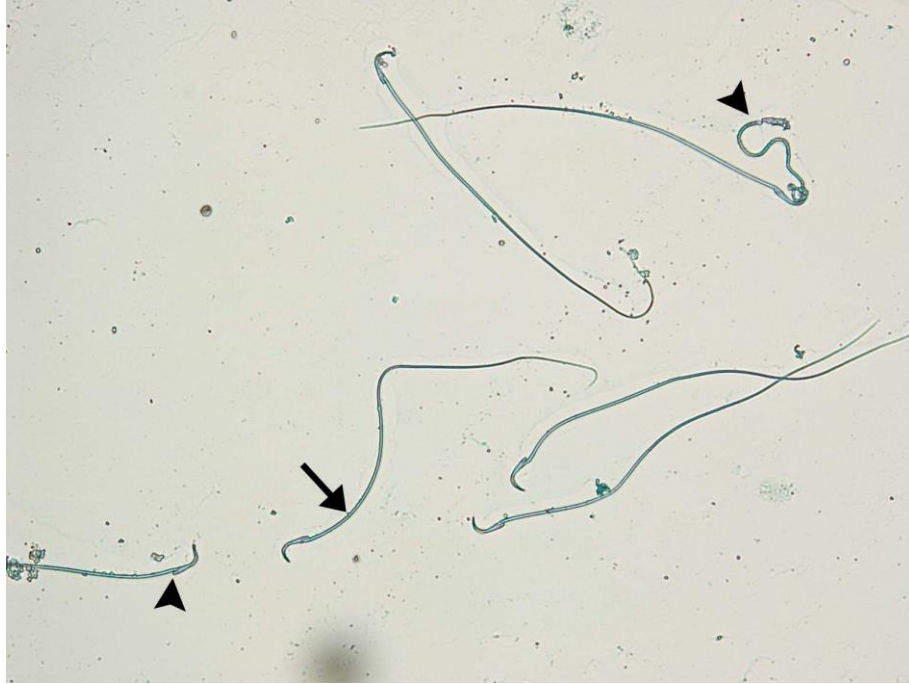


**Şekil 34.** L-karnitin tedavili prepubertal testis kesitinde, düzenli organizasyona sahip germinal epitel içerisinde koyu kahverengi boyanmış apoptotik primer spermatositler (→) gözlenmektedir. TUNEL, X200





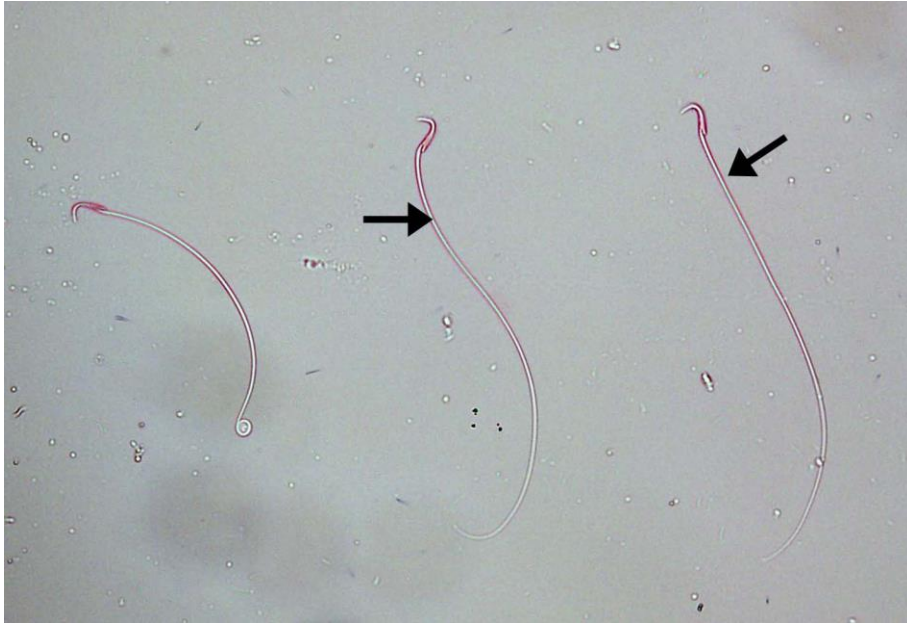
**Şekil 35. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm (→) gözlenmektedir. Spermac boyası, X400**



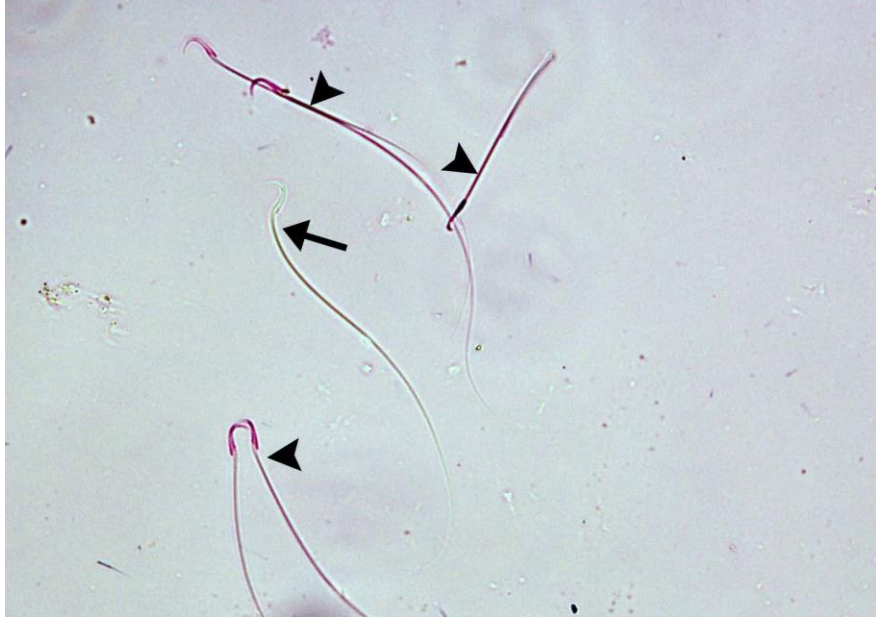
**Şekil 36. Cisplatin grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm (→) yanı sıra, baş-boyun anomalili sperm (▶) varlığı dikkati çekmektedir. Spermac boyası, X400**



**Şekil 37. L-karnitin tedavili grupta spermilerin çoğunlukla normal morfolojide olduğu görülmektedir. Spermac boyası, X400**



**Şekil 38. Kontrol grubuna ait, baş kısımlarının şeffaf boyanması ile ayırt edilen canlı spermeler (→) görülmektedir. Eosin-nigrosin boyası, X400**



**Şekil 39.** Cisplatin grubunda canlı spermlerin (→) yanı sıra, koyu pembe boyanmış başları ile izlenen çok sayıda ölü spermin (►) varlığı dikkati çekmektedir. Eosin-nigrosin boyası, X400



**Şekil 40.** L-karnitin tedavili grupta farklı boyanma özelliği gösteren ölü (►) ve canlı (→) spermler gözlenmektedir. Eosin-nigrosin boyası, X400

## TARTIŞMA

Kanser tedavisinde kemoterapötik ilaç kullanımının, tümör hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını durdurarak tamamen yok ettiği, bununla birlikte normal hücreler üzerinde de hasara neden olduğu bilinmektedir (1).

Kemoterapötikler, hızlı proliferasyon ve farklılaşma yeteneğindeki sağlıklı hücreler üzerinde yan etkiye sahip olduklarından, sitotoksik kemoterapi doğrudan germ hücrelerinde mutasyonlar, hormonal değişiklikler ile birlikte teratojenik etkiye de sebep olmaktadır. Bu hasarların derecesi ilacın uygulama şekline, dozuna ve hastanın yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (7,81).

