

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TESTİSTEKİ SAVAŞIN KAZANANI KİM?  
SİKLOFOSFAMİD Mİ, PTEROSTİLBEN Mİ?**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Tuğba ARICI**

**TRABZON- 2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TESTİSTEKİ SAVAŞIN KAZANANI KİM?  
SİKLOFOSFAMİD Mİ, PTEROSTİLBEN Mİ?**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Tuğba ARICI**

**Tez Danışmanı Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU**

**TRABZON- 2020**

## ÖNSÖZ

Hayatım boyunca her daim madden ve manen yanımda olan canım annem, babam ve kardeşlerime; uzmanlık eğitimim süresince desteklerini benden esirgemeyen tez danışmanım, kıymetli hocam Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na, eğitimim boyunca her türlü kolaylığı sağlayan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Esin YULUĞ ve Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU ve Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik bölümünden Doç. Dr. Selim DEMİR hocalarıma, ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olan ve tezime katkıları olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Tuğba ZENGİN, Uzm. Dr. Oğuzhan KESKİN, Uzm. Dr. Nezih Senem ARI, Arş. Gör. Dr. Abdülkadir KUTLU, Arş. Gör. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Biyolog Ali KULABER, Arş. Gör. Dr. Dilan ÇETİNAVCI, Biyolog Birgül GÜR KUTLU, Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN, Arş. Gör. Dr. Elif ALVUROĞLU, Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN ve Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Nihal TÜRKMEN'e ve ömrüm boyunca dualarında beni unutmayan yüreği güzel insanlara teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi, saygı ve selam ile...

Dr. Tuğba ARICI

## ÖZET

### Testisteki Savaşın Kazananı Kim? Siklofosfamid mi, Pterostilben mi?

**Amaç:** Bu çalışmada sitotoksik etkileri olan Siklofosfamid (CP)'in neden olduğu erişkin sıçan testis hasarının engellenmesi ve/veya iyileştirilmesine kuvvetli bir antioksidan olan Pterostilben (Ptr)'in etkisi araştırılmıştır. Bu amaç için ağırlık ölçümleri, sperm analizi, histopatoloji ve biyokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

**Metotlar:** Araştırmada kullanılmak üzere 21 adet Sprague Dawley ırkı erişkin erkek sıçan rastgele 3 eşit gruba (kontrol (K), CP ve CP+Ptr) ayrıldı. Tüm denekler deneyin 1. günü, CP'nin uygulandığı 9. gün ve deneklerin sakrifiye edildikleri 15. gün olmak üzere 3 kez tartıldı. Kontrol grubuna 1 ml/kg ayçiçeği yağı (14 gün, oral) ve intraperitoneal (ip.) 10 ml/kg serum fizyolojik (SF) (9. gün) verildi. Siklofosfamid grubuna 1 ml/kg ayçiçeği yağı (14 gün, oral) ve 200 mg/kg tek doz CP (10 ml SF içinde çözülmüş, 9. gün, ip.) ve CP+Ptr grubuna 40 mg/kg Ptr (1 ml ayçiçeği yağı içinde çözülmüş, 14 gün, oral) ve 200 mg/kg tek doz CP (10 ml SF içinde çözülmüş, 9. gün, ip.) uygulandı. Deneyin 15. günü sıçanlar sakrifiye edildi ve sol testis ile epididim dokuları diseke edildi. Kauda epididimden elde edilen sperm örneklerinde sperm sayısı, motilitesi, canlılığı ve morfolojisi analiz edildi. Kaput epididimiste Hematoksilin & eozin (H&E) ve testis dokusunun bir yarısında H&E, Masson Trichrome ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemleriyle histopatolojik incelemeler yapıldı. Testis dokusunun diğer yarısında ise biyokimyasal olarak malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), total antioksidan durum (TAS), total oksidan durum (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI), kaspaz-3 ve testis doku testosteron düzeylerine bakıldı.

**Bulgular:** Vücut ağırlığı ölçümlerinde CP+Ptr grubunda K grubuna göre anlamlı azalma vardı. Histolojik olarak CP grubuna ait testislerde; seminifer tübüllerde atrofi, bazal membranda düzensizlik ve ayrılma, interstisyumda ödem ve germinal epitelde ayrılma görüldü. Bu bulgular, CP+Ptr grubunda oldukça azalmıştı. Hem CP hem de CP+Ptr grubunda belirgin immatür germinal hücre dökülmesi (GHD) vardı ve Modifiye Johsen Skoru (MJS) kontrole göre düşüktü. Spermelerde sayı, motilite, canlılık ve normal morfolojinin CP grubunda bozulduğu; CP+Ptr

grubunda ise morfolojinin düzeldiği görüldü. Biyokimyasal olarak CP grubunda CAT ve doku testosteronunda azalma, TOS'ta artış mevcuttu. Siklofosfamid+Ptr grubunda ise CP'ye göre TOS azalırken; CAT arttı. Grup CP'ye ait epididim dokularında K ve CP+Ptr gruplarından farklı olarak berrak hücrelerde azalma, halo hücrelerinde artış ve bazı hücrelerde sitoplazmik vakuoller izlendi.

**Sonuçlar:** Elde edilen bulgular sonucunda CP'nin erişkin sıçan testisini olumsuz etkilediği, Ptr uygulamasının CP'nin bazı olumsuz etkilerini önlediği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sıçan, testis, sperm analizi, pterostilben, siklofosfamid.



## SUMMARY

### **Who is the Winner of the Battle in the Testis? Cyclophosphamide or Pterostilbene?**

**Background:** In this study, the effects of Pterostilben (Ptr), a powerful antioxidant, on the prevention and/or healing of adult rat testicular injury caused by Cyclophosphamide (CP), which has cytotoxic effects, was investigated. For this purpose, weight measurements, sperm analysis, histopathology and biochemical methods were used.

**Methods:** Twenty-one Sprague Dawley adult male rats were randomly divided into 3 equal groups as control (K), CP and CP+Ptr in this study. All subjects were weighed three times: on the first day of the experiment, on the 9<sup>th</sup> day on which CP was applied, and on the 15<sup>th</sup> day on which the subjects were sacrificed. Group K was administered oral 1 ml/kg sunflower oil for 14 days and intraperitoneally (ip.) 10 ml/kg saline (SF) on the 9<sup>th</sup> day of the experiment. Group CP was given oral 1 ml/kg sunflower oil for 14 days and 200 mg/kg single dose CP (dissolved in 10 ml/kg SF) ip. on the 9<sup>th</sup> day of the experiment. Oral 40 mg/kg Ptr (dissolved in 1 ml/kg sunflower oil) and ip. 200 mg/kg single dose CP (dissolved in 10 ml SF) were applied to group CP+Ptr. On the 15<sup>th</sup> day of the experiment, the rats were sacrificed, and the left testes were dissected together with epididymis. In the sperm samples obtained from cauda epididymis, sperm count, motility, viability and morphology were examined. Histopathological examinations were performed using staining methods Hematoxylin & eosin (H&E) in caput epididymis and H&E, Masson Trichrome and Periodic Acid Schiff (PAS) in one half of testicular tissue. In the other half of the testicular tissue, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI), Caspase-3 and levels of tissue testosterone were examined using biochemical methods.

**Results:** In body weight measurements, there was a significant decrease in CP+Ptr groups compared to K group. Histologically, in the testes belonging to the CP group; atrophy in the seminiferous tubules, irregularity and separation in the

basement membrane, edema in the interstitium, and separation in the germinal epithelium were observed. These findings were significantly lightened in the CP+Ptr group. There was significant immature germinal cell shedding (GHD) in both CP and CP+Ptr groups and the Modified Johsen Score (MJS) was lower than the control. The number, motility, vitality and normal morphology of the spermatozoa were deteriorated in the CP group, however sperm morphology was improved in CP+Ptr group. Biochemically, CP group had a decrease in level of catalase (CAT) and testosterone and increase in total oxidant status (TOS). In CP+Ptr group compared to CP, CAT level increased while TOS level decreased. Unlike K and CP+Ptr groups, epididymal tissues of CP group revealed a decrease in clear cells, despite of the increase in halo cells and vacuoles in cytoplasm of several epithelial cells.

**Conclusions:** As a result of the findings obtained, it can be said that CP affects adult rat testis and Ptr application can prevent some negative effects of CP.

**Key Words:** Rat, testis, sperm analysis, pterostilbene, cyclophosphamide.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	ii
SUMMARY .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLOLAR DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Testis ve Epididim .....	3
2.1.1. Testis ve Epididimin Embriyolojisi .....	3
2.1.2. Testisin Anatomisi ve Histolojisi.....	6
2.1.3. Epididimin Anatomisi ve Histolojisi .....	12
2.2. Siklofosfamid.....	14
2.3.1. Emilimi, Metabolizması ve Atılımı .....	14
2.3.2. Etki Mekanizması .....	14
2.3.3. Hazırlanması ve Uygulanması .....	15
2.3.4. Tıpta Kullanım Endikasyonları.....	15
2.3.5. Yan Etkileri.....	16
2.3. Pterostilben .....	16
2.4. Testosteron.....	18
2.5. Apoptoz ve Kaspazlar .....	19
2.6. Oksidatif Stres ve Oksidan– Antioksidan Parametreler .....	21
3. MATERYAL VE METOT .....	24
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Kaynak .....	24
3.2. Denekler, Gruplar ve Deney Prosedürü .....	24
3.3. Sperm Analizi .....	27
3.4. Histomorfometrik ve Histomorfolojik Analizler .....	28
3.4.1. Testis Dokularının Boyamaya Hazır Hale Getirilmesi.....	28
3.4.2. Epididim Dokularının Boyamaya Hazır Hale Getirilmesi.....	30
3.4.3. Işık Mikroskopik İnceleme için Boyama Yöntemleri.....	30



3.5. Testis Dokusunun Biyokimyasal Analizleri .....	34
3.6. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Vücut Ağırlığı Takibi ve Testis Ağırlığı Bulguları.....	40
4.2. Sperm Analizi Bulguları .....	41
4.3. Histomorfometrik ve Histomorfolojik Bulgular .....	43
4.3.1. Testis Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin, Masson Trikrom ve Periyodik Asit Schiff Boyalı Kesitlerin Bulguları .....	43
4.3.4. Epididim Dokusuna Ait Hematoksilen&Eozin Boyalı Kesitlerin Bulguları .....	63
4.4. Testis Dokusunun Biyokimyasal Bulguları .....	66
5. TARTIŞMA .....	69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR .....	78

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µmol</b>	: Mikromol
<b>ABP</b>	: Androjen bağlayıcı protein
<b>APAF</b>	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
<b>ark.</b>	: Arkadaşları
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>CP</b>	: Siklofosfamid
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Fas</b>	: Yağ asidi sentaz
<b>FSH</b>	: Folikül stimüle edici hormon
<b>g</b>	: Gram
<b>GEH</b>	: Germinal epitel yüksekliği
<b>GHD</b>	: hücre dökülmesi
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutatyon peroksidaz
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen & eozin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Fosforik asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>IM</b>	: Işık Mikroskobu
<b>ip.</b>	: İntraperitoenal
<b>K</b>	: Kontrol
<b>kaspaz</b>	: Sistein aspartik proteaz
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>KTÜ</b>	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
<b>LH</b>	: Lüteinleştirici hormon

<b>m</b>	: Metre
<b>M</b>	: Molar
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MIS</b>	: Mülleryan inhibitör madde
<b>MJS</b>	: Modifiye Johnsen Skoru
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mmol</b>	: Milimol
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>nmol</b>	: Nanomol
<b>°C</b>	: Santigrad derece
<b>Ort.</b>	: Ortalama
<b>OSI</b>	: Oksidatif stres indeksi
<b>PAS</b>	: Periyodik asit Schiff
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon çözeltisi
<b>PGH</b>	: Primordiyal germ hücreleri
<b>pH</b>	: Power of Hydrogen
<b>PM</b>	: Forforamid mustard
<b>Ptr</b>	: Pterostilben
<b>rcf</b>	: Rölatif santrifüj kuvveti
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>SD</b>	: Standart sapma
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences
<b>STD</b>	: Seminifer tübül çapı
<b>TAS</b>	: Total antioksidan durum
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TBF</b>	: Testis belirleyici faktör
<b>TNF</b>	: Tümör nekrotizan faktör
<b>TOS</b>	: Total oksidan durum

**TUNEL** : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Deoxyuridine  
Triphosphate Nick End Labeling Assay



## TABLULAR DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1: Pterostilbenin biyolojik etkileri.....	18
Tablo 2: Rutin gece doku takip programı.....	29
Tablo 3: Hematoksilen & eozin boyama programı.....	31
Tablo 4: Modifiye Johnsen Skoru kriterleri.....	32
Tablo 5: Deparafinizasyon programı.....	32
Tablo 6: Masson trikrom boyama protokolü.....	33
Tablo 7: Periyodik asit Schiff boyama protokolü.....	34
Tablo 8: Ağırlık verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	40
Tablo 9: Sperm analizi verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	41
Tablo 10: Histomorfometrik verilerin ortalama ve standart sapma değerleri.....	43
Tablo 11: Testis dokusu biyokimya parametrelerinin verilerine ait ortalama ve standart sapma değerleri.....	66

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1: İntrauterin gelişmekte olan testisin illüstrasyonları .....	4
Şekil 2: Testis ve erkek genital kanal sisteminin gelişimi.....	5
Şekil 3: Testisi dıştan saran yapılar .....	7
Şekil 4: Erken spermatidin spermiyohistogenezis sırasındaki morfolojik değişimleri ve olgun sperm yapısı.....	10
Şekil 5: Duktus epididimisin histolojik görünümü.....	13
Şekil 6: Siklofosfamidin etki mekanizması .....	15
Şekil 7: Resveratrol ve Ptr'in kimyasal yapıları.....	17
Şekil 8: Oksidatif denge ve hasar .....	22
Şekil 9: Deney prosedürü .....	25
Şekil 10: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	36
Şekil 11: Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	37
Şekil 12: Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	37
Şekil 13: Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	38
Şekil 14: Testosteron ölçümünde kullanılan standart grafiği .....	38
Şekil 15: Gruplara ait vücut ağırlığı ve testis ağırlığı sonuçları.....	41
Şekil 16: Gruplara ait sperm analizi bulguları.....	42
Şekil 17: Gruplara ait histomorfometrik bulgular .....	44
Şekil 18: Grupların biyokimyasal analiz bulguları.....	67

## RESİMLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Resim 1: Testisin histolojik kesiti .....	9
Resim 2: Deney boyunca sıçanların barındırıldığı standart tip III kafesler.....	24
Resim 3: Deneklerin oral gavaj ve ip. uygulamaları .....	26
Resim 4: Testis ile epididimin diseksiyonu.....	27
Resim 5: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-1 .....	45
Resim 6: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-2.....	46
Resim 7: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-3.....	47
Resim 8: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-4.....	48
Resim 9: Siklofosfamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-1.....	49
Resim 10: Siklofosfamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-2.....	50
Resim 11: Siklofosfamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-3.....	51
Resim 12: Siklofosfamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-4.....	52
Resim 13: Siklofosfamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-1.....	53
Resim 14: Siklofosfamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-2.....	54
Resim 15: Siklofosfamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-3.....	55
Resim 16: Siklofosfamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-4.....	56
Resim 17: Kontrol grubunun Masson Trikrom ile boyanmış testis kesiti.....	57
Resim 18: Siklofosfamid grubunun Masson Trikrom ile boyanmış testis kesiti .....	58
Resim 19: Siklofosfamid+Ptr grubunun Masson Trikrom ile boyanmış testis kesiti .....	59
Resim 20: Kontrol grubunun PAS ile boyanmış testis kesiti .....	60
Resim 21: Siklofosfamid grubunun PAS ile boyanmış testis kesiti .....	61
Resim 22: Siklofosfamid+Ptr grubunun PAS ile boyanmış testis kesiti .....	62
Resim 23: Kontrol grubunun epididim kesiti .....	63
Resim 24: Siklofosfamid grubunun epididim kesiti .....	64
Resim 25: Siklofosfamid+Ptr grubunun epididim kesiti .....	65

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Siklofosfamid (CP), çeşitli kanserlerin ve kronik inflamatuvar hastalıkların tedavi rejimlerinde oldukça yaygın kullanılan alkilleyici bir ajandır (1,2). Karaciğerde CP'nin metabolizasyonu sonucu oluşan bir metaboliti olan fosforamid mustard (PM), onun antineoplastik etkilerinden sorumludur (2). Diğer bir metabolit olan akrolein ise, toksik etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur (3). Literatürde CP'nin, akciğer hasarı, hepatotoksisite, kardiyomyotoksisite, ürotoksisite, nefrotoksisite ve gonadal toksisite gibi çok sayıda organ hasarına neden olduğu belirtilmiştir (4–10). Yapılan çalışmalar, dokularda oksidatif stresi indüklemesinin CP'nin oluşturduğu bu hasarların nedenlerinden biri olabileceğini göstermiştir (11–13).