Cisplatin, insanlarda baş-boyun, akciğer, testis, ovaryum ve meme kanseri gibi erişkin dönem tümörlerinin yanı sıra, Wilms tümörü gibi çocukluk çağı tümörlerinin de tedavisinde başarı ile kullanılan önemli bir antineoplastik ajandır (38,39). Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ilacın sitotoksik aktivitesini nükleer DNA'ya bağlanarak, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozmak, mitokondriyal disfonksiyon aracılığı ile oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu tetiklemek suretiyle sağladığı düşünülmektedir (40).

Gonadları en çok baskılayan kemoterapötiklerden biri olan cisplatinin, B tipi spermatogonyum, spermatozoid ve spermatidler gibi proliferasyon ve farklılaşma gösteren hücreler üzerine etki ederek, kalıcı hasara yol açmak suretiyle infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (7,81). Cisplatin veya cisplatin bazlı kombine kemoterapi, hastaların hemen hepsinde akut azospermiye neden olmaktadır (82). Bu hastaların yaklaşık yarısında, tedaviden sonraki 6 ay-5 yıl arasında sperm sayısının normale döndüğü, buna karşın %30'unda azosperminin kalıcı olduğu görülmektedir (11). İnsanlarda spermatogenez hasarı, cisplatinin

dozu ile ilişkili olup, 600 mg/m<sup>2</sup> den yüksek dozlar kalıcı azospermi riskini arttırırken, 400 mg/m<sup>2</sup> den düşük dozlar ise geçici olarak sperm üretimini baskılamaktadır (10).

Günümüzde kemoterapi sonrası, hastaların sağ kalım oranlarındaki artış ile birlikte tedaviden sonra çocuk sahibi olmak isteyen genç erişkinlerde, fertilitenin korunabilmesi için koruyucu metodların geliştirilmesi önemli hale gelmiştir. Kemoterapötik ilaç kullanımına bağlı erkek infertilitesinde, oksidatif stresin öneminin ortaya konmasıyla, kemoterapi kaynaklı infertilitenin tedavisinde antioksidanların rolü değerlendirilmeye başlanmıştır (44,83).

L-karnitin, antioksidatif ve serbest radikal süpürücü etkisiyle, hücre DNA'sını ve hücre membranlarını serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasara karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (83). Erkek üreme sistemi üzerindeki etkisi tam olarak açıklanamamakla birlikte, erkek infertilitesinde tedavi edici ve koruyucu rolü olduğu bilinmektedir (64,65).

Bu çalışmada, prepubertal dönemde tek doz 5 mg/kg cisplatin maruziyeti sonrası, prepubertal sıçan testis dokusunda meydana gelen hasarlar ve germ hücre apoptozisi ile erişkin dönem sperm parametreleri üzerine, L-karnitin tedavisinin koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Yapılan deneysel çalışmalarda, cisplatinin testis, epididim, seminal bez, prostat ağırlığında, sperm sayısı, motilitesi ve normal morfolojili sperm sayısında azalma, seminifer tübül çaplarında daralma, testiküler dokuda dejenerasyon, nekroz, ödem gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmektedir (84). Bunun yanında cisplatinin, DNA kırılmalarına yol açmak suretiyle apoptotik germ hücre sayısında artışa (85), Leydig hücre membranında meydana getirdiği deformasyonlar nedeniyle fonksiyon kaybına, dolayısı ile serum testosteron seviyelerinde azalmaya (86), bununla birlikte, Sertoli hücrelerinde de bir takım morfolojik hasara neden olduğu gösterilmiştir (86,87).

Çalışmamızda, prepubertal dönemde cisplatin maruziyetinin, testisler üzerindeki gonadotoksik etkisini ortaya koymak amacıyla hem prepubertal hem de erişkin dönemde deneklerin testis ağırlıkları ile testis/vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde, cisplatin grubuna ait prepubertal deneklerin testis ağırlıkları ve vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış olduğu, ancak testis/vücut ağırlıklarının değişmediği belirlenmiştir. Testis ağırlıklarındaki bu artış, cisplatin maruziyetinin testis dokusunda meydana getirdiği ödem ile ilişkilendirilmiştir. Erişkin dönemde ise, tüm gruplarda gelişime bağlı olarak testis ve vücut ağırlıklarında prepuberteye oranla artış gözlenirken, gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. Lirdi ve ark. prepubertal dönemde cisplatin maruziyetinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, cisplatin grubu ile diğer gruplar arasında, testis ağırlıkları açısından anlamlı bir farkın olmadığını bildirmişlerdir (18). Bir diğer çalışmada ise, cisplatin grubuna ait prepubertal deneklerin

mutlak testis ağırlıklarında diğer gruplara kıyasla bir fark gözlenmezken, bağıl testis ağırlıklarında (testis ağırlığı/vücut ağırlığı) anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ancak bu artışın vücut ağırlığındaki genel ağırlık kaybı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (88). Prepubertal dönemde cisplatin maruziyetinin, erişkin dönem üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada da, erişkin dönemde gruplar arasında bir fark olmadığı görülmüştür (88). Türk ve ark.'ları erişkin dönem cisplatine maruziyet sonrasında tespit ettikleri, testis ağırlığındaki azalmanın, cisplatinin neden olduğu parankimal atrofi ve seminifer epitel incilmesi gibi histolojik hasarlara bağlı olduğunu açıklamışlardır (89). Ancak bir diğer çalışmada, erişkin dönemde cisplatin uygulamasının testis ağırlıklarında anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (90). Çalışmamızda, erişkin dönem testis ağırlıklarında gruplar arasında fark olmamasının, cisplatine maruziyetin prepubertal dönemde olması ve gelişimle birlikte meydana gelen hasarların büyük ölçüde tolere edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Prepubertal dönemde cisplatin grubuna ait deneklerin vücut ağırlıklarında ortaya çıkan artışın ise, beklenen bir durum olmadığı, bu artışın grupların oluşturulması sırasında vücut ağırlığı fazla olan deneklerin cisplatin grubuna rastgelmesi ile ortaya çıktığı düşünüldü. Erişkin dönemde ise vücut ağırlığı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Benzer şekilde dizayn edilmiş bir çalışmada, cisplatin maruziyeti sonrası, prepubertal dönemde vücut ağırlığında azalma gözlenirken, erişkin döneme ulaşan deneklerde bizim çalışmamızda olduğu gibi anlamlı farkın olmadığı tespit edilmiştir (88).

Cisplatin kullanımı sonrası, endotelial tabakadaki bozulmanın direkt bir sonucu olarak, interstisyuma geçen sıvı miktarındaki artış sebebiyle ortaya çıkan interstisyel ödem, bir diğer testiküler hasardır. Testiküler interstisyel sıvı hacmindeki artışın, özellikle testosteron düzeylerindeki değişikliklere ve toksik maruziyete bağlı olduğu bildirilmiştir (91).

Prepubertal dönemde cisplatin uygulamasının, seminifer tübül çapında azalma, interstisyel alanda ise ödeme bağlı olarak artışa neden olduğu bildirilmiştir (18). Başka bir çalışmada ise, 3 hafta boyunca haftada 5 gün olmak üzere, günde 1 mg/kg cisplatin uygulamasına maruz kalan prepubertal deneklerin, tübül çaplarında azalma olduğu bildirilirken, interstisyel alanlar değerlendirilmemiştir (88). Çalışmamızda, prepubertal dönemde seminifer tübül çaplarında değişme gözlenmezken, interstisyel alanlarda Lirdi ve ark.'larının çalışması ile uyumlu olarak artış izlenmiştir (18). Erişkin dönemde prepubertal döneme kıyasla, gelişime bağlı olarak tüm grupların tübül çapları artmıştır. Diğer gruplara kıyasla cisplatin grubunda gözlenen seminifer tübül çaplarında azalma ile interstisyel alanlardaki artış, çok düşük standart sapma nedeni ile istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Favareto ve ark.'nın çalışmasında, prepubertal dönemde cisplatine maruz kalan



sıçanların erişkin dönemde testis tübül çaplarında gelişime bağlı olarak artış gözlenirken, cisplatin grubuyla diğer gruplar arasında belirgin bir farkın olmadığı bildirilmiştir (88).

Sıçanlarda; prepuberte, puberte ve erişkin dönemde gelişime bağlı olarak testislerde meydana gelen değişikliklerin incelendiği bir çalışmada, tunika albugineanın prepuberte döneminde ince, puberte ve erişkin dönemlerde ise kalın ve fibröz bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Leydig hücre sayısının ise prepuberteden başlayarak puberte ve erişkin dönemlerde giderek arttığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada prepuberte döneminde dar ve ince yapıda izlenen seminifer tübüllerin epitelinde, Sertoli hücrelerinin arasında, tek veya çift tabaka spermatogonyumların yanı sıra, farklı mitotik aktivitedeki spermatozoidler ile lümene yakın yerleşimli az sayıda spermatozoid rastlanıldığı ifade edilmiştir. Puberte döneminde ise, spermatogenezin başlamasıyla tübül duvarının giderek kalınlaştığı ve tüm spermatogonik hücreler ile birlikte spermatozoidlerin kolaylıkla izlendiği bildirilmiştir (28). Cisplatin maruziyetinin, prepubertal ve erişkin sıçan testisinde meydana getirdiği değişiklikleri incelediğimiz bu çalışmada, gelişim ile birlikte fonksiyona bağlı olarak testislerde gözlenen değişikliklerin yanı sıra, cisplatinin yol açtığı hasarlar da tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, cisplatin maruziyet sonucunda Sertoli hücrelerinin, yıldız şeklini alarak büzüştükleri, komşu hücrelerden ve bazal membrandan ayrılmaları sonucunda hücreler arası boşlukların arttığı bildirilmiştir. Cisplatinin neden olduğu bu değişikliklerin, Sertoli hücreleri arasındaki zonula okludens tipi bağlantı komplekslerini etkileyerek, kan-testis bariyerinin bozulmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Spermatogenez sürecinde, Sertoli hücrelerinin endoplazmik retikulumu ve miyofibril yapılarının kasılıp gevşemesi ile pasif olarak bazalden lümene ilerleyen germ hücrelerinin, cisplatin kaynaklı Sertoli hücre membran deformasyonlarından dolayı, olgunlaşmadan kontrolsüz olarak lümene döküldüğü gösterilmiştir (86,87).

Lirdi ve ark.'ları, 30 günlük sıçanlarda cisplatin maruziyeti sonucu, seminifer epitelde yer alan germ hücrelerinde dejenerasyon ile birlikte lümen hücresel dökülmeler olduğunu, peritübüler dokuda yer alan hücrelerin ise anormal nükleer morfolojiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (18). Benzer bir çalışmada, cisplatin uygulamasının, testislerde hücre kayıplarına ve dökülmelere neden olduğu, aynı zamanda germ hücrelerinin olgunlaşmadan lümene atıldığı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada, seminifer epitelin az sayıda germ hücre içerdiği, eozinofilik ve piknotik nükleusa sahip Sertoli hücrelerinin ise vakuolize bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (88).

Çalışmamızın 24. saatinde, diğer çalışmalarla benzer olarak, prepubertal dönemde cisplatin maruz kalan deneklere ait ince tunika albuginea ile çevrili testis kesitlerinde, farklı

çap ve şekillerde dejeneratif tübüller izlendi. İnterstisyel alanda ödemle birlikte yer yer seminifer tübüllerin birbirinden uzaklaştığı, tübül duvarında yer alan germinal hücrelerin birbirinden ayrıldıkları, germinal hücre kayıpları ile seminifer epitelde yer yer boşlukların oluştuğu tespit edildi. Bazı tübüllerde primer spermatositlerin epitelde ayrıldığı ve olgunlaşmamış germ hücrelerinin lümenine atıldığı gözlemlendi.

Erişkin dönemde cisplatin uygulamasına bağlı testiküler hasarların incelendiği birçok çalışmada tespit edilen, germinal epitelde deskuamasyon sonucu tübül lümeninde germ hücre döküntüleri, germ hücre kaybı, interstisyel alanda ödemin varlığı çalışmamızın erişkin dönem bulgularını destekler niteliktedir (84,92,93). Favareto ve ark. prepubertal dönemdeki hasarların erişkin dönemde kısmen düzeldiğini, fakat tam olarak bir iyileşme sağlanmadığını bildirmişlerdir (88). Bu çalışmayla benzer olarak, prepubertal dönemde tek doz cisplatin uyguladığımız erişkin deneklere ait testis kesitlerinde, cisplatinin prepubertal dönemdeki etkisinin erişkin döneme de yansıdığı, ancak prepubertal döneme kıyasla bu hasarların erişkinde azaldığı görüldü.

Testislerde, germ hücre gelişimi sırasında, homeostazisin sağlanması ve hasarlı germ hücrelerinin elimine edilmesi amacıyla spontan olarak apoptoz gerçekleşmektedir. Ayrıca, kemoterapi, radyoterapi ve bir takım hormon uygulamaları da apoptoza neden olan dış etmenlerin başında gelmektedir (94). Lirdi ve ark. 30 günlük erkek ratlara cisplatin uygulamasının neden olduğu germ hücre apoptozisinin belirlenmesi amacı ile uygulanan TUNEL yöntemi sonucunda, cisplatin grubunda TUNEL (+) hücre sayısının kontrol ve tedavi grubuna kıyasla artmış olduğunu gözlemlemişlerdir (18). Başka bir çalışmada, cisplatin uygulaması sonrasında, doza bağlı olarak germ hücrelerinde apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (95). Cisplatin hasarının neden olduğu hücre ölümü üzerinde, bitki özlerinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, cisplatinin TUNEL (+) germ hücre sayısında büyük ölçüde artışa sebep olduğu bildirilmiştir (85). Cisplatinle bağlı olarak gelişen testiküler morfolojik hasar ve sperm üretiminde azalma, ilacın germ hücrelerinde apoptoza neden olduğunu doğrulamaktadır (96). Germ hücre apoptozunun infertilite üzerine etkisinin değerlendirildiği hastalarda, artmış seminifer tübül apoptozisi ile infertilite arasında pozitif korelasyonun olduğu bildirilmiştir (97).

Cisplatin gibi sitotoksik ilaçların, memelilerde seminifer tübüllerde hücre ölümüne neden olarak spermatogenez baskılandığı bilinmektedir (84). Genel olarak, kemoterapötik ilaçların hızlı bölünen hücreler üzerine etki etmeleri nedeniyle, bu ilaçların kullanımı sonrasında hastalarda, spermatogenezde hasar ve dolayısıyla sperm sayısında azalma meydana gelmektedir (98). Spermatogenez hasarının, uygulanan cisplatin dozu ile ilişkili

olduğu bilinmektedir. Yüksek doz cisplatin uygulaması, kalıcı azospermi riskini arttırırken, daha düşük dozlar geçici olarak sperm üretiminin baskılanmasına ve sonuç olarak sperm parametreleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (10). Yapılan çalışmalarda, uygulanan cisplatin dozuna bağlı olarak spermatogenezdeki aksaklıkların arttığı, sperm sayısının ise artan doz ile birlikte giderek azaldığı bildirilmiştir (92,98).

Yapılan birçok çalışmada, erişkin dönem cisplatin uygulaması sonrasında, sperm sayısı ve hareketinde azalma saptanırken, anormal morfolojiye sahip sperm sayısının ise arttığı gözlenmiştir (84,89,93,99). Ayrıca, Rezvanfar ve ark. cisplatinin canlı sperm oranında da azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (93). Buna karşın cisplatin maruziyetinin erişkin deneklerin sperm sayı ve morfolojisi üzerine etki etmediği, ancak sperm hareketliliğini olumsuz yönde etkilediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (90). Bununla birlikte, prepubertal dönem cisplatine maruziyetin, erişkin dönem sperm kalitesi üzerine etkilerini inceleyen çok az sayıda çalışma mevcuttur. Favareto ve ark. 45 günlük prepubertal dönemde, 3 hafta boyunca haftada 5 gün olmak üzere, günde 1mg/kg cisplatin uygulanan deneklerin, erişkin dönem sperm parametreleri üzerinde kontrol grubuna kıyasla farklılığın olmadığını, geçen süre içerisinde testis dokusunun yenilenerek sperm parametreleri üzerinde gözle görülür bir iyileşmenin olduğunu bildirmişlerdir (88).