Testis ve epididim dokularında oksidatif stresi indükleyen CP, sperm sayısında ve motilitesinde azalmaya neden olabilir. İlave olarak CP'nin neden olduğu oksidatif stress; seminifer tübüllerde apoptoz ve küçülmelere, incelmış seminifer epitele, interstisyel hücreler ve özellikle post-mayotik evrelerdeki spermatojenik hücrelerde azalmaya yol açabilir (12–20). Serum ve testis testosteron seviyelerinde azalmaya ek olarak CP, testis ve epididim ağırlığında da belirgin azalmaya neden olur (13,15,16,18,21–23). Klinikte CP kullanımının istenmeyen etkilerinden biri ise testis ve spermelerde oluşturduğu hasar sonucu gelişebilen infertilitedir ve infertilite de günümüzün önemli sorunlarından biridir (2,15,18,20,24–27).

Pterostilben (Ptr); üzüm, yaban mersini, kırmızı sandalağacı gibi bitkilerde bulunan ve bitkinin savunma sisteminde önemli rol alan antimikrobiyal bir maddedir (28). Güçlü antioksidan özellik gösterdiğinden serbest radikalleri temizleyici, singlet oksijen formlarını ve apoptozu baskılayıcı özelliklere sahiptir (29–32). Yapılan çalışmalarda Ptr'in; kardiyovasküler hastalıklar, hiperglisemi, bazı kanser türleri ve inflamatuvar hastalıklar gibi oksidatif stresle ilişkili patolojik durumlara karşı tedavi edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (28,30,33–39).

Konuyla ilgili İngilizce ve Türkçe literatürde, CP'nin testis üzerinde oluşturduğu hasarın önlenmesinde Ptr'in etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.



Bu nedenle çalışmamızda gcl bir antioksidan olan Ptr'in; sıçan testis ve epididiminde, CP'nin indüklediği olumsuz etkilerin önlenmesi ve/veya iyileştirilmesindeki rolü araştırılmıştır. Siklofosfamidin testis üzerindeki yan etkilerinin azaltılmasında, Ptr'in bir destekleyici olarak verilip verilemeyeceğinin belirlenmesi çalışmamızın zgn değerini ortaya koymaktadır.

Erkek reme sisteminde CP'nin negatif etkilerini önleyecek bir are bulmak, insan sağlığı için ve CP kaynaklı infertilitenin önüne geçebilmek için oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamız sonucunda ortaya çıkacak verilerin literatüre büyük katkı sağlayabileceğine inanmaktayız. İlave olarak çalışma sonuçlarının, daha sonra yapılacak deneysel ve klinik çalışmalar için de temel teşkil edebileceğini düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testis ve Epididim

#### 2.1.1. Testis ve Epididimin Embriyolojisi

Gonadlar (testis ve overler), intrauterin 5. haftada vücut arka duvarında 10. torakal vertebra seviyesinde bir çift gonadal sırt halinde ortaya çıkarlar. Gonadal sırtlar, arka abdominal duvarı örten çöломik epitelin çoğalması ve bu epitelin altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşurlar (40,41). Her ne kadar fertilizasyon sırasında embriyonun cinsiyeti belli olsa da, gonadların embriyonun cinsiyetine ait morfolojik özelliklere sahip olması intrauterin 7. haftanın sonlarından itibaren başlar (42).

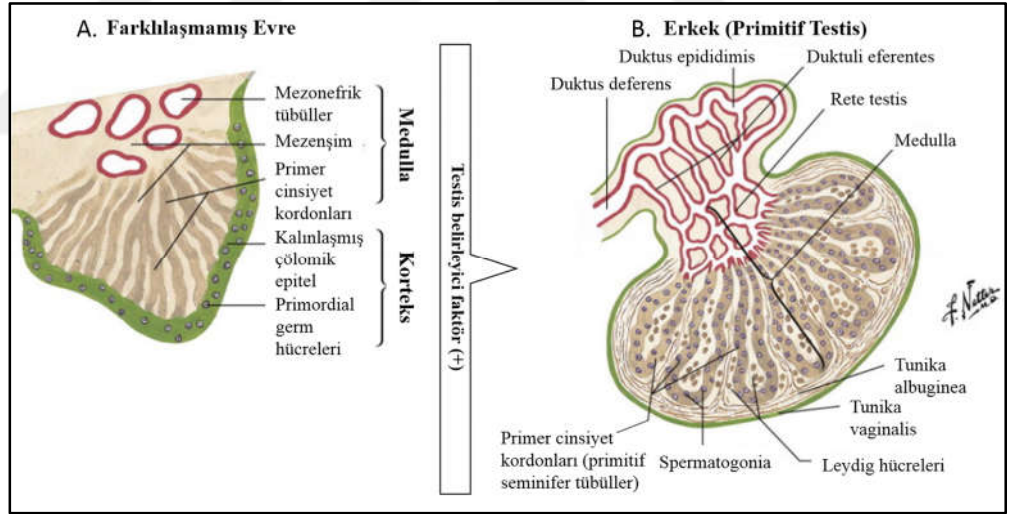
Gonadların gelişmesinde en önemli faktörlerden biri primordiyal germ hücreleri (PGH) göçüdür. Bu hücreler, intrauterin 2. haftada epiblasttan köken alıp primitif çizgi boyunca göç ederek, intrauterin 3. haftada vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. İntrauterin 4. haftada ameboid hareketlerle sonbağırsağın dorsal mezenterinin üzerinden geçerek, intrauterin 5. haftada primitif gonadlara ulaşırlar ve intrauterin 6. haftada da genital sırtları istila ederler (41,43). Böylece gonadlar, embriyonik olarak üç farklı yapıdan köken almış olurlar. Bunlar; arka abdominal duvarı örten çöломik epitel, onun altındaki mezenşim ve PGH'dir (44).

Gonadlara PGH'nin ulaşmasıyla, genital sırttaki epitel hücreleri prolifer olmaya başlar ve altlarındaki mezenşime gömülerek başlangıçta yüzey epiteline bağlı olan primitif cinsiyet kordonlarını (gonadal kordlar) oluştururlar (41,42). İntrauterin 7. haftaya kadar gonadlar; dışta bir korteksi, içte bir medullayı ve korteksten medullaya doğru parmaklı epitelyal kordlar olan gonadal kordları içerir. Gerek dişi embriyoda, gerek erkek embriyoda bu yapıya sahip gonadlar farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılırlar (44).

Bu haftadan itibaren, genetik olarak XY kromozomuna sahip erkek embriyoda Y kromozomu kısa kolu üzerindeki cinsiyeti belirleyen bölgenin varlığı kilit rol oynar. Bu bölge geninin kodladığı testis belirleyici faktör (TBF),

farklılaşmamış gonadal evrede olan gonadların testis yönünde farklanmasını sağlayan ana etkidir (40,42).

Erkek embriyoda; TBF'nin etkisiyle primitif cinsiyet kordonları, testis veya medullar kordonları oluşturmak için uzamaya ve çoğalmaya devam ederler. Primitif cinsiyet kordonları; gonad medullasının derinliklerine doğru ilerler. Kordonların periferal kısımları, puberteye kadar solid halde kalacak olan seminifer tübül taslaklarını oluşturur. Merkezi kısımları ise rete testis tübül ağını oluşturacak olan minik hücre sıraları halinde gonadın hilus kısmına doğru dağılır. Rete testis, mezonefrik tübüllerin epigenital tübüllerinden (kranial segment) köken alan duktali eferenteslerle birleşir. Duktali eferentesler ise mezonefrik duktustan gelişen duktus epididimis ile birleşirler. Mezonefrik tübüllerin kaudal segmentini teşkil eden paragenital tübüller ise, paradidimis adıyla bilinen rudimenter bir yapı olarak kalır. Gelişimin ilerleyen zamanlarında, yoğun fibröz bir bağ dokusu olan tunika albuginea testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır (41,42) (Şekil 1).



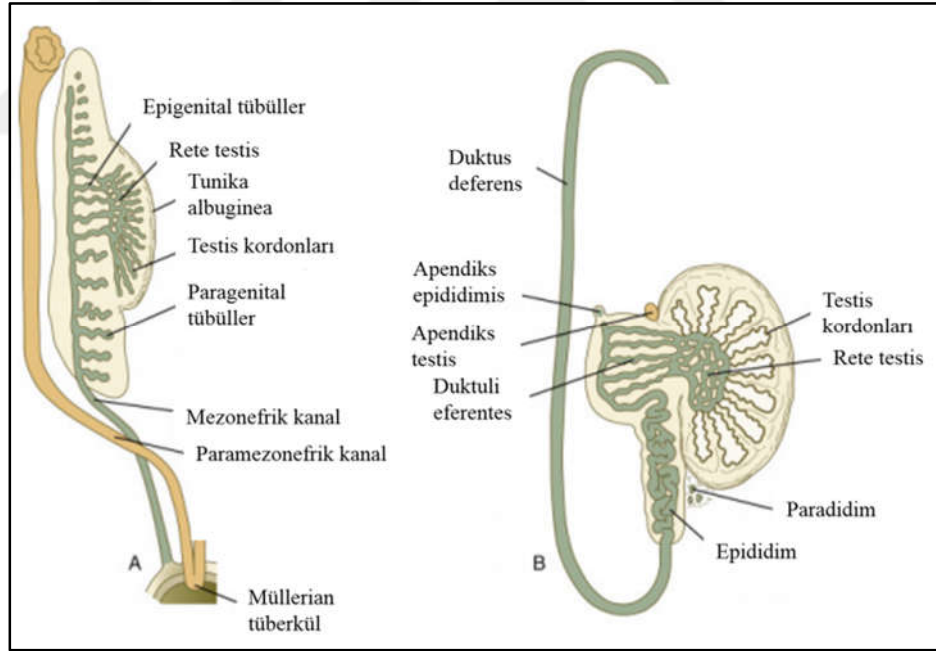
**Şekil 1: İntrauterin gelişmekte olan testisin illüstrasyonları.** A. Testisin gelişiminde farklılaşmamış evredeki gonad. B. TBF etkisiyle farklılaşma sonrası primitif testis (45).

İntrauterin 7. hafta boyunca yüzey epitelinden farklılaşan Sertoli hücreleri, germ hücreleriyle birlikte testis kordonlarını oluşturmak üzere düzenlenir (40). Fötal testislerdeki Sertoli hücreleri, 6-7. haftadan itibaren Mülleryan inhibitör madde (MIS) sentezlerler. Bu da erkek cinsiyette paramezonefrik duktusun; testis ucundaki rudimenter kalıntısı olan appendiks testis dışında gerilemesine neden olur (44).

Testis kordonlarının arasında gonadal sırtın orjinal mezenşiminden köken alan interstisyel Leydig hücreleri, kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişir. İntrauterin 8. haftada, Leydig hücrelerinin testosteron üretmesiyle genital kanal ve dış genital organlar maskülen yönde şekillenmeye başlar (42).

Maskülen yönde farklılaşan embriyoda mezonefrik kanallar; duktuli eferenteslere giriş yerinin hemen altından itibaren uzayıp, hayli kıvrıntılı bir hal alarak duktus epididimisi yapar. Mezonefrik kanallar, apendiks epididimis olarak bilinen en kranial parçası dışında gelişimini devam ettirerek diğer ana genital kanallar olan duktus deferens ve duktus ejakulatoryusu da oluşturur (40).

Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonlarının, pubertede lümenlerinin açılmasıyla seminifer tübüller oluşur. Seminifer tübüller, kanalize olarak rete testis tübülleri aracılığıyla duktuli eferenteslerle birleşir. Duktuli eferentesler de, rete testis ile mezonefrik kanaldan köken alan duktus epididimisi birbirine bağlar (40) (Şekil 2).



**Şekil 2: Testis ve erkek genital kanal sisteminin gelişimi.** A. İntrauterin 2. ayın sonu, B. Geç fetal dönem (41).

Testisler, intrauterin 2. ayın sonunda ürogenital mezenterle karın arka duvarına retroperitoneal olarak asılıdır. Gestasyonun 12. haftasında inguinal bölgeye gelip, 28. haftada inguinal kanaldan geçerek 33. haftada skrotuma ulaşmaktadırlar.

İntrauterin dönemde kısa süre fonksiyon gören ilkel böbrek olan mezonefrozun dejenerasyonu ile abdomenin her iki yanında birer yoğun mezenşimal bant (gubernakulum), gonadların inferiyor kutuplarından aşağıya doğru uzanır.

Periton, testislerin inişinden bağımsız olarak gubernakulumun ventralinden skrotal şişliğe doğru orta hattın her iki yanında vajinal proses olarak bilinen ve peritonun evajinasyonu olan cepler oluşturur. Bu cepler, karın ön duvarındaki diğer yapıları da beraberinde sürükleyerek inguinal kanalı şekillendirir. Prosesus vaginalisin distal son kısmı (tunika vaginalis), skrotum içinde testisin ön ve yan yüzlerini örterken; sap kısmı, peritonla bağlantısını kaybederek körelir (42,44).

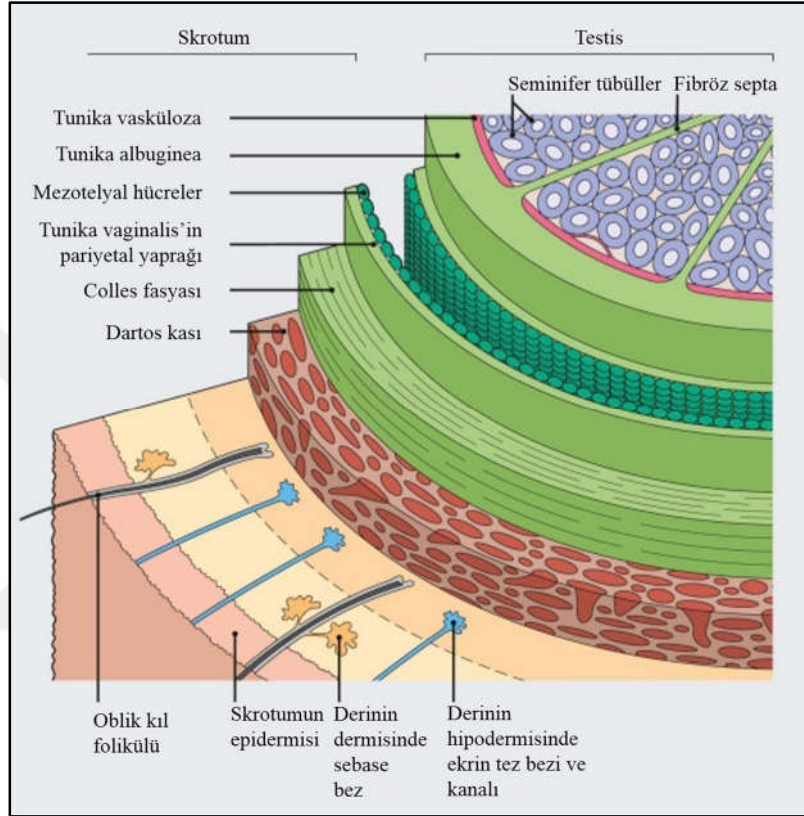
Testislerin skrotuma inişinde rol oynayan etmenler tam olarak bilinmemekle birlikte; bu inişe, testisin kaudalinden çıkan ve labiosktoral şişkinliklerin iç yüzeyinde sonlanan gubernakulum rehberlik etmektedir. Ayrıca fetal testisten salgılanan androjenlerin, karın içi basınç artışının, mezonefrozun gerilemesinin, MIS etkisiyle paramezonefrik kanalın gerilemesinin ve prosesus vaginalisin gelişiminin de bu inişe katkı sağladığı düşünülmektedir (42,44).

### **2.1.2. Testisin Anatomisi ve Histolojisi**

Erişkin testisler sperm ve testosteron üretiminde rol üstlenen oval şekilli, uzunluğu 4-5 cm, genişliği 2-3 cm ve anteroposterior çapı 3-4 cm olan bir çift bez yapısında organdır. Ağırlığı 12-20 g arasında değişen testisler, 15-25 ml hacme sahiptir. Skrotum içinde spermatik kord ile asılı bulunurlar ve fibröz median septum ile sağ ve sol testise ayrılırlar (46,47).

Testisler en dıştan içe doğru sırasıyla; deri, dartos kası, colles fasyası, tunika vaginalis, tunika albuginea yapılarıyla örtülüdür (46-48) (Şekil 3). Testisin 2/3'lük arteryal desteğini abdominal aortanın dalı olan testiküler arter sağlar. Kalan kısmını ise kremasterik arter (inferiyor epigastrik arterin dalı) ve vazal arter (internal ilyak arterden köken alan süperiyör vezikal arterin dalı) sağlar. Drenajında ise testisin venlerinin birleşmesiyle oluşan pampiniform pleksusu rol üstlenir. Pampiniform pleksus her iki tarafta testiküler vene drene olur. Sol tarafta, testiküler ven, sol renal vene açılırken, sağ tarafta ise vena cava inferiyora açılır (46).

Her bir testisi sağlam bir yapı olarak çevreleyen sıkı bağ dokusu yapısında bir kapsül olan tunika albuginea sarar. Tunika albugineadan uzanan septal uzantılar testisi en büyüğü ve en uzununu testisin merkezinde yer alan farklı büyüklüklerdeki 250 kadar lobüle ayırır. Her bir lobül, 1-4 adet çok kıvrımlı seminifer tübül ve etrafını çevreleyen interstisyel dokudan oluşur (46,49) (Şekil 3).



**Şekil 3: Testisi dıştan saran yapılar.** Testisi en dıştan içe doğru deri, dartos kası, tunika vaginalis ve tunika albuginea yapıları sarmaktadır (48).

Seminifer tübüller, tipik olarak uzun ve yüksek oranda sarmal yapılıdır. Tunika albugineanın testisin arka yüzünde kalınlaşmasıyla oluşan mediastinum testis; lobüllerin apikal kısımlarının bulunduğu ve daha az kıvrımlı seminifer tübüllerden zengin olan testis kısmıdır. Kan, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise mediastinum testisten girip çıkarlar. Kıvrımlı seminifer tübüller burada düzleşerek sadece Sertoli hücrelerinden oluşan tubuli rekti ile devam eder. (46,50). Tubuli rekti, mediastinum testis içerisinde, tübül sıvısının reabsorbe edilerek spermlerin konsantre edildiği yer olan rete testis ile anastomoz yapar. Rete testisin lümeni tek katlı kübik epitelle döşelidir. Duktuli eferentesler ise, spermlerin kaput

epididime taşınmasında rol oynayan 7-15 adet borucuk olup rete testisin devamıdır (46).

Her bir seminifer tübül, miyoid hücreler ve fibröz bağ dokusu kılıfı yapısındaki tunika propria ile çevrilidir. Spermatogenezin gerçekleştiği bu tübüller, kompleks ve çok katlı bir epitel ile döşelidir. Sertoli hücreleri ve çeşitli aşamalarda germ hücrelerini içeren ve germinal epitel olarak adlandırılan bu epitel, bir bazal lamina üzerine oturur (47,49). Bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru germinal epitelin barındırdığı hücreler şunlardır:

**Sertoli hücresi:** Seminifer tübülün bazal membranına yerleşik olan bu hücrenin, tübülün lümenine kadar uzanan oldukça uzun bir sitoplazması bulunur. Sahip olduğu oval nukleus bazal membrana dik açıyla yerleşmiştir ve tübülün lümenine bakan kısımda derin girintilere sahiptir. Sertoli hücresinin sitoplazması orta derecede mitokondri ve lipid damlacıkları, az miktarda düz endoplazmik retikulum, bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum, lizozom, geniş bir Golgi aygıtı ve zengin bir hücre iskeleti içerir (44,51). Bu kadar yoğun organelle sahip olan bu hücrenin, sayılamayacak kadar çok görevi mevcuttur. Diğer hücrelerle yaptığı sıkı bağlantı kompleksleri ile kan-testis bariyerini oluşturmak; spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek bu görevlerden bazılarıdır. Ayrıca folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarısıyla androjen bağlayıcı protein (ABP)'i sentezler, ABP aracılığıyla seminifer tübülde testosteron konsantrasyonunu sistemik dolaşıma göre 50-100 kat fazla tutar ve bu şekilde spermatogenezise katkı sağlar. Spermiyogenezis sonrası oluşan artık cisimcikleri fagosite etmek, spermlerin lümenine salınımını sağlamak ve seminifer tübül lümenine protein, laktat ve iyonlardan zengin sıvı salgılamak da Sertoli hücresinin görevleri arasında yer alır (51-53) (Resim 1).

**Spermatogonyum:** Erişkin testiste seminifer tübülün bazal laminası üzerine yerleşik, farklılaşmamış diploid germ hücresidir (54). Pubertede testosterondan etkilenerek hücre siklusuna girer. Hücresel ve nükleer boyutlarına, nükleer kromatinin dağılımına, histokimyasal ve ultrastrüktürel özelliklerine göre koyu tip A, açık tip A ve tip B spermatogonyum olmak üzere üç farklı tipi mevcuttur (53). Koyu tip A spermatogonyumlar yoğun bazofilik boyanmış bol heterokromatinli, bir ya da iki küçük nukleolus içeren oval nükleusa sahip hücrelerdir. Mitotik olarak çoğalarak kendi popülasyonlarını oluştururlar ve ayrıca tip B spermatogonyumun öncülü olan

açık tip A spermatogonyumlara da dönüşebilirler. Açık tip A spermatogonyumlar; bol ökromatin içeren, bir veya iki nukleolusu olan oval nukleuslara sahiptir. Tip B spermatogonyumların ise, nukleer zar boyunca ve santral yerleşimli tek nukleolusun çevresinde geniş kümeler oluşturacak biçimde yoğunlaşmış kromatine sahip yuvarlak nukleusları mevcuttur (46–48,53) (Resim 1).



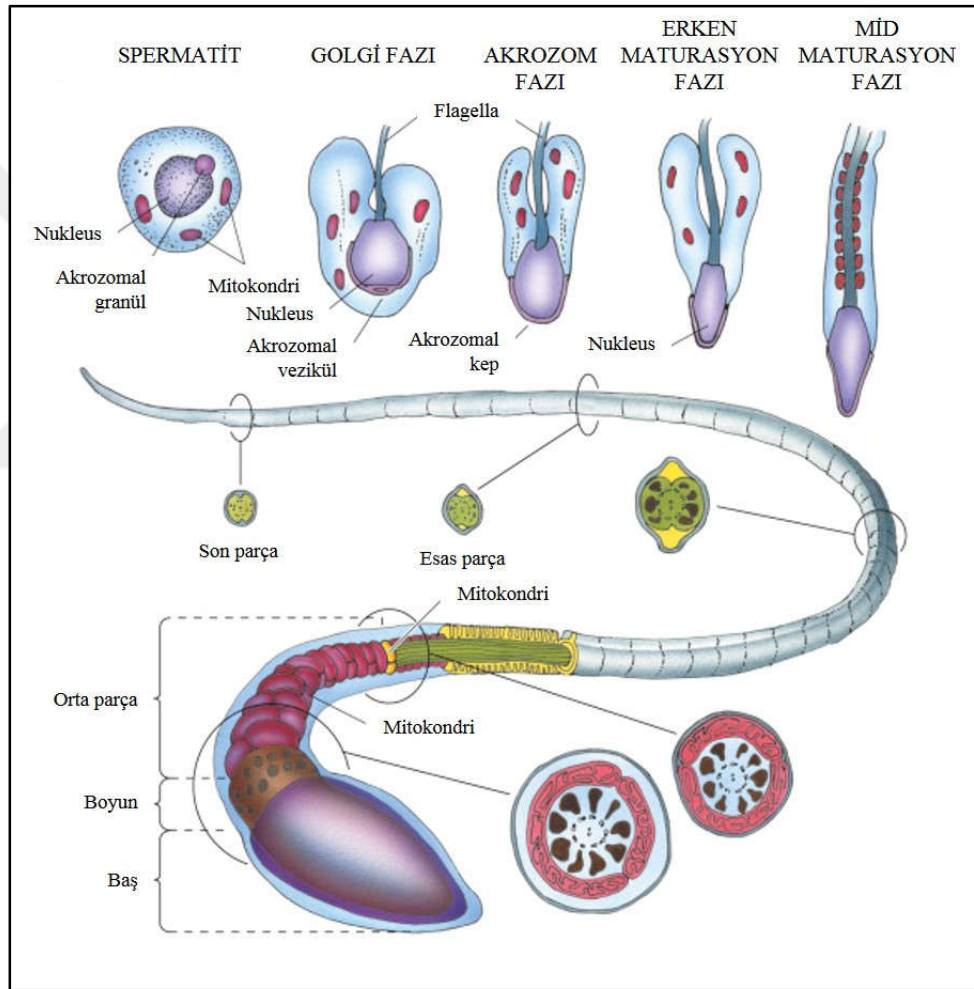
**Resim 1: Testisin histolojik kesiti.** Kesitte sperm, primer spermatozoon, yuvarlak spermatozoon, uzamış spermatozoon, spermatozoon, Sertoli hücresi, Leydig hücresine ve miyoid hücreye birer örnek gösterilmektedir (H&E, X400).

**Primer ve sekonder spermatozoon:** Primer spermatozoon, tip B spermatozoonun mitoz bölünmesi ile oluşan yuvarlak nukleuslu hücredir. Oluştuktan hemen sonra I. mayoz için senteze başlaması nedeniyle; iki katına çıkmış Deoksiribonükleik asit (DNA) miktarına ve diploid kromozom sayısına sahiptir. Bu nedenle seminifer epiteldeki en büyük germinal hücredir. Çekirdekleri, kromozomları kondensasyonun çeşitli aşamalarında olduğundan, veziküler görünümlüdür (53). Birinci mayoz bölünmeyi tamamladığında, DNA ve kromozom sayısı primer spermatozoonu göre yarıya inmiş iki yavru hücre oluşturur. Oluşan bu hücrelerin her biri sekonder spermatozoonu. Sekonder spermatozoonu, hızlıca II. mayoz bölünmeye girerek yuvarlak spermatozoonu dönüşürler. Bu nedenle histolojik



kesitlerde nadiren görülebilen, primer spermatosite kıyasla daha küçük hücrelerdir (46,53) (Resim 1).

**Spermatid:** Sekonder spermatositin mayoz bölünmeyi tamamlaması sonucu yuvarlak spermatidler oluşur. Bu hücreler daha sonra geçirdikleri spermiyogenezis ile çeşitli morfolojik değişimler sonucunda sperme dönüşen germinal epitel hücreleridir. Haploid kromozoma sahip spermatid, spermiyogenezis sürecinde 4 farklı aşamadan geçer ve her aşamada farklı özellikler sergiler. Bu aşamalar sırasıyla golgi fazı, kep fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazıdır (47) (Şekil 4).



**Şekil 4: Erken spermatidin spermiyohistogenezis sırasındaki morfolojik değişimleri ve olgun spermin yapısı.** Spermiyohistogenezise ait Golgi, akrozom ve maturasyon fazları ile spermin baş, boyun, orta parça, esas parça ve son parçaları gösterilmektedir (53).

*Golgi fazında*, spermatid yuvarlaktır ve spermatidde hidrolitik enzimleri içeren akrozomal vezikül oluşumu söz konusudur. Hücrede, çok sayıda mitokondri,

iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve proakrozomal granüllerin depolandığı Golgi aparatı bulunur. Akrozomal vezikül oluşurken sentrioller nukleusun çevresinden ayrılır ve bunlardan biri geçici olarak flagellar aksonemin oluşumuna katılır (Şekil 4).

*Kep ve akrozom fazında*, akrozomal vezikülün boyutu artarak maksimum boyuta ulaştığında artık akrozomal kep olarak adlandırılır. Nükleer içerik hızlıca yoğunlaşır. Akrozomal faz spermatidin morfolojisinde ciddi değişikliklerle karakterizedir. Spermatidin kondanse nukleusu, başı ve mikrotübüllerin etkisiyle kuyruğu uzar ve mitokondriler kuyruğun orta parçasına doğru yer değiştirirler. Yine bu aşamada; dış yoğun fiberler, fibröz kılıf ve tam bir kuyruk oluşur (Şekil 4).

*Maturasyon fazında* ise birbirine bağlı spermatidlerin sitoplazmik köprüleri yıkılır ve spermatid, Sertoli hücrelerinin fagosite etmesiyle, fazla sitoplazmasından kurtulur. Sitoplazmik bağlantılardan kurtulan spermatid, spermiyasyon adı verilen süreçle seminifer tübül lümenine sperm olarak salınır (47,53) (Şekil 4).

**Sperm:** Seminifer tübül lümenine salınan sperm yapısal olarak olgun olmasına rağmen hareketsizdir. Başı minimal sitoplazmaya sahiptir ve yaklaşık 4,5 µm x 3 µm x 1 µm ölçülerindedir. Başın ön tarafı hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi enzimleri içeren akrozomal kep ile örtülü; kondanse koyu boyanan kromatinli ve uzun bir nükleusa sahiptir. Baş kısmı yaklaşık 0.3 µm uzunluğunda kısa bir boyuna bağlıdır. Boyun, orta parça (7 µm), esas parça (40 µm) ve son parça (5-7 µm) birlikte sperm kuyruğunu oluşturur (46-48,53) (Şekil 4).

Seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyel doku; gevşek bağ dokusu özelliğinde olup fibroblast, mast hücresi ve gevşek bağ dokusunun diğer hücresel elemanlarını içermesinin yanısıra interstisyel hücre olarak da adlandırılan Leydig hücresini de içerir (53) (Resim 1). Periferinde bir veya iki nukleolu olan, dağınık kromatinli yuvarlak bir ya da iki nukleusa sahiptir. Geniş eozinofilik sitoplazması vardır. Bu sitoplazma tübül kristal mitokondri, büyük düz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi aygıtı, çok sayıda lipid vakuelleri ve fonksiyonu henüz bilinmeyen ve sadece yetişkinlerde bulunan Reinke kristalleri içerir (53,54). Bu hücrelerin ana fonksiyonları; luteinleştirici hormon (LH) etkisiyle testosteron salgılayarak intrauterin dönemde erkek seksüel kanal sisteminin ve dış genitalyanın farklılaşmasını; puberte döneminde ise sekonder seksüel karakterlerin gelişmesini

sağlamaktır. Bunun yanısıra seminifer epitelin fonksiyonunun sürdürülmesinde de esas rolü üstlenir (41,54).

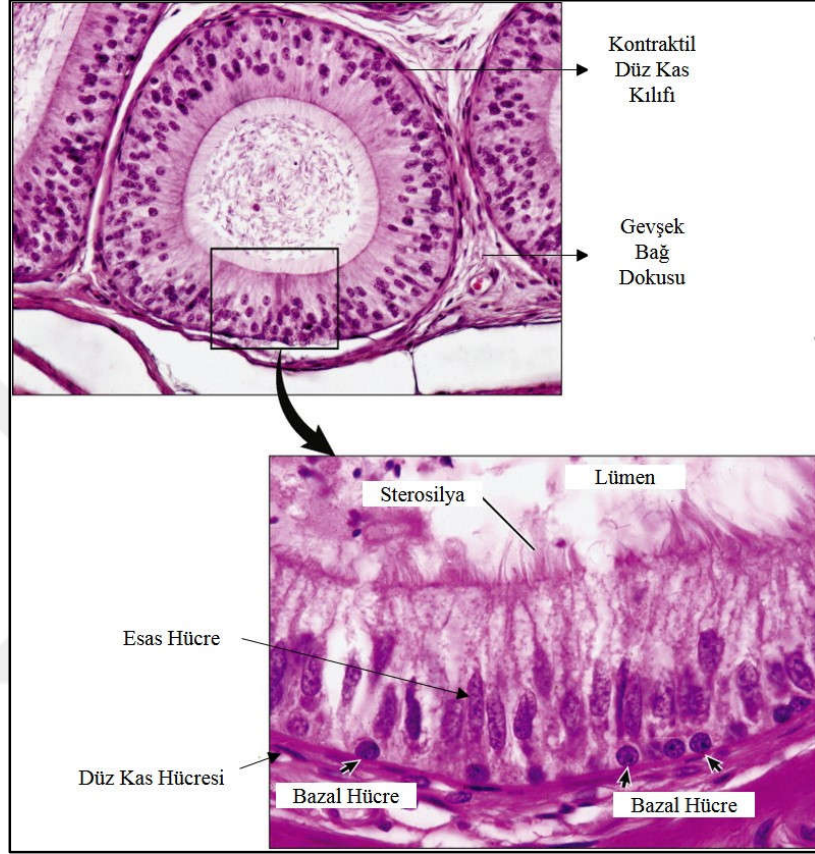
### 2.1.3. Epididimin Anatomisi ve Histolojisi

Epididim, spermin hareket kazanarak olgunlaşmasından ve depo edilmesinden sorumlu yaklaşık 5 cm uzunluğunda, 1 cm genişliğinde; testisin hafifçe lateralinde ve arkasında uzanan ekstratestiküler genital boşaltım kanalıdır (46,48,51). Duktuli eferentes ve duktus epididimisin oluşturduğu epididim; tunika vaginalis ile tamamen sarılı olup anatomik olarak 3 kısma ayrılır: kaput, korpus ve kauda. Duktuli eferentes, testisin üst kutbunda kaput epididimisteki epididimal kanallara açılır. Kauda epididimis ise, distalde vas deferensin kıvrımlı kısmına bağlanır (48,50,53).

Kaput epididimis, epididimin proksimal segmentidir; lümeni silyasız kübik ve silyalı prizmatik hücrelerin oluşturduğu yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli kıvrıntılı yapıdaki duktuli eferentesleri içerir. Bu kanallar, kaput epididimiste epididimin uzunluğu boyunca tek, kıvrımlı başka bir kanalla (duktus epididimis) anastomoz yapar (46,47,53).

Duktus epididimis epididimin kaput kısmının bir parçasını, korpus ve kauda kısımlarının tamamını oluşturur ve yaklaşık 5-6 m uzunluğundadır. Bu kanal; kontraktıl düz kas kılıfı ve fibroblast, kollajen, glikozaminoglikan ve vasküler yapıların bulunduğu gevşek bağ dokusu ile çevrilidir (48,49,51). Duktus epididimisin lümenine bakan kısmı; yalancı çok katlı prizmatik stereosilyalı epitelle döşelidir (Şekil 5). Bu epitel; esas, bazal, berrak, apikal, dar ve halo hücrelerini barındırır. Esas hücreler, buradaki hücreler toplamının %80'den fazlasını oluşturur ve stereosilya yapısına sahip olup, büyük ölçüde epididim kanalı içerisindeki mikroçevrenin korunmasından sorumludur. Bu hücrelerin birbirleriyle yapmış oldukları sıkı bağlantılar, kan- epididim bariyerini teşkil eder. Bazal hücreler, bazal membrana komşu olan ve esas hücrelerin altında yer alan, hücre fonksiyonunu destekleme ve sinyalleşmeden sorumlu kök hücrelerdir (48,53) (Şekil 5). Apikal hücreler, mitokondriden zengin olup kaput epididimde baskındır. Berrak hücreler ise kauda epididimde daha fazla bulunur (51). Bu iki hücre birlikte H<sup>+</sup>-ATPaz içerirler ve lümeninde asitli ortamın sürdürülmesi için lümenine hidrojen iyonu sekrete ederler.

Ayrıca bu hücrelerin endositik aktiviteleri nedeniyle epididimal lümenenden materyali uzaklaştırdıkları düşünülmektedir. Halo hücreleri ise epididimde T hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve monositleri içeren immuniteden sorumlu hücrelerdir. (48,49,51).



**Şekil 5: Duktus epididimisin histolojik görünümü.** Duktus epididimisler arasında gevşek bağ dokusunun yer aldığı, duktus epididimisin kontraktıl düz kas kılıfı ile çevrelediği ve yalancı çok katlı prizmatik stereosilyalı epitelin esas ve bazal hücrelerini barındırdığı görülmektedir (49).

Her bir epididimal kanal, ince bir dairesel kontraktıl düz kas kılıfı ile çevrilidir (46). Sperm için depo görevi gören kaudal epididimiste ise içeriğin boşaltılmasını kolaylaştırmak için, bu dairesel kontraktıl kılıfın hem içinde hem de dışında uzunlamasına seyreden ilave düz kas katmanı da bulunur (48,51).

## 2.2. Siklofosfamid

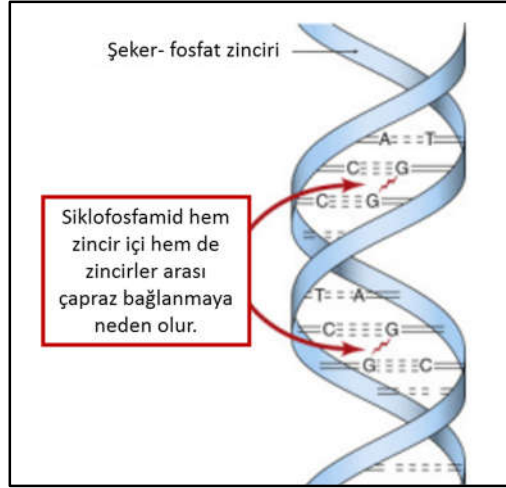
Alkilleyici ajanlar, antineoplastik tedavide kullanılmalarının yanısıra otoimmün hastalıklardaki immüsupresif tedavinin de önemli komponentini oluştururlar. Her ne kadar olumsuz bir şekilde enfeksiyon insidansında artış, reproduktif toksisite ve malign neoplazi gelişimine sebep olabilseler de klinikte yaygın kullanılırlar (24,55–57). Bu ajanlar; nitrojen mustard, nitrozüre, platinum bileşikleri ve diğerleri olmak üzere alt gruplara ayrılır. Siklofosfamid (2H-1,3,2-oksazafosforin, 2-[bis(2-kloroetil) amino] tetrahidro-2-oksit) ise bu gruplardan nitrojen mustard grubunda yer alır ve klinikte en sık kullanılan ve en iyi bilinen alkilleyici ajanlardan biridir (1,58,59).

### 2.2.1. Emilimi, Metabolizması ve Atılımı

Oral yoldan verildiğinde de göreceli olarak iyi emilen CP, intravenöz uygulamayla benzer biyoyararlanıma (%75) sahip bir ön ilaçtır. Hepatik sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilerek, aktif olan PM ve toksik olan akrolein adlı iki son bileşiğe dönüşür. Plazma yarılanma ömrü 4 ile 6,5 saat arasında değişir ve yaklaşık %15'i değişmeden idrarla atılır (57,60).

### 2.2.2. Etki Mekanizması

Siklofosfamidin metabolizasyonu ile oluşan PM bileşiği, DNA'da çapraz bağlar oluşturarak DNA'yı alkiler (2,59,60). Siklofosfamidin DNA'yı alkilemesi rastgele bir süreç değildir ve daha çok DNA'da elektron ve temel azottan zengin olan bölgeleri hedef alır (1). Bu bölgelerden biri olan guaninin 7. pozisyonundaki azot atomuna ilgi özellikle fazladır (59). Deoksiribonükleik asitin sarmal düzeninde görülen iki şeridinde istiflenmiş bazlar, iki ayrı DNA zincirinin her birine saldırı için elverişli bir yapı düzeni oluşturur. Bu yapı sayesinde CP, DNA'da hem zincir içi hem de zincirler arası çapraz bağlanma ile DNA'yı alkilleyerek DNA'nın replikasyonunu engeller ve bu şekilde replike olabilen sağlıklı-sağlıksız tüm hücrelerde etkileri ortaya çıkar (1) (Şekil 6).



**Şekil 6: Siklofosfamidin etki mekanizması.** Siklofosfamid özellikle zincir içi ve zincirler arası guanin-guanin bağlantılarını hedef alır (59).

### 2.2.3. Hazırlanması ve Uygulanması

Siklofosfamid, 25 ve 50 mg tabletler; parenteral uygulama için 100, 200, 500 mg, 1 g ve 2 g'lık flakonlarda toz halinde bulunur. Parenteral uygulama için her 100 mg ilaç 5 ml koruyucu içermeyen steril su eklenerek çözülür. Siklofosfamidin hazırlanmış çözeltisi oda sıcaklığında 24 saat ve buzdolabında 6 gün boyunca kimyasal olarak kararlı bir şekilde muhafaza edilebilir (60).

### 2.2.4. Tıpta Kullanım Endikasyonları

Siklofosfamid; sistemik lupus eritematoz, Wegener granülomatozu, romatoid artrit, poliarteritis nodosa, Takayasu arteriti gibi otoimmün inflamatuvar hastalıklarda ve transplantasyon sonrası rejeksiyonu önlemek için immünsupresyon amacıyla kullanılır (57,61). Antineoplastik amaçla da lenfoma, lösemi, myeloma, meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri gibi kanserlerde kullanılır (60,62,63). Ayrıca kemik iliği supresyonu yapması nedeniyle kemik iliği transplantasyonunda da tercih edilir (60).

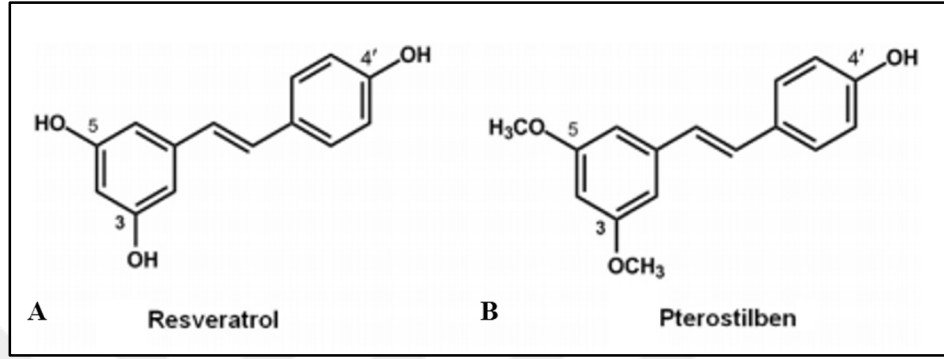
### 2.2.5. Yan Etkileri

Siklofosfamidin metabolizasyonu sonucu oluşan akrolein maddesi toksik etkilerin temel sebebidir. Bunun yanında hücre replikasyonunu engelleyen PM metaboliti de bölünen sağlıklı hücrelerde yan etkilerin görülmesine neden olur. Bu metabolitlerin sağlam hücreleri etkilemesi sonucu birçok yan etki ortaya çıkar (60,64). Bu yan etkilerden majör olanı kemik iliği supresyonudur. Trombositopeni ve anemi yapmakla birlikte primer etkilediği ana seri myeloid seridir (65). Gastrointestinal sistem yan etkilerinden bulantı ve kusma sık görülmekle beraber hepatotoksisite de görülebilir (66,67). Hemorajik sistit ve mesane kanseri ise üriner sisteme ait yan etkilerdir (60,68). Bunlar dışında deri ve tırnak hiperpigmentasyonu ile alopesi de diğer yan etkiler arasında yer alır (67,69). Ayrıca kardiyovasküler sistemde, akut myokardiyal nekroz ve ciddi kardiyak yetmezliğe sebep olmakla birlikte solunum sisteminde, pnömonit ve interstisyel pulmoner fibrozise sebep olabilir (70–74). Kronik CP kullanımıyla baskılanan immünite sonucunda, enfeksiyonlarda artış ve ayrıca sekonder malignansiler de görülebilir (75,76). İlave olarak CP kullanımının önemli sonuçlarından biri de infertilitedir. Dişide; menstrual bozukluklar ve prematür ovaryan yetmezliğe neden olabilir. Erkeklerde ise; testis dokusunda oksidatif stres, apoptoz artışı ve testosteron seviyelerinde düşüşe yol açabilir. İlave olarak sperm sayısı, hareket ve canlılığında azalma ve morfolojisinde bozulmalara neden olabilir. Bu sperm parametrelerinin bozulması ile erkeklerde infertiliteye sebep olabilir (55,77,78).

### 2.3. Pterostilben

Fenolik bileşiklerin alt grubu olan stilbenler 200-300 g/mol moleküler ağırlığına sahip bitkisel bileşiklerdir (79). Hint kino ağacı, üzüm ve yaban mersini gibi bitki türlerinde doğal olarak bulunurlar (80–82). Bitkilerde, fitoaleksinin görevi görürler; yani onları mantar enfeksiyonlarına ve toksinlere karşı korumak için rol üstlenirler (82,83). Stilben ailesinin tüm üyeleri iki fenil grubu içerir; C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> temel iskelet yapısına sahiptirler ve cis veya trans izomer yapısında olabilirler (81,84). Resveratrol ve Ptr bu grubun iyi bilinen iki örneğidir.