Çalışmamızda, deneyin 60. günü sakrifiye edilen erişkin deneklerin, epididimal sperm değerlendirmelerinde, prepubertal dönemde (30 günlük) tek doz 5 mg/kg cisplatine maruziyetin sperm sayı, hareketi ve canlı sperm oranında azalmaya, anormal morfolojili sperm oranında artışa yol açtığı belirlendi. Bu sonuçlar, prepubertal dönemde maruz kalınan cisplatinin, testislerde apoptotik germ hücre sayısında artışa neden olmak suretiyle spermatogenezin ileriki evrelerinde, sperm üretimi ve kalitesini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Ayrıca erişkin dönemde sakrifiye edilen deneklerin total testosteron seviyeleri ölçüldüğünde, prepubertal dönemde tek doz cisplatin uygulamasının, sperm parametreleri üzerindeki olumsuz etkilerini destekler nitelikte erişkin dönem testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüşe neden olduğu gözlemlendi.

Cisplatinin testisin morfolojik yapısında meydana getirdiği değişiklikler ile hormon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, tek doz (5 mg/kg) cisplatin uygulamasının, erişkin sıçanlarda 3. ve 21. günlerde, testiküler hasarlar ile birlikte serum testosteron düzeyinde de belirgin bir düşmeye neden olduğu gösterilmiştir (86). Araştırmacılar, cisplatinin Leydig hücre disfonksiyonu aracılığı ile serum testosteron düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (90,93). Maines ve ark. cisplatin maruziyetinin erişkin sıçanlarda yol açtığı serum testosteron düzeyindeki azalmanın,

Leydig hücre LH reseptör sayısındaki azalmaya bağlı olduğunu ve gonadotropin-salgılatıcı hormon (GnRH) uygulaması ile bu etkinin geri dönebildiğini göstermiştir. Cisplatinin steroidogenez üzerindeki bu etkisinin GnRH ile tedavisinde, hormonun hipofizden LH salınımı aracılığı ile, geride kalan Leydig hücre LH reseptörlerinin tam kapasiteyle doyurulmasını indüklemek suretiyle meydana getirdiği sonucuna varılmıştır (100). Yine aynı araştırmacılar, cisplatine bağlı serum testosteron düşüklüğünün, LH reseptörleri ve sitokrom P-450 bağımlı steroid biyosentezinin baskılanmasıyla ilgili olduğunu gösteren bir diğer çalışmaları ile bu görüşü desteklemiştir (101). Azouri ve ark.'da, Leydig hücrelerinde mikrozomal P-450 konsantrasyonundaki azalmanın, serum testosteron düzeylerindeki azalmaya eşlik ettiğini bildirmişlerdir (102). Bunların yanısıra Leydig hücrelerinde, cisplatinin neden olduğu membran deformasyonuna bağlı fonksiyon bozukluğu neticesinde LH seviyelerinde artışla birlikte testosteron düzeyinin düştüğü bildirilmiştir (103). Çalışmamızda, 30 günlük prepubertal sıçanlara uyguladığımız cisplatinin, erişkin dönem testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmaya neden olmuştur. Bu azalmanın, cisplatin maruziyeti esnasında (prepubertal), aktif proliferasyon ve gelişim süreci içerisinde olan, steroidogenik organel yapısı ve enzim aktivitesine sahip genç Leydig hücrelerinde, ilacın yol açtığı toksik etkinin yanı sıra plazma zarında ortaya çıkan lipid peroksidasyon aracılığı ile oluşan deformasyonların LH reseptörlerinde meydana getirdiği etki nedeniyle meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Oksidatif stresin, erkek germ hücre serisinde nükleus ve mitokondriyonlarda fonksiyon kaybına, bunun sonucu olarak da spermatozoada hasara neden olduğu bilinmektedir. Sperm patofizyolojisinde önemli rol oynayan ROS, erkek infertilitesine neden olan faktörler arasında ön sırada yer alır. İnfertil erkeklerin seminal sıvılarında, fertil erkeklere göre daha yüksek seviyelerde ROS bulunduğu bilinmektedir. Seminal plazmada yüksek oranda SOD ve CAT gibi enzimler ile birlikte, tokoferol, askorbik asit ve karnitin gibi antioksidan maddeler bulunmaktadır (104). L-karnitinin, antioksidan ve radikal süpürücü etkisi ile oksidatif stres kaynaklı erkek infertilitesinin tedavisinde faydalı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (83).

Enflamasyon ve oksidatif stresin sperm motilitesi ve vitalitesi üzerinde negatif etkisinin olduğu ve bu etkilerin L-karnitin tedavisi ile en aza indirildiği gösterilmiştir (105). Kadmiyum toksisitesinin neden olduğu spermatogenez hasarına karşı karnitinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, karnitin uygulanan grupta testis histolojisinde iyileşme ile birlikte sperm konsantrasyon ve vitalite oranlarında da artış görülmüştür (106). Gamma radyasyonunun neden olduğu testiküler disfonksiyon üzerinde de L-karnitinin koruyucu etkisi

olduğu, radyasyon uygulaması ile birlikte L-karnitin kullanımının sperm morfolojisinde düzelmeye neden olurken, histolojik yapıda meydana gelen hasarları da büyük ölçüde engellediği bildirilmiştir (107). Benzer olarak Topcu-Tarladacalisir ve ark.'da, sıçanlarda gamma radyasyon aracılı seminifer tübül hasarına karşı L-karnitinin koruyucu etkisini ışık ve elektron mikroskopik düzeyde göstermiş ve bu ajanın spermatogenik iyileşmeyi hızlandırdığını bildirmişlerdir (16). Adı geçen araştırmacılar bir diğer çalışmalarında da, bu etkinin L-karnitinin germ hücre apoptozisini önlemek suretiyle gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir (17). Amendola ve ark. farklı iki çalışmalarında, L-karnitin ön tedavisi ile spermatogenik sürecin erken aşamasında başlıca spermatogonial hücreleri etkilemek suretiyle gamma ışınlama (108) ve hiperterminin (109) ardından seminifer epitelin daha hızlı bir şekilde yenilendiğini göstermişlerdir. L-karnitinin bu etkiyi, yüksek metabolik aktivite gerektiren bu süreçte hücrelerin enerji ihtiyacını sağlayan serbest asetil grupları içermesi ile gerçekleştirdiği vurgulamışlardır (108,109). Ayrıca infertil hastaların seminal sıvı örneklerinde, L-karnitin miktarının azaldığı ve L-karnitin tedavisinin ardından, sperm motilitesi ve canlılığının, aynı zamanda spontan gebelik oranlarının da arttığı bildirilmiştir (63,110).

Çalışmamızda, L-karnitin tedavisinin, prepubertal ve erişkin dönemde, cisplatinin neden olduğu seminifer tübül hasarları ve interstisyel ödemi önemli oranda engellediği, germ hücre apoptozunu anlamlı ölçüde azalttığı gözlenirken, serum testosteron seviyeleri üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi. Ayrıca L-karnitin tedavisi ile sperm sayısı, canlı sperm yüzdesi ve normal morfolojili sperm oranında bir iyileşme sağlanırken, sperm hareketi üzerinde koruyucu bir etkisi olmadığı gözlemlendi. L-karnitin uygulamasının prepubertal dönemde yapılması nedeniyle, karnitinin bu dönemde testiste bulunan germ hücreleri üzerine etki ederek, hücrelerin normal gelişimini desteklediği, o dönemde epididimde sperm bulunmadığından hareketlilik üzerine etkisinin olmadığı düşünüldü. Çalışmamızla benzer olarak, cisplatinin erişkin sıçan testisinde meydana getirdiği gonadotoksisitede L-karnitinin koruyucu etkisini inceleyen Coşkun ve ark.'da, L-karnitin uygulanan deneklerde testisin histolojik yapısının iyileştiğini, TUNEL (+) germ hücre sayısının azaldığını ve sperm morfolojisinin düzeldiğini bildirmişlerdir (5).