Pterostilben (trans-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene, 4-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl) ethenyl] phenol); stilbenlerin daha yaygın ve stabil olan trans izomeri yapısındadır (83,84). Pterostilben, stilbenlerin en popüler olanı ve üzerinde en çok çalışılan olan resveratrolün dimetil eter analogudur (85,86). Yani bir fenil halkasındaki 3,5-dimetoksi yapısıyla resveratrol'den ayrılır (87) (Şekil 7).



Şekil 7: Resveratrol ve Ptr'in kimyasal yapıları. A. Resveratrol. B. Pterostilben (88).

Yapısındaki 3,5-dimetoksiden ötürü Ptr resveratrol'den daha lipofilik özellik kazanır. Bundan dolayı membran permeabilitesi daha yüksektir. Dolayısıyla biyoyararlılığı daha fazla olup biyolojik olarak daha aktiftir (87,89). Biyolojik olarak daha aktif olmasının bir diğer sebebi ise Ptr'in metabolizasyonu için glukuronidasyona ve sülfasyona uygun sadece bir tane serbest hidroksil grubu içermesidir. Bu nedenden dolayı metabolik olarak daha stabildir (90). Ayrıca renal ekskresyonu oldukça düşük olan Ptr'in metaboliti enterohepatik sirkülasyona katılır (91). Bu da biyolojik olarak daha aktif olmasına katkı sağlar. Oral uygulamada Ptr'in biyoyararlılığı %80 ve yarılanma ömrü ortalama 104 dakika olarak tespit edilmiştir (87,91).

Kuvvetli bir antioksidan olması yanında Ptr'in; antiinflamatuvar, antiapoptotik ve kanser hücreleri için apoptotik etkileri de mevcuttur. Yapılan çok sayıda çalışmada Ptr'in farklı dokular, organlar ve sistemler üzerindeki bu etkileri ayrıntılı olarak Tablo 1'de gösterilmiştir.



**Tablo 1: Pterostilbenin biyolojik etkileri.**

<b>Sistemler</b>	<b>Biyolojik Etki</b>
Santral Sinir Sistemi	Nöroprotektif etki (31,32,92)
Kardiyovasküler Sistem	Kardiyoprotektif etki (30,34) Antihipertansif etki (33) Trombosit agregasyonunu inhibe edici etki (93)
Solunum Sistemi	Akut akciğer hasarını azaltıcı etki (94) Antikanserojenik etki • Akciğer kanseri (95,96)
Gastrointestinal Sistem	Hepatoprotektif etki (29,97,98) Antikanserojenik etki • Pankreas kanseri (36,99) • Hepatosellüler kanser (100) • Kolorektal kanser (101,102)
Üriner Sistem	Renal fibrozisi azaltıcı etki (103) Nefroprotektif etki (104) Antikanserojenik etki • Mesane kanseri (105)
Genital Sistem	Testis iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki (106) Antikanserojenik etki • Endometrium kanseri (37) • Meme kanseri (39) • Over kanseri (38) • Prostat kanseri (89)
Endokrin Sistem	Glukoz seviyelerini düşürücü etki (35) Antiobezitik etki (107)

#### **2.4. Testosteron**

Androjenler, XY kromozomuna sahip bireylerde karakteristik erkek özelliklerini sağlaması yanında; erkek cinsiyete spesifik testis, prostat, epididim, seminal vezikül ve penis gibi üreme dokularının gelişimi ve sağlıklı bir şekilde devamlılığının sürdürülmesi için de gereklidir (108,109).

Erkeklerde, dolaşımdaki temel androjen %95 oranında Leydig hücrelerince sentezlenen ve her gün yaklaşık 6-7 mg üretilen testosteron hormonudur (110). Bu hormon steroid yapıdadır ve sentezi için ana kaynak kolesteroldür. Üretiminden sonra dolaşıma verilen testosteron, büyük oranda kanda seks hormonu bağlayan globüline ve albümine bağlanarak hedef dokuya taşınır. Dokuya ulaşan testosteron daha aktif formu olan dihidrotestosterona dönüşerek hücre içi işlevlerini yerine

getirir. Dokulara ulaşmayan testosteron ise karaciğerde başlıca androsteron ve dihidroepiandrosterona dönüşerek safra veya idrar yoluyla atılır (109,111).

Testosteron, intrauterin 8. haftada Leydig hücrelerince sentezlenmeye başlar ve testosteron sentezi, fetal yaşam boyunca plasental human koryonik gonadotropin uyarısıyla devam eder. Ayrıca bu hormon postnatal 1 yaşa kadar da etkisini sürdürür. Daha sonraki yıllarda, 10- 13 yaşlarına gelinceye kadar, testislerde testosteron üretilmez. Ancak puberte döneminde, ön hipofizden salgılanan LH'nin etkisiyle, testosteron yapımı hızla artar ve 50 yaşından sonra da düşmeye başlar (109).

Testosteronun intratestiküler etkileri, testisteki androjen reseptörü bulunan hücrelerde karşımıza çıkar. Mevcut bilgiler ışığında bu hücreler; Leydig hücreleri, miyoid hücreler ve Sertoli hücreleridir. Leydig hücrelerinin fibroblast öncüllerinden farklılaşmasını indükleyebilen testosteron; miyoid hücrelerin kasılmasını da başlatabilir (112,113). Ayrıca ratlarda gösterilen bir etkisi, Sertoli hücresi-spermatid adhezyonunda rol almasıdır (114). Bunlar haricinde testosteron; erken primer spermatositin bazalinde, yeni sıkı bağlantı proteinlerinin sentezini stimüle ederek kan-testis bariyerinin oluşmasına da katkı sağlar (52).

Sertoli hücresi, FSH uyarısı ile testosteronu bağlayan ve onun seminifer tübülün adlüminal kompartımanına taşınmasını sağlayan ABP'yi üretir. Testosteronun ABP'ye bağlanması da seminifer tübülde testosteron konsantrasyonunu artırarak spermatogenezin seyrinde güçlü bir etki ortaya koyar (41).

## **2.5. Apoptoz ve Kaspazlar**

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında kullanılmış olup, hücrenin kontrollü ya da programlı olarak ölüme gitmesi olarak ifade edilebilir (115). Embriyo gelişimi ve menstrual siklus gibi durumlarda fizyolojik olarak ortaya çıkabileceği gibi; kemoterapi, radyoterapi, aşırı sıcak, soğuk ve hipoksi gibi etkenler nedeniyle patolojik olarak da ortaya çıkabilir (116,117). Apoptoz sayesinde fizyolojik durumlarda; artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin ortadan kaldırılması ve dokularda farklı hücre popülasyonlarının ortaya çıkması sağlanır. Patolojik durumlarda ise,

çeşitli faktörlerin doğrudan veya serbest radikaller aracılığıyla DNA hasarı yapması gibi nedenler apoptoza yol açabilir (11).

Apoptotik süreç, hücrede normalde inaktif halde bulunan ve kaspaz olarak bilinen sistin aspartik proteazların aktivasyonu ile başlar (115,117). Apoptozda görev alan çok sayıda kaspaz mevcuttur. Bu kaspazların başlıcaları; hücre hasarlandığında ilk olarak aktive olan başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9) ve başlatıcı kaspazlar tarafından aktifleştirilen cellat kaspazlardır (kaspaz 3, 6, 7) (115). Başlatıcı ve cellat kaspazların aktivasyonu; nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yıkımını ve çekirdekte endonükleazların aktivasyonu ile DNA fragmentasyonunu başlatır. Sonuçta hücre, apoptotik cisimler olarak adlandırılan ve etrafı fagositik hücreler için ligandlar eksprese eden hücre zarı ile çevrili parçacıklara bölünür (11,115).

Apoptoz, hücrede temel iki yolakla başlar ve bir noktadan sonra bu iki yolak birleşir. Bu yollardan biri, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine çeşitli ölüm sinyallerinin bağlanmasıyla başlayan ekstrinsek yolak; diğeri ise mitokondriyal porlardan sitozole proapoptotik moleküllerin salındığı intrinsek yolaktır (11,115,118).

Ekstrinsek yolak, yağ asidi sentaz (Fas) ligandı ve Tümör Nekrotizan Faktör (TNF)- $\alpha$  gibi ölüm sinyallerinin; kendilerine özgü Fas ve TNF Reseptörü 1 gibi hücre zarı ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu bağlanma ile ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşur ve bu kompleks doğrudan prokaspaz 8'i kaspaz 8'e aktive eder. Kaspaz 8, ya direkt olarak ya da prokaspaz 9'un aktivasyonu ile prokaspaz 3'ü aktive eder (115,117,118).

Intrinsek yolak ise, sitotoksik uyarıların hücre içinde ürettikleri sinyaller ile direkt olarak hedefleri etkilemeleri ve bunların sonucunda mitokondrilerden sitozole salınan proapoptotik proteinlere bağlıdır (115,117). Bu hücre ölüm sinyalleri, mitokondriyal membran yapısında değişikliğe ve çok sayıda por oluşumuna yol açarak mitokondriden sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerin salınımına neden olur. Sitokrom c, Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör (APAF)-1'i bağlar ve aktive eder; prokaspaz 9'un da aktivasyonu ve katılımı ile oluşan apoptozom da prokaspaz 3'ün aktivasyonunu sağlar. (115,117,118).

Ekstrinsek ve intrinsek yolak, aktive kaspaz 3 oluşumu ile sonuçlanır. Aktive kaspaz 3 ise; endonükleazların aktivasyonu ile kromozom bozulmasına ve

proteazların aktivasyonu ile nükleer protein ve hücre iskeletinin bozulmasına neden olarak kromatin ve hücre iskeletinde kondansasyon yapar. Hücre yuvarlaklaşır, küçülür, sitoplazma ve özellikle çekirdek yoğunlaşır, organeller daha sıkı paketlenir, hücrenin komşu hücrelerle bağlantısı kesilir, nükleer fragmantasyon ve hücre membranında blebler ortaya çıkar. Hücre, apoptotik cisimleri oluşturmak üzere parçalanır ve fagositer hücreler tarafından ortadan kaldırılır (117,119).

## **2.6. Oksidatif Stres ve Oksidan– Antioksidan Parametreler**

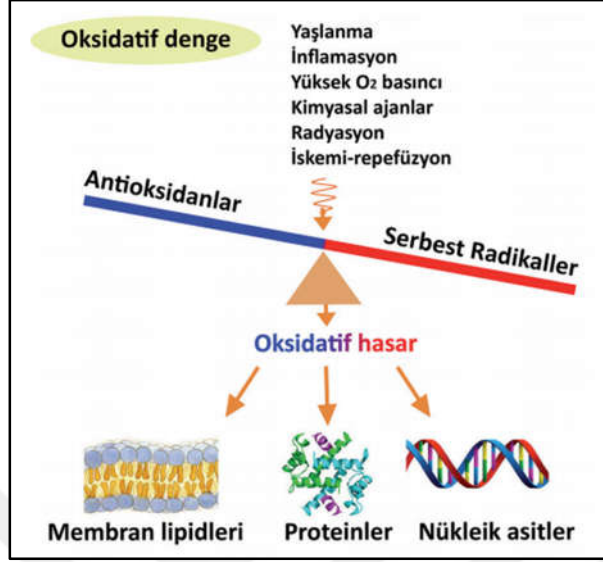
Sağlıklı çalışan biyolojik sistemlerde fizyolojik olarak da üretilen reaktif oksijen türleri (ROS); güçlü antioksidan enzimler ve enzim dışı antioksidan sistemler ile dengelenir. İmmün sistemde patojenlerin öldürülmesinde görev alan, birçok hücre içi sinyal yolağında sekonder mesajcı olarak görev yapan ROS'un; bu gibi normal hücre içi işlevleri sırasında fazla miktarda oluşması oksidatif stresi indükleyebilir. İlave olarak antioksidan sistemlerdeki yetersizlikler, inflamatuvar hücrelerden lokal salınım, ilaç, hipoksi, radyasyon gibi nedenlere sekonder olarak da oksidatif stres ortaya çıkabilir (120,121) (Şekil 8). Reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılamaması sonucu oluşan oksidatif stres ise; DNA hasarı, apoptoz, nekroz gibi patolojik olaylarla sonuçlanabilir (120,122,123).

Hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi başlıca ROS, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron içerirler. Kısa ömürlü ve reaktif moleküller olup özellikle membran lipidlerini hedef alırlar. Böylece hücreye ait organellerin gerek yapısında gerekse fonksiyonunda hasara yol açarlar. Lipid hasarı sonrası son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçümü membran lipid hasarını göstermede kullanılabilir (120,121,124,125).

Saldırgan ve kararsız moleküller olan ROS, hem proteinlerdeki hem de serbest haldeki aminoasitlere saldırabilir. Bu yapıların oksidasyonu sonucunda oluşan protein karbonil deriveleri oksidatif stresin hücre proteinleri üzerindeki etkilerini göstermede iyi bir belirteçtir (120,121).

Hem çekirdek hem de mitokondriyal DNA yapısında bulunan nükleik asitlerdeki bazlar ve şekerler de ROS tarafından hedef alınabilir. Bunun sonucunda

DNA zincirinde kırılmalar, tamirinde aksamalar, mutasyonlar ve mitokodriyal enerji üretiminde bozulmalar görülebilir.



**Şekil 8: Oksidatif denge ve hasar.** Serbest radikaller lehine artış oksidatif hasara neden olarak membran lipidleri, proteinler ve nükleik asitlerde hasara neden olabilir (120).

Oksidatif stresin oluşmadan önlenmesi ve oksidatif dengenin sağlanması için, oluşan ROS'un antioksidanlarca detoksifiye edilmesi gereklidir (120,121,126). Oksidatif strese karşı organizmayı koruyan antioksidanlar, organizmada her zaman hazır olarak bulunan enzimatik ve nonenzimatik (endojen) antioksidanlar olabileceği gibi; ekzojen antioksidanlar gibi organizmaya dışarıdan da alınabilirler. Ekzojen antioksidanlar arasında A, E ve C vitaminleri; ksantin oksidaz inhibitörleri, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz inhibitörleri ve nötrofil adezyon inhibitörleri gibi ilaçlar yer alır.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon redüktaz, süperoksit dismutaz (SOD), ve katalaz (CAT) enzimatik antioksidanlara; glutasyon (GSH), melatonin, selenyum, albümin gibi moleküller de nonenzimatik antioksidanlara örnektir (120,126).

Süperoksit dismutaz, ROS'a karşı savunmada ilk görevi üstlenen endojen enzimatik antioksidandır. Süperoksit radikalini, hidrojen iyonu varlığında CAT ve GSH-Px'in substratı olan hidrojen peroksite dönüştürerek bu reaktif oksijen türünün ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlar (121,126). Sitoplazmada, mitokondride ve

fibroblast, glia ve endotel hücrelerince salgılandığı yer olan ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Ayrıca ekstrasellüler alanda süperoksit radikalini enzimatik olarak inaktive eden tek antioksidandır.

Büyük ölçüde peroksizomlarda, daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan CAT, bir hemoproteindir. Karaciğer ve böbrekteki enzimatik aktivitesi maksimum iken bağ dokusundaki aktivitesi oldukça düşüktür. Süperoksit dismutazın katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin, su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder (126).

Organizmadaki oksidatif stres, oksidan moleküllerin oluşum hızı ve onları ortadan kaldırmada rol oynayan antioksidan moleküllerin tamamının etki gücü ile belirlenir. Bu nedenle organizmada tüm oksidan ve antioksidan parametrelerin her birinin ayrı ayrı incelenmesi hem mümkün olmayabilir hem de hücre içi toplam oksidan stresi göstermekte yetersiz kalabilir (127). Dokulardaki oksidan- antioksidan durumun dengesini net bir şekilde gözlemlememizi sağlayan ise oksidatif stres indeksi (OSI)'dir. Dokudaki total oksidan durum (TOS) ve total antioksidan durum (TAS) kullanılarak OSI hesaplanır (121).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Kaynak

Bu çalışmanın etik kurul izni Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 24/07/2018; Protokol No: 2018/29). Çalışmamız KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2019-8280).

#### 3.2. Denekler, Gruplar ve Deney Prosedürü

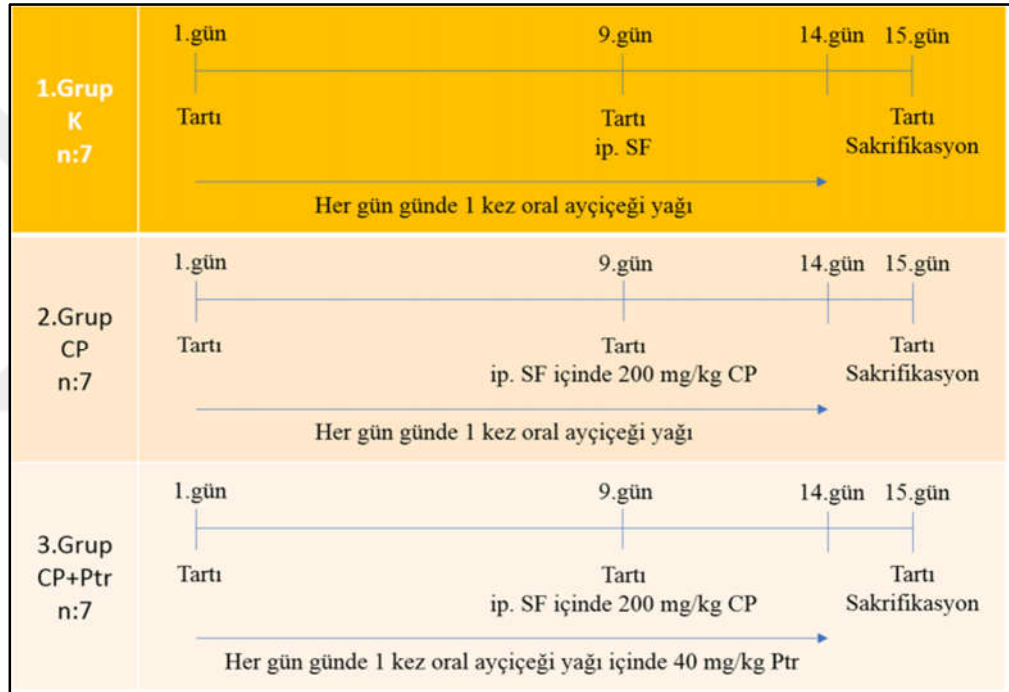
Deney için 21 adet Sprague Dawley ırkı erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar, oda sıcaklığı  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, nem oranı %50 olan odalarda ve düzenli olarak 12 saat ışık ve karanlık periyodunda kalacak şekilde takip edildi. Çalışma süresince standart tip III kafeslerde barındırılan sıçanlara, su (içme suyu) ve standart sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi Tic. A.Ş., Erzurum, Türkiye) ad libitum verildi (Resim 2).



**Resim 2: Deney boyunca sıçanların barındırıldığı standart tip III kafesler.**

Sıçanların bakımı, deneyin bütün uygulamaları, sıçanların sakrificasyonu, sıçanların çevresel stres ve uyum problemi yaşamaması için KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

Deneyin ilk günü 1. gün olarak kabul edildi ve sıçanlar aşağıda belirtildiği gibi rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. Deneyin 1. günü tartılan deneklere buldukları gruplara göre deney prosedürü uygulandı (Şekil 9). Deney prosedüründe kullanılan CP (Endoxan, Baxter®) ve Ptr (4-[(E)-2-(3,5-Dimethoxyphenyl)vinyl]phenol; %95, abcr, Almanya) uygulama doz ve yöntemleri literatürle uyumlu olacak şekilde belirlendi (12,35,128).



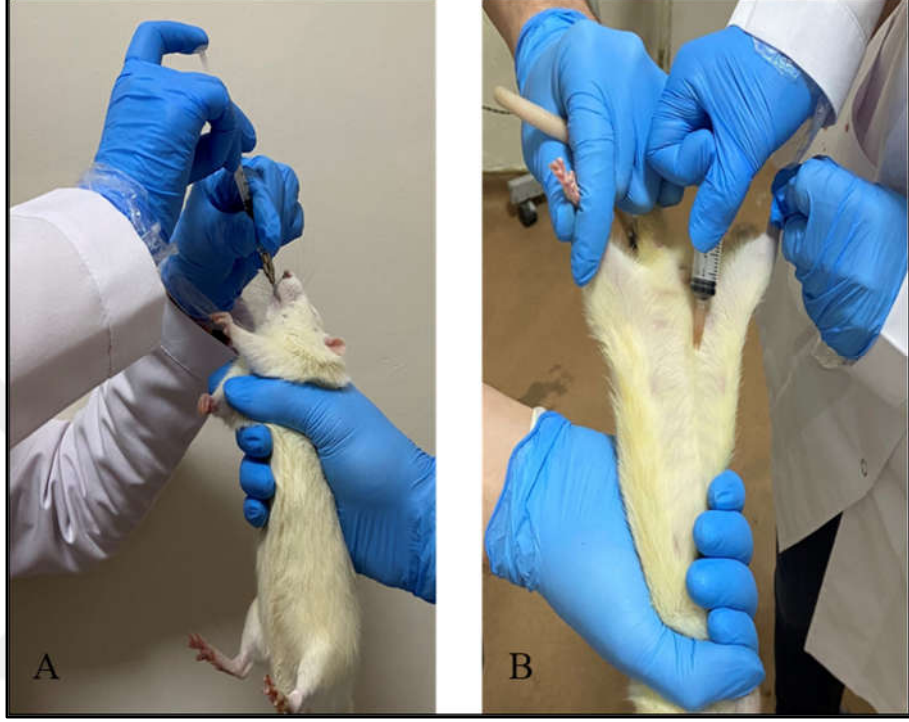
**Şekil 9: Deney prosedürü.** K: kontrol, CP: Siklofosamid, Ptr: Pterostilben, SF: Serum fizyolojik, ip.: İntraperitoneal.

1. Grup (n:7): Kontrol grubuna deneyin 1. gününden itibaren 14 gün boyunca oral gavajla 1 ml/kg ayçiçeği yağı ve deneyin 9. günü tek doz 10 ml/ kg serum fizyolojik (SF) ip. olarak uygulandı.

2. Grup (n:7): Siklofosamid grubuna deneyin 1. gününden itibaren 14 gün boyunca oral gavajla 1 ml/kg ayçiçeği yağı ve deneyin 9. günü tek doz 10 ml/kg SF içinde 200 mg/kg dozunda CP ip. yolla uygulandı.



3. Grup (n:7): Siklofosdamid ve Ptr grubuna deneyin 1. gününden itibaren 14 gün boyunca, oral gavajla 1 ml/kg ayçiçeği yağı içinde 40 mg/kg dozunda Ptr ve deneyin 9. günü ip. olarak 10 ml/kg SF içinde 200 mg/kg dozunda tek doz CP uygulandı (Resim 3).

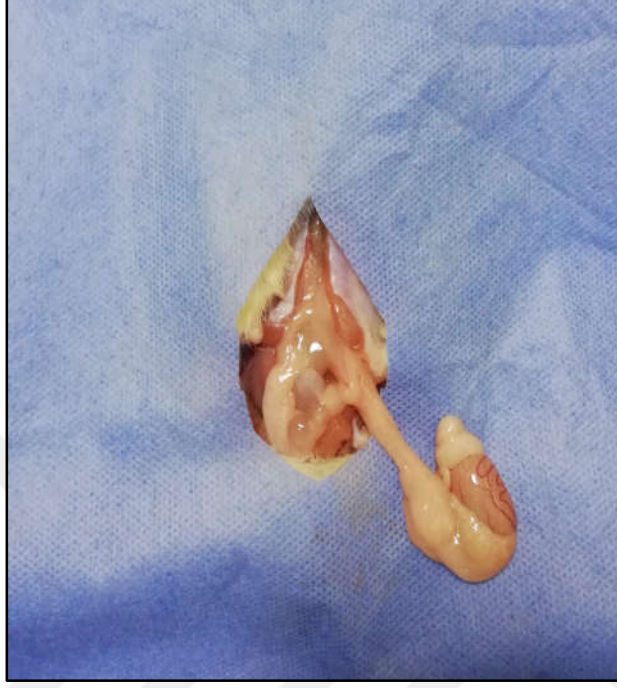


**Resim 3: Deneklerin oral gavaj ve ip. uygulamaları. A. Oral gavaj uygulaması. B. İntraperitoneal uygulama.**

Denekler; vücut ağırlığı takibi için deneyin ilk günü olan 1. gün, CP'nin uygulandığı 9. gün ve deneklerin sakrifiye edildiği 15. gün, sakrifikasyondan önce tartıldı.

Deney süresinin sonunda (15. günde) sıçanlar derin anestezi (ketamin 90 mg/kg ip.) altındayken kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi. Abdominal alt bölgeden, orta hat kesisi yapılarak sol testis epididimle beraber çıkartıldı (Resim 4). Her iki doku çevresindeki yağ dokudan ve birbirinden ayrıştırıldı. Bu işlemden sonra testis ağırlığının tespiti için her bir sol testis tartılıp ikiye bölündü. Epididim de kaput ve kaudal parçalarına ayrıldı. Epididimin kaudal parçası sperm analizi için 2 ml Tris tampon solüsyonu içeren petri kabına konuldu.

Histopatolojik analizler için kaput epididimis %10 formaldehit solüsyonuna konuldu. Sol testisin bir yarısı da Bouin fiksatifine (doymuş pikrik asit çözeltisi 75 ml, formaldehit (%37) 75 ml ve glasiyal asetik asit 5 ml) alındı.



**Resim 4: Testis ile epididimin diseksiyonu.**

Biyokimyasal analizler için ise sol testisin diğer yarısı  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmak üzere SF ile yıkanıp mikro hacimli tüplere alındı. Deney sırasında dokular mikro hacimli tüpler içi kuru buz dolu yalıtımlı kapta muhafaza edildi, daha sonra çalışılana kadar,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'lik derin dondurucuda saklandı.

### **3.3. Sperm Analizi**

Her denek için, sol epididimin kaudal bölümü 2 ml Tris tampon solüsyonu içeren bir petri kabına alınarak parçalara ayrıldı. Spermilerin epididimal tübüllerden dışarı çıkmasını sağlamak için 30 dakika süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Sperm analizleri; sperm sayısı, motilite, vitalite ve morfolojik değerlendirmeleri içerecek şekilde yapıldı.

Sperm sayımı için, hazırlanan numuneden 5  $\mu\text{l}$  Makler sperm sayım kuyucuğuna konuldu ve cam kapakla kapatıldı. Sperm sayımı X200 büyütmede ışık

mikroskobu (IM) altında yapıldı ve mililitredeki sperm sayısı milyon/ml olarak belirlendi.

Sperm motilitesi için, Tris tamponunda dilue edilen sperm sıvısından pipet yardımıyla 1 damla lam üzerine konuldu ve üzeri lamelle kapatıldı. Sperm, IM'de X400 büyütme altında hareketli ve hareketsiz olarak değerlendirildi. Her örnekten rastgele 3 farklı alan seçildi ve bunlardan elde edilen verilerin ortalaması motilite skoru olarak kullanıldı (26).

Vitalite (canlılık) değerlendirmesi için 10 µl sperm süspansiyonu iki katı hacimde eozin y ile 15 saniye süreyle karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl lam üzerine yayıldı ve IM'de X400 büyütmede incelendi. Canlı sperm (renksiz, boya almayan) ve ölü sperm (koyu pembe renkli, boya alan) sayıldı. Her bir lamda toplam 200 sperm sayılarak ve yüzdeleri hesaplanarak sperm vitalite yüzdeleri belirlendi. İlave olarak preparatlarda, morfolojik anormallikleri belirlemek için X400 büyütmede farklı alanlarda lam başına toplam 200 sperm hücresi incelenerek spermere ait morfolojik bozukluklar tespit edildi (22,129,130).

### **3.4. Histomorfometrik ve Histomorfolojik Analizler**

Dokulara ait tüm histolojik işlemler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Mikropreparasyon Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Histomorfometrik tüm değerlendirmelerde Anabilim Dalı'nda mevcut olan dijital fotoğraf makinesi (Olympus, DP 71, Japonya) ataçmanlı IM'de (Olympus BX 51, Japonya) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Almanya) programı kullanılarak yapıldı ve fotoğraflar çekilerek dijital ortama aktarıldı.

#### **3.4.1. Testis Dokularının Boyamaya Hazır Hale Getirilmesi**

Deney sırasında içinde Bouin solüsyonu bulunan cam kavanozlara alınan testis dokuları, bu solüsyonda 3 gün boyunca karanlık ve oda sıcaklığındaki ortamda bekletildi. Üç günün sonunda dokular, Bouin solüsyonunun içeriğinde bulunan pikrik asitin dokulardan uzaklaştırılması için gün boyunca %70 alkolde tutuldu. Bu alkol sürekli değiştirilerek Bouin solüsyonundan kaynaklanan sarı rengin giderilmesi

sağlandı. Bu işlem sonunda doku numunelerine, doku takibi cihazında (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) rutin gece doku takibi programı uygulandı (Tablo 2).

**Tablo 2: Rutin gece doku takip programı.**

Kimyasal	Süre
Formalin	1 saat
Alkol (30°C)	50 dakika
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1,5 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Parafin (59°C)	1 saat
Parafin (59°C)	1 saat
Parafin (59°C)	1,5 saat

Doku takibinden hemen sonra dokular, doku gömme cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) 58°C'ye ayarlanmış parafine gömüldü. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan parafin bloklar daha sonra kesit almaya uygun hale getirebilmek için +4°C'de buzdolabında soğutuldu. Kesitler, tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255, Almanya) yardımıyla alındı. Bu işleme öncelikle dokuya ulaşana kadar 20 µm'lik trimleme yapılarak başlandı. Dokuya ulaşıncı, dokudan 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler daha sonra benmari içindeki sıcak suya konuldu ve kırışıklar açıldıktan sonra hematoksilin & eozin (H&E), Masson Trikrom ve periyodik asit schiff (PAS) boyama yapmak üzere ayrı lamalar üzerine alındı. Boyamaya hazır hale getirmek için preparatlar kurumaya bırakıldı.

### 3.4.2. Epididim Dokularının Boyamaya Hazır Hale Getirilmesi

Deney sırasında %10 formaldehit solüsyonuna alınan sol epididimin kaput bölümü öncelikli olarak bu solüsyonda 1 saat bekletildi. Daha sonra her iki uçtan trimlenerek kasetlendi ve 3 gün boyunca fikse olması için, yeni hazırlanmış olan %10 formaldehit solüsyonuna alındı. Üç günün sonunda doku numunelerine doku takibi cihazında yukarıda belirtilen rutin gece doku takibi programı uygulandı.

Doku takibi programının bitiminden hemen sonra dokular, doku gömme cihazında parafine gömüldü. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan bu parafin bloklardan, buzdolabında soğutulduktan sonra mikrotom ile kesitler alındı. Alınan kesitler benmari içinde kırışıklıkları açıldıktan sonra H&E boyaması yapmak için lam üzerine alınarak kurumaya bırakıldı.