L-karnitinin antiapoptotik etkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (17,62,111). Erkek üreme sistemi içerisinde bulunan endojen bir madde olan L-karnitin, hücre membranını kolayca geçerek uzun zincirli yağ asitlerinin iç mitokondriyon zarından geçişini sağlayarak enerji metabolizmasında rol oynamaktadır (53,60). Bu suretle L-karnitin, oksidatif hasar kaynaklı lipid peroksidasyonu, fosfolipid yıkımı ve sonuçta artmış serbest yağ asidi miktarını

azaltmak suretiyle hücre zarı yapı ve fonksiyonlarını, mitokondriyal disfonksiyonu ve dolayısıyla hücre apoptozunu engellemektedir (61,62,111). Bilindiği üzere apoptozisin mitokondriyal yolağının aktivasyonu, organel disfonksiyonuna bağlı olarak sitokrom C' nin mitokondriyalardan sitoplazmaya geçişi ile gerçekleşmektedir (112).

Sonuç olarak; bu çalışmada prepubertal dönemde cisplatin uygulamasının, testis dokusunda morfolojik değişiklikler, histopatolojik hasarlar ile germ hücre apoptozuna neden olmak suretiyle erişkin dönem sperm parametrelerini olumsuz yönde etkilediği, antioksidan ve antiapoptotik özelliklere sahip L-karnitinine ise, tüm bu parametreler üzerinde kısmen iyileştirici bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Prepubertal dönemde uygulanan cisplatin kemoterapisinin, erişkin dönem etkilerinin ve bunların önlenmesinde L-karnitinine etki mekanizmasının ileri boyutlarda incelenmesinin, çocukluk çağında cisplatin kemoterapisi almak zorunda olan hastaların infertilite tedavisinde büyük ölçüde yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

## SONUÇLAR

Çalışmamızda, prepubertal sıçan testislerinde cisplatin maruziyetinin neden olduğu seminifer tübül hasarı ve erişkin sperm parametreleri üzerine L-karnitinin koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Deney sürecinde yapılan tüm incelemeler sonucunda;

1. Prepubertal dönemde tek doz 5mg/kg cisplatin uygulamasının, prepubertal deneklerin testis ağırlıkları ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranında bir artışa neden olduğu ancak sadece testis ağırlıklarındaki artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi. Erişkin dönemde ise gelişime bağlı olarak tüm gruplarda, vücut ağırlığı ve testis ağırlığında artış gözlenirken, gruplar arasında bu parametreler açısından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

2. Deneyin 1. ve 60. gününde prepubertal ve erişkin dönemdeki deneklere ait seminifer tübül çapları ve interstisyel alanlar ölçüldüğünde, prepubertal dönemde cisplatine maruziyetin, seminifer tübül çaplarını değiştirmedeği ancak, ödeme yol açmak suretiyle interstisyel alanlarda anlamlı oranda genişlemeye neden olduğu, erişkin dönemdeki deneklerin seminifer tübül çaplarının, testiküler gelişime bağlı olarak prepubertal dönemlerindeki kıyasla önemli ölçüde arttığı, bu artışa paralel olarak da interstisyel alanların azaldığı gözlemlendi.

3. Histopatolojik incelemeler sonucunda cisplatin maruziyetinin hem prepubertal hem de erişkin dönemde, testiste gözlenen dökülme, ayrılma ve vakuolizasyonun değerlendirildiği hasar skorunda kontrole kıyasla anlamlı bir artışa neden olduğu görüldü.

4. Tek doz 5 mg/kg cisplatin enjeksiyonunun, 24 saat sonunda deneklerin apoptotik hücre içeren seminifer tübül oranında anlamlı bir artışa neden olduğu görüldü. Bu apoptotik

tübüllerin genellikle 3 veya daha fazla TUNEL (+) hücre içerdiği, 100 tübüldeki toplam apoptotik hücre sayısında kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı tespit edildi.

5. Deneyin 60. günü sakrifiye edilen erişkin deneklerin epididimal sperm örneklerinde, sperm sayısı ile hareketli, canlı ve normal morfolojili sperm yüzdeleri değerlendirildiğinde, prepubertal dönemde cisplatine maruziyetin, deneklerin erişkin dönemdeki sperm sayı ve kalitesini olumsuz yönde etkilediği gözlemlendi.

6. Prepubertal dönemde tek doz cisplatin enjeksiyonunun, erişkin dönem serum testosteron düzeylerini düşürdüğü ancak, bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi.

7. L-karnitin uygulaması ile, cisplatin kaynaklı histopatolojik hasarların ve germ hücre apoptozisinin önemli ölçüde azaldığı, bununla ilişkili olarak sperm parametrelerinin iyileştiği tespit edildi.

Elde ettiğimiz bulgular sonucunda, prepubertal dönemde uygulanan cisplatinin, testis dokusu üzerinde toksik etki yarattığı, histolojik hasarlara ve germ hücre apoptozisine neden olduğu, gelişim ile birlikte bu hasarların bir bölümünün tolere edilmesine karşın, erişkin döneme yansıdığı ve sperm parametrelerini olumsuz etkilediği, güçlü bir antioksidan olan L-karnitinin ise cisplatinin testiste oluşturduğu bu etkileri kısmen önlediği görüldü.

Prepubertal dönemde uygulanan cisplatin kemoterapisinin, erişkin dönem etkilerinin ve bunların önlenmesinde L-karnitinin etki mekanizmasının ileri boyutlarda incelenmesinin, çocukluk çağında cisplatin kemoterapisi almak zorunda olan hastaların infertilite tedavisinde büyük ölçüde yardımcı olacağı kanaatindeyiz.



## ÖZET

Özellikle prepubertal dönemde kemoterapiye maruz kalan çocuk ve genç hastalarda fertilitede kayıp ve geri dönüşümsüz bozukluk görülebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, prepubertal dönemde cisplatine maruz kalan sıçanların testisleri üzerinde L-karnitin muhtemel koruyucu etkilerini ve bu etkinin erişkin dönemdeki sperm kalitesine yansımalarını araştırmaktır.

Çalışmada, prepubertal (30 günlük) 44 adet Wistar albino erkek sıçandan rastgele üç grup; kontrol (n=12), cisplatin (n=16), cisplatin+L-karnitin (n=16) oluşturuldu. Kontrol grubu hariç tüm deneklere tek doz intraperitoneal (i.p) cisplatin (5 mg/kg) uygulandı. L-karnitin tedavili gruba, cisplatin enjeksiyonundan 1 saat önce i.p yoldan 250 mg/kg L-karnitin verildi, uygulamaya sonraki 3 gün boyunca devam edildi. Deneyin 1. ve 60. gününde ketamin/xylozin anestezisi altında deneklerin sağ ve sol testisleri alınarak, histopatolojik incelemeler için rutin işlemlere tabi tutuldu. Deneyin 24. saatinde sakrifiye edilen deneklerin testislerinde, histopatolojik incelemeler ile germ hücre apoptozisi değerlendirildi. Deneyin 60. gününde sakrifiye edilen deneklerin serum testosteron düzeyleri ölçüldü, testisleri ışık mikroskopik olarak incelendi, epididimal sperm örneklerinde sperm sayımları, morfolojisi, motilite ve vitalitesi değerlendirildi.

Prepubertal dönem cisplatin maruziyetinden 24 saat sonra deneklerin testis dokusunda, interstisyel alanlarda genişlemeyle birlikte testiküler hasar skorunda ve apoptotik germ hücre sayısında artış gözlemlendi. Erişkin dönemde cisplatin hasarının azalmakla birlikte devam ettiği, serum testosteron düzeylerinin düştüğü, bunların neticesinde sperm sayı ve vitalitesinin azaldığı, morfolojisinin bozulduğu görüldü. L-karnitin tedavisinin, hem prepuberte hem de erişkin dönemde cisplatine bağlı olumsuz etkileri azalttığı tespit edildi.

Sonuç olarak, prepubertal dönemde cisplatin kemoterapisi ile birlikte verilen, L-karnitinin, testiküler hasarı ve germ hücre apoptozisini engellemek suretiyle erişkin dönem sperm parametreleri üzerinde faydalı etkiye sahip olabileceğini dşnmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Cisplatin, L-Karnitin, prepubertal sıan, sperm parametreleri, apoptozis.

# **THE PROTECTIVE EFFECT OF L-CARNITINE ON CISPLATIN INDUCED SEMINIFEROUS TUBULES DAMAGES IN PREPUBERTAL RAT TESTIS AND ADULT SPERM PARAMETERS**

## **SUMMARY**

At children and young patients undergoing chemotherapy in prepubertal phase may occur loss of fertility and irreversible impairment in fertility status. The aim of this study is to investigate the possible protective effects of L-Carnitine on testis of prepubertal rats exposed to cisplatin and the reflection of these effects on adult sperm parameters.

Fourty-four 30 day-old male Wistar albino rats were used in this study. Animals were randomly divided into three groups; the control (n = 12), cisplatin (n = 16), cisplatin+ L-Carnitine (n = 16). In all groups except the control, a single dose of cisplatin (5 mg/kg) was injected intra peritoneally (i.p). One hour before the cisplatin enjection, L-Carnitine was administrated at a dose of 250 mg/kg i.p to L-Carnitine group rats, and it was continued for the next 3 days. At the 1st and 60th days of the experiment the left and right testes were harvested under the xylazine/ketamine anesthesia. And they were prepared for histopathological examination. In the first day, testis tissues were evaluated in terms of germ cells apoptosis. In addition to testicular histopathology, serum testosterone levels were measured and quantity, morphology, motility and vitality of epididymal sperm samples were also evaluated in the 60th days of the experiment.

After 24 hours of exposure to cisplatin, expention of interstitial area, increase of testicular damage score and apoptotic germ cells were detected in prepubertal rat testes. In

adult period, testicular damages caused by cisplatin was less than the prepubertal period. Associated with decreased serum testosterone levels, reductions of sperm quantity, vitality and deterioration of sperm morphology were detected in cisplatin treated rats. Both in prepubertal and adult periods, it was observed that L-Carnitine had been effective in the prevention of cisplatin-induced testicular damage.

We think that the results obtained from this study will support the use of L-Carnitine in prepubertal patients undergoing cisplatin chemotherapy for the adulthood infertility treatment by means of preventing testicular damage and germ cell apoptosis.

**Key Words:** Cisplatin, L-Carnitine, prepubertal rats, sperm parameter, apoptosis.

## KAYNAKLAR

1. Kayaalp O. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. Kayaalp O (Editör). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 8. Basım. Ankara: Güneş Kitapevi; 1998.s.376-90.
2. Rang HP, Dale MM. Cancer Chemotherapy. In: Pharmacology ELBS, Hon-Kong: 1993.s.781-803.
3. Sönmezer M, Özkavukçu S. Fertility preservation in females with malignant disease-1: causes, clinical needs and indications. Turk J Hematol 2009;26:106-13.
4. Kobrinsky NL, Sposto R, Shah NR, Anderson JR, Delaat C Morse M, Warkentin P et al. Outcomes of treatment of children and adolescents with recurrent non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease with dexamethasone, etoposide, cisplatin, cytarabine and L-asparagine, maintenance chemotherapy and transplantation: children's cancer group study CCG-5912. J Clin Oncol 2001;19(9):2390-96.
5. Coşkun N, Hatipoğlu MT, Özoğul C, Korkmaz C, Akyol SD, Mıçılı SC. et al. The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced by cisplatin in rats. Balkan Med J 2013;30(2):235-41.
6. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. Am J Med Sci 2007;334(2):115-24.
7. Dilek İ. Kemoterapide toksisite değerlendirilmesi, 36. Ulusal Hematoloji Kongresi, Ankara, 2010.
8. Huang HFS, Pogach LM, Nathan E, Giglio W. Acute and chronic effects of cisplatin upon testicular function in the rat. J Androl 1990;11(5):436-45.
9. Seaman F, Sawhney P, Giammona CJ, Richburg JH. Cisplatin- induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. Apoptosis 2003;8(1):101-8.
10. Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. Marmara Pharm J 2013;17:73-92.

11. Ishikawa T, Kamidono S, Fujisawa M. Fertility after high-dose chemotherapy for testicular cancer. *Urology* 2004;63(1):137-40.
12. Aroekia Rani PJ, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001;36(10):1713-26.
13. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B, Ciralik H, Kurutas EB, Buyukbese MA. et al. Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci* 2006;51(3):488-94.
14. Palmero S, Bottazzi C, Costa M, Leone M, Fugassa E. Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. *Horm Metab Res* 2000;32(3):87-90.
15. Vicari E, Vignera SL, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* 2002;78(6):1203-8.
16. Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M, Uzal MC, Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Arch Toxicol* 2009;83(8):735-46.
17. Kanter M, Topcu Tarladacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol* 2010;41(2-3):121-8.
18. Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E, Miraglia SM. Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec* 2008;291(7):797-808.
19. Kierszenbaum LA. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. (Çeviri: R Demir) Ankara: Palme Yayıncılık;2006.s.531-64.
20. Ross MH, Pawlina W. *Erkek üreme sistemi*. (Çeviri: N.Demir). Baykal B. (Editör). *Histoloji konu anlatımı ve atlas, ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile*. Ankara: Palme Yayınları;2014.s.787-8.
21. Sadler TW. *Langman medikal embriyoloji Onbirinci Baskı*. (Çeviri: AC. Başaklar) Ankara: Palme Yayıncılık;2011.s.30.
22. Jost A, Vigier M, Pripin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 1973;29:1-33.
23. Magre S, Jost A. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1980;69:297-318.
24. Habert R, Picon R. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol 17-p levels in maternal and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem* 1984;21:193-8.
25. Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. Developmental stages of fetal type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* 1989;107:213-20.
26. Kerr JB, Knell CM. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 1988;103:535-44.

27. Kalkan Y. Sıçanlarda testisin postnatal gelişimi üzerine histolojik ve histoşimik araştırmalar (tez). Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2001.
28. Özkaral A. Testislerde fonksiyona bağlı yapıların prepuberte, puberte ve erişkinde ışık mikroskopik incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni 1998;22:(4),945-53.
29. Handagama C, Ariyaratne S. Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis. Biol Reprod 2001;65:660-671.
30. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP. Gene expression in rat Leydig cells during development from the progenitor to adult. Biol Reprod 2005;72(6):1405-15.
31. Hansson HA, Billig H, Isgaard J. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. Biol Reprod 1989;40(6):1321-8.
32. Risbridger G, Kerr J, de Kretser D. Differential effects of the destruction of Leydig cells by administration of ethane dimethane sulphonate to postnatal rats. Biol Reprod 1989;40(4):801-9.
33. Yang ZW, Wreford NG, de Kretser DM. A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. Biol Reprod 1990;43(4):629-35.
34. Barañao JL, Chemes HE, Tesone M, Chiauzzi VA, Scacchi P, Calvo JC. et al. Effects of androgen treatment of the neonate on rat testis and sex accessory organs. Biol Reprod 1981;25(4):851-8.
35. Clermont Y. Kinetics spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev 1972;52(1):198-236.
36. Hess RA. Spermatogenesis overview. Encycyclopedia of Reproduction. 4. edition. Academic Press;1999.s.539-45.
37. Industrial Reproductive Toxicology Discussion Group (IRDG). Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) Group. Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document. Edition 1 October 2000.
38. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer 2007;7(8):573-84.
39. Launay-Vacher V, Rey J, Isnard-Bagnis C, Deray G, and Daouphars M. Prevention of cisplatin nephrotoxicity: state of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care, Cancer Chemother Pharmacol 2008;61(6):903-9.
40. Wang D, Lippart SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov 2005;4(4):307-20.
41. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2002;2(4):277-88.
42. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity. Cell Mol Life Sci 2000;57(8-9):1229-35.

43. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7265-79.
44. Rabik C, Dolan M. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33(1):9-23.
45. Carvalho Rodrigues MA, Silva Faria MC, Santos NA, Gobe GC, dos Santos AC. Carvedilol efficiently protects kidneys without affecting the antitumor efficacy of cisplatin in mice. *Chem Biol Interact* 2013;206(1):90-9.
46. Tarladacalisir YT, Kanter M, Uygun M. Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. *Ren Fail* 2008;30(1):1-8.
47. Tarladaçalışır YT, Uygun M, Akpolat M, Uz YH. E ve C vitaminlerinin cisplatin hepatotoksitesini önlemedeki etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 2005;22(3):124-31.
48. Madhu P, Reddy KP, Reddy PS. Melatonin reduces oxidative stress and restores mitochondrial function in the liver of rats exposed to chemotherapeutics. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2015;323(5):301-8.
49. Çitil M. Veteriner hekimlikte karnitin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2002;8(1):77-82.
50. Da Torre SD, Creer MH, Progwizd SM, Corr PB. Amphipathic lipid metabolites and their relation to arrhythmogenesis in ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23(1):11-22.
51. Başpınar N, Kurtoğlu F. Vitaminler. ISBN 975-448-168-7. S.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. Konya. 2003.
52. Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A. et al. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(5):753-83.
53. Arrigoni-Martelli E, Caso V. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs Exp Clin Res* 2001;27(1):27-49.
54. Kabaroglu C, Akisu M, Habif S, Mutaf I, Turgan N, Parildar Z. et al. Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Pediatr Int* 2005;47(1):10-4.
55. Göksel S, Paskaloglu K, Satiroglu H, Alican I, Kacmaz A, Sakarcan A. L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(5):698-705.
56. Demirdag K, Bahcecioglu IH, Ozercan IH, Ozden M, Yılmaz S, Kalkan A. Role of L-carnitine in the prevention of acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19(3):333-8.
57. Pisano C, Pratesi G, Laccabue D, Zunino F, Lo Giudice P, Bellucci A et al. Paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity: A protective role of acetyl-L-carnitine. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5756-67.



58. Sayed-Ahmed MM, Salman TM, Gaballah HE, Abou El-Naga SA, Nicolai R, Calvani M. Propionyl-L-carnitine as protector against adriamycin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Res* 2001;43(6):513-20.
59. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Bensen LN, Lehotay DC. L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9-10):1158-65.
60. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 2006;78 (8):803-11.
61. Pacifici EH, McLeod LL, Sevanian A. Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free Radic Biol Med* 1994;17(4):297-309.
62. Madesh M, Balasubramanian KA. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys* 1997;346(2):187-92.
63. Vicari E, Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis. *Hum Reprod* 2001;16(11):2338-42.
64. Stradaoli G, Sylla L, Zelli R, Verini Supplizi A, Chiodi P, Arduini A et al. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Anim Reprod Sci* 2000;64(3-4):233-45.
65. Caviglia D, Scarabelli L, Palmero S. Effects of carnitines on rat Sertoli cell protein metabolism. *Horm Metab Res* 2004;36(4):221-5.
66. Agarwal A, Said TM. Carnitine and male infertility. *Reprod Biomed Online* 2004;8(4):376-84.
67. Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS. The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann NY Acad Sci* 2004;1033:177-88.
68. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatazoa. *Hum Reprod Update* 1996;2(2):87-102.
69. Burns KA, Casillas ER. The metabolism of acetyl carnitine and acetate by bovine and hamster epididymal spermatazoa. *Biol Reprod* 1998;41(2):218-26.
70. Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2005;84(3):662-71.
71. Matalliotakis I, Koumantaki Y, Evageliou A, Matalliotakis G, Goumenou A, Koumantakis E. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: Correlation with sperm quality. *Int J Fertil Womens Med* 2000;45(3):236-40.
72. Lenzi A, Sgro`P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004;81(6):1578-84.

73. Orazizadeh M, Khorsandi L, Absalan F, Hashemibatar M, Daneshi E. Effect of beta-carotene on titanium oxide nanoparticles-induced testicular toxicity in mice. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(5):561-8.
74. Miraglia SM, Hayashi H. Histomorphometry of immature rat testis after heating. *J Morphol* 1993;217(1):65-74.
75. Ansari B, Cootes PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993;170(1):1-8.
76. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993;41(1):7-12.
77. Hasegava M, Wilson G, Russel LO, Meistrich ML. Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res* 1997;147(4):457-67.
78. Özenci ÇÇ, Satı L, Tekcan M. Temel Androloji Teknikleri, 1.Uygulamalı Moleküler Teknikler Gamet Biyolojisi Kursu Kitabı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD, Antalya:2007;108-19.
79. Makler A. A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril* 1978;30(3):313-8.
80. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ. et al. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytother Res* 2010;24(9):1285-91.
81. Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10(1):92-102.
82. Sakamoto H, Oohta M, Inoue K, Fuji K, Fukagai T, Yoshida H. Testicular sperm extraction in patients with persistent azoospermia after chemotherapy for testicular germ cell tumor. *Int J Urol* 2007;14(2):167-70.
83. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003;79(2):292-300.
84. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 2006;21(2):42-7.
85. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl* 2008;10(2):291-7.
86. Aydın A, Aytekin Y, Sayın Ü, Kuntsal L, Topuz E. Cisplatin'in testis dokusuna etkisi: ultrastrüktürel ve biyokimyasal bir çalışma. *Turk J Pathol* 1995;11(1):5-9.

87. Pogach LM, Lee Y, Giglio W, Naumoff M, Huang HF. Zinc acetate pretreatment ameliorates cisplatin-induced Sertoli cell dysfunction in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24(3):177-80.
88. Favareto AP, Fernandez CD, da Silva DA, Anselmo-Franci JA, Kempinas Wde G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109(2):85-96.
89. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Ceribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008;89(5):1474-81.
90. Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguztürk H, Yılmaz F. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69(1):207-13.
91. Seethalakshmi L, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Malhotra RK, Menon M. Effects of subchronic treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. *J Androl* 1992;13(1):65-74.
92. Kata FS. Effect of cisplatin drug on sperm characterizes, spermatogenesis and sex hormones levels of male mice *mus musculus* L. *Journal of Basrah Resarches* 2013; 39(2):112-8.
93. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 266(3):356-65.
94. Majino G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146(1):3-13.
95. Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. *Arch Androl* 2001;46(1):43-9.
96. Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K. The fas system a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 1999;140(2):852-8.
97. Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int Urol Nephrol* 1999;31(3):361-70.
98. YVK Reddy, PS Reddy, MR Shivalingam, CP Gamini. Dose dependent alterations in epididymal sperm counts of cisplatin or carboplatin treated male wistar rats. *J Pharm Sci Res* 2009;1(4):167-72.
99. Salem EA, Salem NA, Maarouf AM, Serefoglu EC, Hellstrom WJ. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology* 2012;79(5):1184.e1-6.