### 3.4.3. Işık Mikroskopik İnceleme için Boyama Yöntemleri

**Hematoksilen & Eozin Boyaması:** Testis ve epididim preparatları boyama öncesi deparafinize edilmesi için zembile yerleştirilerek 1 saat etüvde bekletildi. Daha sonra otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) aşağıdaki H&E boyama prosedürü uygulanarak boyandı (Tablo 3).

Boyama işleminden sonra preparatlar, üzerlerine kapatma medyumu damlatılarak lamelle kapatıldı ve seviye farkının oluşmaması için üzerine ağırlık konularak 1 gün bekletildi.

Bu hazırlanmış testis kesitlerinde IM ile; seminifer tübül çapı (STD), germinal epitelyal yükseklik (GEH) ölçüldü ve lümeninde immatür germinal hücre bulunan tübül sayısı analiz edilerek immatür germinal hücre dökülmesi (GHD) yüzdesi belirlendi. Tüm bu ölçümler için her testis kesitinde X200 büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alanda 20 seminifer tübül değerlendirildi.

**Tablo 3: Hematoksilen & eozin boyama programı.**

Solüsyon	Süre
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%70 Alkol	5 dakika
Yıkama 1	1 dakika
Hematoksilen	2 dakika
Yıkama 2	1 dakika
Asit Alkol	1 saniye
Yıkama 3	1 dakika
Amonyaklı Su	10 saniye
Yıkama 4	1 dakika
Eozin	1,5 dakika
Yıkama 5	1 dakika
%96 Alkol	5 saniye
%100 Alkol	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika

İlave olarak her testis kesitinde histolojik açıdan Modifiye Johnsen Skoru (MJS) kriterleri kullanılarak testis hasarı değerlendirildi (129) (Tablo 4).

Hematoksilen & eozin ile boyanan epididim preparatlarında da her preparat için X200 büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alan histopatolojik olarak analiz edilerek fotoğraflandı (131).

**Tablo 4: Modifiye Johnsen skoru kriterleri (129).**

Skor	Değerlendirme Kriteri
10	Birçok spermatozoanın bulunduğu tam spermatogenez
9	Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel
8	Tübül başına beşten daha az spermatozoa, birkaç geç spermatid
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birçok erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yok, pek çok spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit
3	Sadece spermatogonia
2	Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yok

**Masson Trikrom Boyaması:** Lam üzerindeki dokular otomatik boyama cihazının deparafinizasyon programı kullanılarak boyamaya hazır hale getirildi (Tablo 5).

**Tablo 5: Deparafinizasyon programı.**

Aşama	Süre
Fırın	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%70 Alkol	5 dakika
Yıkama 1	30 saniye
Su	Çıkış

Deparafinize edilen preparatların boyanması, üretici firma direktifleri doğrultusunda kit (Masson Trichrome Stain Set CB6095.0100, Chembio, Türkiye) protokolüne uygun olarak yapıldı (Tablo 6).

**Tablo 6: Masson Trikrom boyama protokolü.**

Aşama	Süre
Distile Su ile Yıkama	
Weigert's Demirli Hematoksilen (A+B)	10 dakika
Ayraç Uzaklaştırma	
Kurutma	5 dakika
Pikrik Asit	4 dakika
Distile Su ile Yıkama	3 saniye
Gelincik Kızılı – Asit Fuksin	4 dakika
Ayraç Uzaklaştırma	
Distile Su ile Yıkama	1 dakika
Fosfotungstik Asit Çözeltisi	10 dakika
Kurutma	5 dakika
Anilin Mavisi	5 dakika
Ayraç Uzaklaştırma	
Distile Su ile Yıkama	1 dakika
%70 Alkol	15 saniye
%96 Alkol	25 saniye
%100 Alkol	60 saniye
Ksilen	1 saniye
Kapama	

Boyanan testis preparatları bağ doku ve kollajen yoğunluğu açısından değerlendirildi (132,133).

**Periyodik Asit Schiff Boyama:** Otomatik boyama cihazının deparafinizasyon programında yukardaki gibi deparafinize edilen dokular, üretici firma direktifleri doğrultusunda kit (PAS Stain Kit-Mcmanus CB6125.0100, Chembio, Türkiye) protokolüne uygun olarak PAS boyası ile boyandı (Tablo 7).



**Tablo 7: Periyodik asit Schiff boyama protokolü.**

Aşama	Süre
Periyodik Asit Çözeltisi	10 dakika
Distile Su ile Yıkama	2 dakika
Schiff's Reagent Çözeltisi	20 dakika
Ayraç Uzaklaştırma	
Distile Su ile Yıkama	2 dakika
Metabisülfid Çözeltisi	2 dakika
Tespit Çözeltisi	2 dakika
Distile Su ile Yıkama	2 dakika
Mayer's Hematoksilen Çözeltisi	3 dakika
Ayraç Uzaklaştırma	
Distile Su ile Yıkama	5 dakika
%70 Alkol	15 saniye
%96 Alkol	25 saniye
%100 Alkol	60 saniye
Ksilen	1 saniye
Kapama	

Bu boyama ile testis kesitlerinde seminifer tübül bazal membranının yapısı, bütünlüğü ve germinal hücrelerin bazal membranla ilişkisi kalitatif olarak değerlendirildi (134).

### **3.5. Testis Dokusunun Biyokimyasal Analizleri**

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda eksi 80°C'de muhafaza edilen testis dokularının her birinden kesimler yapılarak, ortalama 30'ar mg'lık parçalar elde edildi. Bu dokular, daha sonra homojenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) kullanılarak 2 ml fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) içerisinde 9500 rpm'de homojenize edildi. Dokulara ait homojenatlar 1800 rev'te 10 dakika santrifüjlendi ve bu işlem sonucunda elde edilen

süpernatantlarda; kaspaz-3, doku testosteron, MDA, SOD, CAT, TOS ve TAS ölçümleri gerçekleştirildi.

Doku örneklerindeki protein miktarları üretici firmanın önerilerine uygun olacak şekilde ticari kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No: 23227, Rockford, IL, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mg/ml cinsinden hesaplandı. Dokularda, MDA ve ticari enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitleri kullanılarak ölçülen tüm biyokimyasal parametrelerin seviyeleri standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak mg protein başına olacak şekilde ifade edildi.

**Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi:** Malondialdehit ölçümü için Mihara ve Uchiyama yöntemi (135) modifiye edilerek kullanıldı. Bu metod, asidik ortamda MDA ile tiyobarbitürik asitin (TBA) meydana getirdiği molekülün renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Doku MDA ölçümü için öncelikle bazı çözeltiler hazırlandı. Doku homojenizasyon tamponu yani 0.01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) hazırlamak için; 900 ml saf su bulunan beherde 10 adet PBS tableti (Mediano, Uppsala, İsveç) çözüldü. Çözeltinin pH'sı, pH metrede (Hanna Instrument, HI 9321, ABD) 7.4'e ayarlandı ve daha sonra çözeltinin son hacmi 1 litreye tamamlandı.

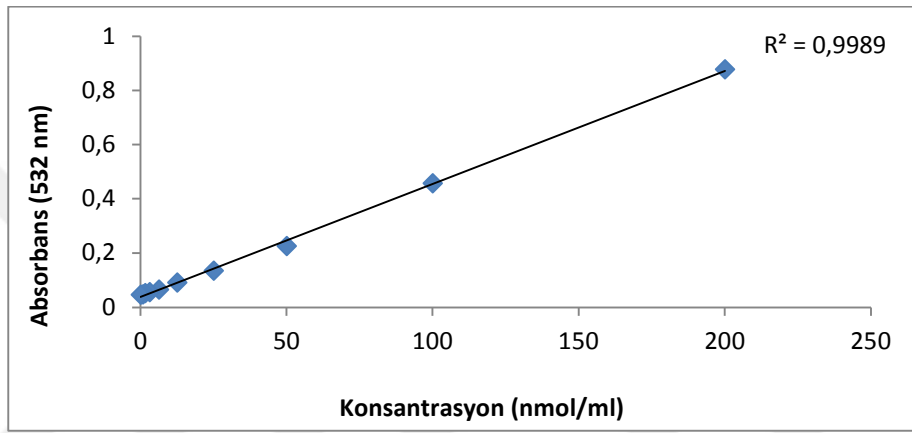
Ayrı bir beherde bir miktar saf su üzerine 2.94 ml %85'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, St. Louis, MO, ABD) alındı ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanarak %1'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlandı.

Tiyobarbitürik asit çözeltisi için ise; 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, ABD) tartıldı. Daha sonra üzerine 50 ml saf su ve 50 ml asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

Standart çözeltiler hazırlanırken önce 82.5 µl 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, ABD); 0.01 M 50 ml HCl (Sigma, St. Louis, MO, ABD) çözeltisine ilave edilerek çözelti 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırlanan ana stok çözeltisi farklı oranlarda dilüe edilerek; 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.078 ve 0.039 nmol/ml'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

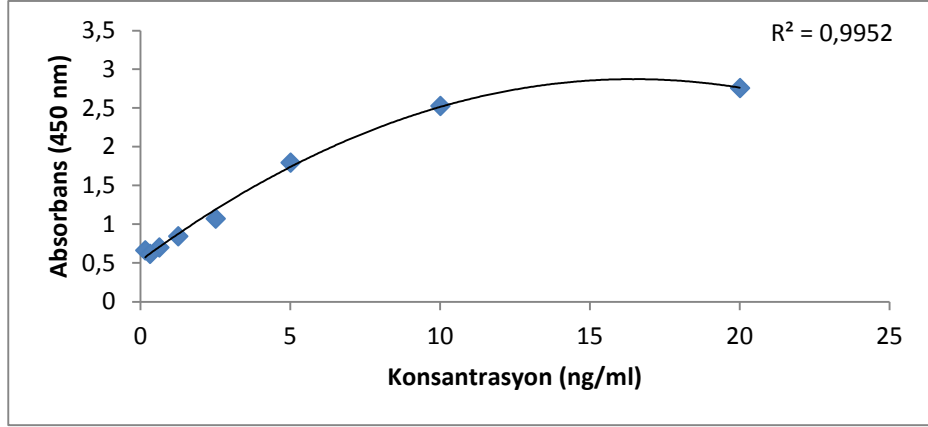
Son olarak doku MDA ölçümü için; 500 µl homojenata 3 ml %1'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan bu karışıma 1 ml %0.672'lik TBA eklenip karıştırıldıktan sonra yeni karışım, kaynar su banyosunda 60 dakika inkübe edildi. Bu

süre sonunda tüplerin oda sıcaklığında soğuması beklenildi ve sonrasında 1800 rcf'te 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu süpernatant kısımlardan 200'er µl alınıp 96 kuyucuklu pleyte yüklenerek mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, ABD) 532 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı. Elde edilen standart absorban sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi (Şekil 10). Bu grafikten ve dokulardaki protein miktarından yararlanılarak doku MDA düzeyleri nmol MDA/mg protein olarak hesaplandı.



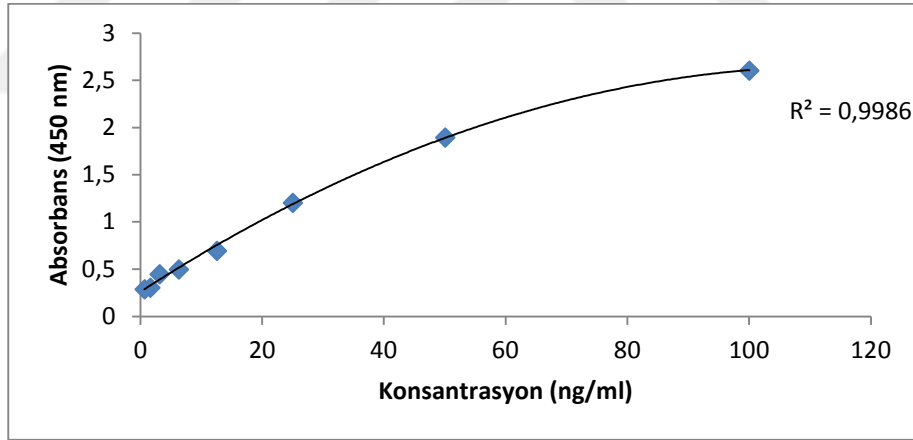
Şekil 10: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.

**Süperoksit Dismutaz Seviyelerinin Belirlenmesi:** Testis doku örneklerine ait SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (USCN, Cat No: SES134Ra, Wuhan, Çin) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği şekil 11'de gösterildi.



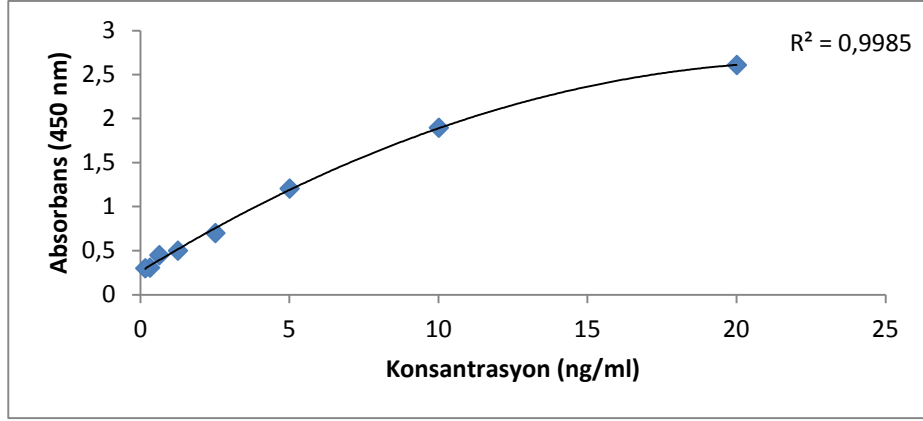
Şekil 11: Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği.

**Katalaz Seviyelerinin Belirlenmesi:** Testis dokularındaki CAT seviyeleri için yine ELISA kit (USCN, Cat No: SEC418Ra, Wuhan, Çin) kullanıldı. Kit üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kullanılarak seviyeler belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle ifade edildi. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği şekil 12’de gösterildi.



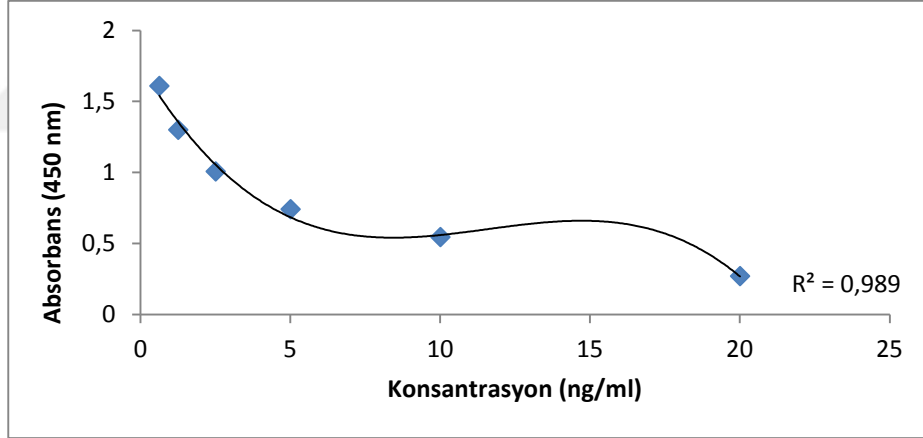
Şekil 12: Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği.

**Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi:** Testis doku örneklerindeki doku kaspaz-3 seviyelerini belirlemek için ELISA kit (USCN, Cat No: SEA626Ra, Wuhan, Çin) kullanıldı. Üretici firmanın tavsiyelerine göre ölçülen değerlere ait sonuçlar ng/mg protein birimiyle ifade edildi. Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği oluşturuldu (Şekil 13).



Şekil 13: Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği.

**Testosteron Seviyelerinin Belirlenmesi:** Doku örneklerinin testosteron seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Elabscience, Cat No: E-EL-0155, Texas, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Testosteron ölçümünde kullanılan standart grafiği şekil 14'de gösterildi.



Şekil 14: Testosteron ölçümünde kullanılan standart grafiği.

**Total Oksidan Durumun Belirlenmesi:** Testis doku örneklerindeki TOS seviyeleri kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ölçülen sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  eşdeğeri/l olarak ifade edildi.

**Total Antioksidan Durumun Belirlenmesi:** Testis doku örneklerine ait TAS seviyeleri de üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay

Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Türkiye) yardımıyla belirlendi ve sonuçlar mmol troloks eşdeğeri/l olarak ifade edildi.

***Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması:*** Testis doku örneklerindeki OSI seviyeleri:

OSI= [(TOS, µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eşdeğeri/l) / (TAS, µmol troloks eşdeğeri/l)] x 100, formülü kullanılarak hesaplandı (136).

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel olarak grupların veri analizi IBM SPSS versiyon 23.0 kullanılarak Kruskal Wallis varyans analizi ile yapılmıştır. Ortalama (Ort.) ve standart sapma (SD) değerleri hesaplanarak p <0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut Ağırlığı Takibi ve Testis Ağırlığı Bulguları

Deneyin 1. günü ve 9. günü gruplar arasında vücut ağırlıkları bakımından herhangi bir fark yoktu. Deneyin 15. gününde hem CP hem de CP+Ptr grubunda kontrole göre azalma mevcuttu. Ancak bu azalma, sadece K ve CP+Ptr grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden oldu ( $p=0,015$ ) (Tablo 8).

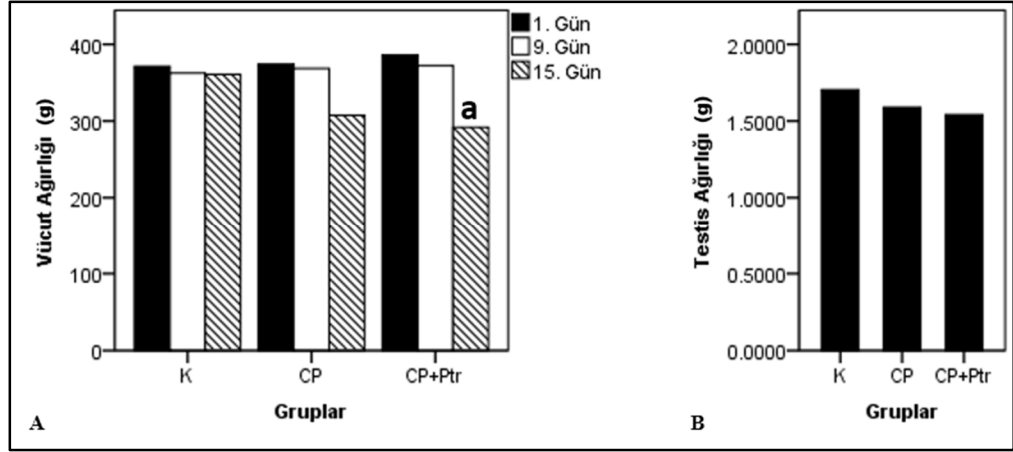
**Tablo 8: Ağırlık verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri.**

Vücut ve Testis Ağırlıkları (g)	K	CP	CP+Ptr
	Ort.±SD	Ort.±SD	Ort.±SD
1. Gün Vücut Ağırlığı	371,29±29,66	374,29±28,43	386±23,07
9. Gün Vücut Ağırlığı	362,43±35,67	368,57±30,37	372,14±26,42
15. Gün Vücut Ağırlığı	360,71±33,68	307,43±17,14	291,86±33,14 <sup>a</sup>
Testis Ağırlığı	1,70±0,12	1,59±0,08	1,54±0,13

<sup>a</sup> CP+Ptr Grubunda 15. gün vücut ağırlığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,015$ ).

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu.

Her ne kadar CP ve CP+Ptr gruplarında testis ağırlıkları bakımından kontrole göre bir azalma mevcut olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 8, Şekil 15).



**Şekil 15: Gruplara ait vücut ağırlığı ve testis ağırlığı sonuçları.** A. Gruplara ait 1. gün, 9. gün ve 15. gün ortalama vücut ağırlıkları. B. Gruplara ait ortalama testis ağırlıkları. a: CP+Ptr grubunun 15. gün vücut ağırlığı K grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,015$ ). K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu.

#### 4.2. Sperm Analizi Bulguları

Sperm analizinde, K grubuyla kıyaslandığında, CP ve CP+Ptr gruplarında sperm sayısında düşüş olmasına rağmen anlamlı bir fark tespit edilemedi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında hem CP grubunda hem de CP+Ptr grubunda sperm motilitesinde anlamlı bir azalma görüldü (sırasıyla  $p=0,031$  ve  $p=0,003$ ). Benzer şekilde CP ve CP+Ptr gruplarında kontrole göre sperm canlılığında da azalma izlendi (sırasıyla  $p=0,006$  ve  $p=0,005$ ) (Tablo 9, Şekil 16).

**Tablo 9: Sperm analizi verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri.**

	K	CP	CP+Ptr
	Ort.±SD	Ort.±SD	Ort.±SD
Sperm Sayısı ( $\times 10^6/ml$ )	39,14±21,43	27,71±12,12	22,29±14,16
Motilite Skoru (%)	85,36±18,09	43,65±9,73 <sup>a</sup>	38,51±8,06 <sup>a</sup>
Canlılık (%)	96,86±4,29	77,71±8,03 <sup>b</sup>	76,14±9,20 <sup>b</sup>
Normal Morfoloji (%)	83,57±6,92	68,86±7,38 <sup>c</sup>	75,00±6,08

<sup>a</sup> Motilite, CP ve CP+Ptr gruplarında K grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0,031$  ve  $p=0,003$ ).

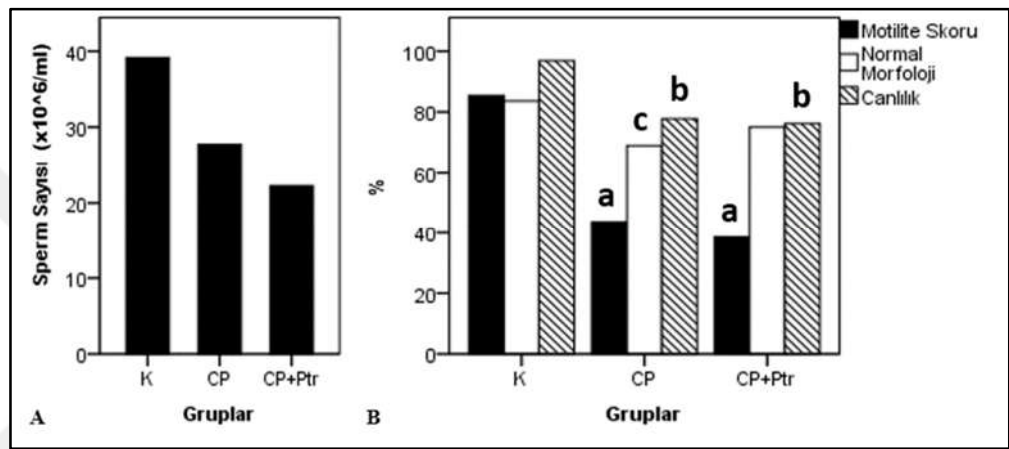
<sup>b</sup> Canlılık yüzdesi, CP ve CP+Ptr gruplarında K grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0,006$  ve  $p=0,005$ ).

<sup>c</sup> Normal morfoloji yüzdesi, CP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,005$ ).

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu.



Spermlerde; CP grubunda yoğun olmak üzere küçük baş, kopuk baş, iri baş gibi baş anomalileri; kırık ve kalın boyun gibi boyun anomalileri ile kısa ve kırık kuyruk gibi kuyruk anomalilerini içeren anormal morfolojiler mevcuttu. Sperm morfolojisi CP grubunda hem kontrole hem de CP+Ptr grubuna göre daha bozuktu. Ancak morfolojideki bu bozukluk, sadece kontrol ve CP grupları arasında istatistiksel bir farka neden oldu ( $p=0,005$ ). Siklofosfamid+Ptr grubunda ise morfoloji, CP grubuna göre düzelmiş olup; kontrol grubu ile arasında fark mevcut değildi (Tablo 9, Şekil 16).



**Şekil 16: Gruplara ait sperm analizi bulguları.** A. Gruplara ait ortalama sperm sayısı ( $\times 10^6/\text{ml}$ ). B. Gruplara ait ortalama motilite skoru, normal morfoloji ve canlılık yüzdeleri. a: CP ve CP+Ptr gruplarında, motilite skoru K grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0,031$  ve  $p=0,003$ ). b: CP ve CP+Ptr gruplarında, canlılık yüzdesi K grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0,006$  ve  $p=0,005$ ). c: CP grubunda, normal morfoloji yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,005$ ). K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu.

### 4.3. Histomorfometrik ve Histomorfolojik Bulgular

#### 4.3.1. Testis Dokusuna Ait Hematoksilin & Eozin, Masson Trikrom ve Periyodik Asit Schiff Boyalı Kesitlerin Bulguları

Hazırlanan H&E ile boyanmış testis preparatları incelendiğinde, K grubunda germinal epitelin, seminifer tübüllerin ve peritübüler dokunun normal görünümde olduğu görüldü (Resim 5-8).

Siklofosfamid grubunda; bazı seminifer tübüllerde atrofi, seminifer tübüllerin arasındaki interstisyumda düzensizlik ve ödem tespit edildi. Bazal membran yer yer germinal epitelten ayrılmış olarak gözlemlendi. Ayrıca Sertoli hücrelerinin ve germinal hücrelerin birbirinden ayrıldığı ve bazı tübüllerde immatür germinal hücrelerin lümenine döküldüğü izlendi (Resim 9-12). Siklofosfamid+Ptr grubunda ise immatür germinal hücre dökülmesi (GHD) hariç bu bulgularda CP grubuna göre azalma mevcuttu (Resim 13-16).

Hem CP hem de CP+Ptr gruplarının MJS'nin K grubuna göre düşük olduğu görüldü (sırasıyla  $p=0,001$  ve  $p=0,049$ ). Ancak her ne kadar anlamlı olmasa da CP+Ptr grubuna ait MJS, CP grubuna göre biraz daha iyiydi (Tablo 10, Şekil 17).

**Tablo 10: Histomorfometrik verilerin ortalama ve standart sapma değerleri.**

	<b>K</b>	<b>CP</b>	<b>CP+Ptr</b>
	Ort.±SD	Ort.±SD	Ort.±SD
MJS	9,52±0,13	8,91±0,13 <sup>a</sup>	9,09±0,14 <sup>a</sup>
GEH (µm)	53,46±3,88	50,51±3,31	49,26±1,83
STD (µm)	176,11±9,8	175,21±8,22	179,48±5,77
GHD (%)	4,29±3,3	16±8,02 <sup>b</sup>	18±5,88 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> CP ve CP+Ptr gruplarında, Modifiye Johsen Skoru K grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0,001$  ve  $p=0,049$ ).

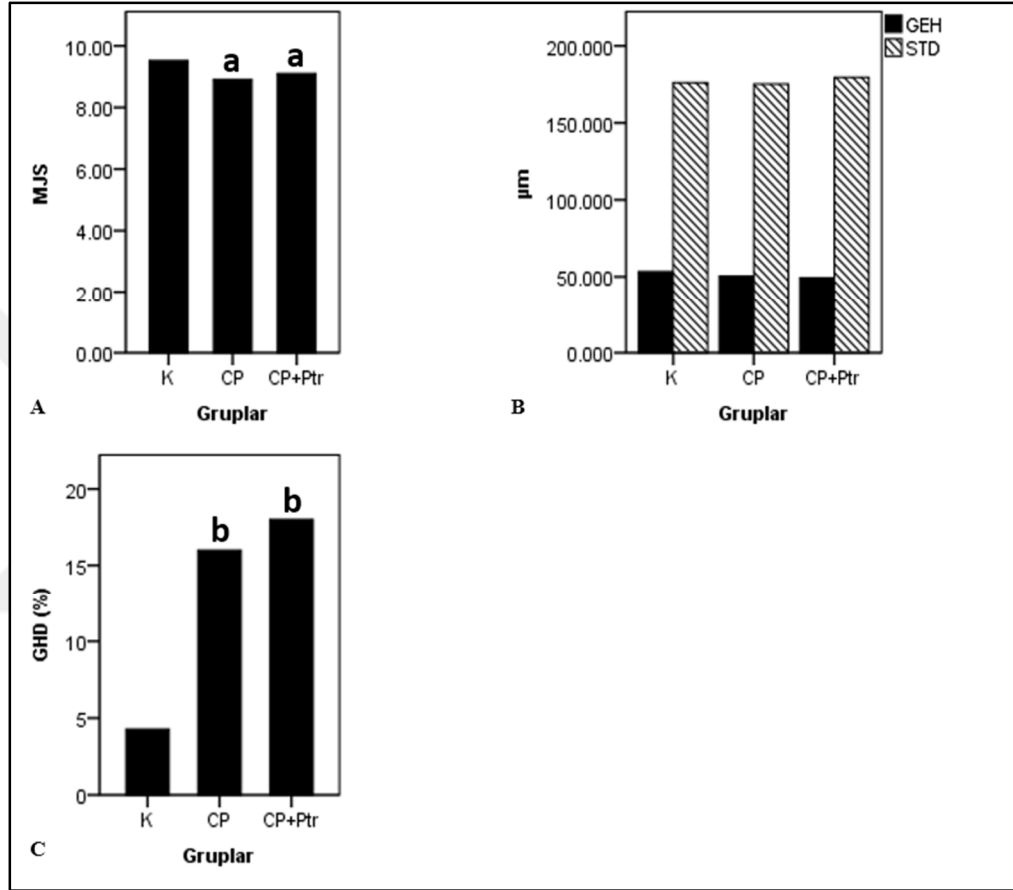
<sup>b</sup> CP ve CP+Ptr gruplarında, GHD yüzdesi K grubuna göre anlamlı olarak arttı (sırasıyla  $p=0,015$  ve  $p=0,008$ ).

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. Modifiye Johsen Skoru: MJS, Seminifer tübül çapı: STD, Germinal epitelyal yükseklik: GEH, İmmatür germinal hücre dökülmesi: GHD, K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu.

Siklofosfamid ve CP+Ptr gruplarında K grubuna göre GEH'de azalma olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Benzer şekilde STD

değerlerinde de istatistiksel olarak gruplar arasında belirgin fark olmamasına rağmen; K grubuna göre CP+Ptr grubunda artma, CP grubunda ise azalma izlendi (Tablo 10, Şekil 17).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, GHD yüzdesi gerek CP gerekse CP+Ptr gruplarında anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla  $p=0.015$  ve  $p=0.008$ ) (Tablo 10, Şekil 17).