100. Maines MD, Sluss PM, Iscan M. Cisplatin-mediated decrease in serum testosterone is associated with depression of luteinizing hormone receptors and cytochrome P-450 scc in rat testis. *Endocrinology* 1990;126(5):2398-406.
101. Maines MD, Mayer RD. Inhibition of testicular cytochrome P-450-dependent steroid biosynthesis by cis-platinum. *J Biol Chem* 1985;260(10):6063-8.
102. Azouri H, Bidart JM, Bohuon C. In vivo toxicity of cisplatin and carboplatin on the Leydig cell function and effect of the human choriogonadotropin. *Biochem Pharmacol* 1989;38(4):567-71.
103. Andersson AM, Jorgensen N, Larsen LF, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3161-7.
104. Perk H, Soyupek S, Oksay T. Erkek infertilitesine neden olan fiziksel ajanlar, ilaçlar ve toksinler. *Androloji Bülteni* 2005;23,305-10.
105. Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Bakheet SA. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2(2):73-81.
106. Yari A, Asadi MH, Bahadoran H, Dashtnavard H, Imani H, Naghii MR. Cadmium toxicity in spermatogenesis and protective effects of L-carnitine in adult male rats. *Biol Trace Elem Res* 2010;137(2):216-25.
107. Ahmed MM, Ibrahim ZS, Alkafafy M, El-Shazly SA. L-carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta Histochem* 2014;116(6):1046-55.
108. Amendola R, Bartoleschi C, Cordelli E, Mauro F, Uccelli R, Spanò M. Effects of L-acetylcarnitine (LAC) on the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. 1. Recovery after X-irradiation. *Andrologia* 1989;21(6):568-75.
109. Amendola R, Cordelli E, Mauro F, Spanò M. Effects of L-acetylcarnitine (LAC) on the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. 2. Recovery after hyperthermic treatment. *Andrologia* 1991;23(2):135-40.
110. Costa M, Canale D, Filicori M, D'iddio S, Lenzi A. L-carnitine in idiopathic astenozoospermia: a multicenter study. Italian study group on carnitine and male infertility. *Andrologia* 1994;26(3):155-9.
111. Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol* 2000;83(2):119-124.
112. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275(5303):1132-6.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 1: Sıçanlarda germ hücre gelişimi.....	9
Şekil 2: Cisplatinin kimyasal özellikleri ve moleküler yapısı.....	10
Şekil 3: L-karnitinin kimyasal yapısı .....	13
Şekil 4: Farklı sperm morfolojileri, Spermac, X400.....	19
Şekil 5: Kontrol grubu 1.gün, H+E, X100 .....	29
Şekil 6: Kontrol grubu 1.gün, H+E, X200 .....	29
Şekil 7: Kontrol grubu 1.gün, H+E, X400 .....	30
Şekil 8: Kontrol grubu 1.gün, PAS+HL, X400.....	30
Şekil 9: Cisplatin grubu 1.gün, H+E, X100 .....	31
Şekil 10: Cisplatin grubu 1.gün, H+E, X200 .....	31
Şekil 11: Cisplatin grubu 1.gün, H+E, X400 .....	32
Şekil 12: Cisplatin grubu 1.gün, PAS+HL, X400.....	32
Şekil 13: L-karnitin grubu 1.gün, H+E, X100 .....	33
Şekil 14: L-karnitin grubu 1.gün, H+E, X200 .....	33
Şekil 15: L-karnitin grubu 1.gün, H+E, X400 .....	34
Şekil 16: L-karnitin grubu 1.gün, PAS+HL, X400 .....	34
Şekil 17: Kontrol grubu 60. gün, H+E, X40 .....	35
Şekil 18: Kontrol grubu 60. gün, H+E, X200 .....	35
Şekil 19: Kontrol grubu 60. gün, H+E, X400 .....	36
Şekil 20: Kontrol grubu 60. gün, PAS+HL, X400.....	36
Şekil 21: Cisplatin grubu 60. gün, H+E, X40 .....	37

Şekil 22: Cisplatin grubu 60. gün, H+E, X100 .....	37
Şekil 23: Cisplatin grubu 60. gün, H+E, X200 .....	38
Şekil 24: Cisplatin grubu 60. gün, PAS+HL, X400.....	38
Şekil 25: L-karnitin grubu 60. gün, H+E, X40 .....	39
Şekil 26: L-karnitin grubu 60. gün, H+E, X100 .....	39
Şekil 27: L-karnitin grubu 60. gün, H+E, X200 .....	40
Şekil 28: L-karnitin grubu 60. gün, PAS+HL, X400 .....	40
Şekil 29: Kontrol grubu, TUNEL, X100.....	41
Şekil 30: Kontrol grubu, TUNEL, X200.....	41
Şekil 31: Cisplatin grubu, TUNEL, X100.....	42
Şekil 32: Cisplatin grubu, TUNEL, X200.....	42
Şekil 33: L-karnitin grubu, TUNEL, X100.....	43
Şekil 34: L-karnitin grubu, TUNEL, X200.....	43
Şekil 35: Kontrol grubuna ait spermler, Spermac, X400 .....	44
Şekil 36: Cisplatin grubuna ait spermler, Spermac, X400 .....	44
Şekil 37: L-karnitin grubuna ait spermler, Spermac, X400 .....	45
Şekil 38: Kontrol grubuna ait spermler, Eosin-nigrosin, X400 .....	45
Şekil 39: Cisplatin grubuna ait spermler, Eosin-nigrosin, X400 .....	46
Şekil 40: L-karnitin grubuna ait spermler, Eosin-nigrosin, X400.....	46

## TABLolar

<b>Tablo 1.</b> Kontrol ve deney gruplarının prepubertal ve erişkin döneme ait vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranları ile seminifer tübül çapı ve interstisyel alanlarının karşılaştırılması .....	22
<b>Tablo 2.</b> Kontrol ve deney gruplarının prepubertal ve erişkin döneme ait testis dokularının histopatolojik olarak değerlendirilmesi .....	25
<b>Tablo 3.</b> Kontrol ve deney gruplarının prepubertal dönemine ait apoptotik seminifer tübül ve germinal hücre sayısı .....	27
<b>Tablo 4.</b> Kontrol ve deney gruplarının erişkin dönem epididimal sperm parametreleri ve total serum testosteron düzeyleri .....	27

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İzmir’de doğdum. Orta öğretimimi Urla Lisesi’nde tamamladım. Lisans eğitimime 2000 yılında, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde başladım. 2004 yılında biyolog ünvanı olarak mezun oldum. 2005-2012 yılları arasında Özel İrenbe Tüp Bebek Merkezi’nde biyolog olarak çalıştım. Eğitim hayatıma uzun süre ara verdikten sonra, 2013 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi’nde göreve başladım ve halen biyolog olarak çalışmaktayım.

## **EKLER**



Ek 1



T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/07

Karar Tarihi: 27.06.2014


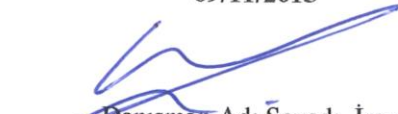
KARAR NO: 2014.07.01

Yürütcülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Yeter Topçu TARLADAÇALIŞIR'ın yaptığı, Yüksek Lisan Öğrencisi Özge Yaman'ın Yüksek Lisans Tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/21 protokol nolu "Prepubertal sıçan testislerinde cisplatin maruziyetinin neden olduğu seminifer tübül hasarı ve erişkin sperm parametreleri üzerine L-Karnitinin koruyucu etkisi" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

Ek 2

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI  
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: Özge YAMAN										
Numarası: 1138310102										
Anabilim Dalı: Morfoloji (Tıp Histoloji ve Embriyoloji)										
Programı: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: PREPUBERTAL SIÇAN TESTİSLERİNDE CİSPLATİN MARUZİYETİNİN NEDEN OLDUĞU SEMİNİFER TÜBÜL HASARI VE ERİŞKİN SPERM PARAMETRELERİ ÜZERİNE L-KARNİTİNİN KORUYUCU ETKİSİ										
<b>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne</b>										
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezinin “Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary” bölümlerinden oluşan toplam 59 sayfalık kısmına ilişkin 09/11/2015 Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>Authenticate</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezinin benzerlik oranı % 7 olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler:</u></p> <table><tr><td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td><td>6-Kaynaklar hariç</td></tr><tr><td>2-Teşekkür hariç</td><td>7-Şekiller Listesi hariç</td></tr><tr><td>3-İçindekiler hariç</td><td>8-Özgeçmiş hariç</td></tr><tr><td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td><td>9-Ekler hariç</td></tr><tr><td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td><td></td></tr></table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim. 09/11/2015</p>	1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç									
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç									
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç									
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç									
5-Gereç ve Yöntemler Hariç										
 Öğrencinin Adı Soyadı, İmza Özge YAMAN										
Ek:Orijinallik Raporu (..... Sayfa)										
<b>UYGUNDUR</b> 09/11/2015										
 Danışman Adı Soyadı, İmza Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR										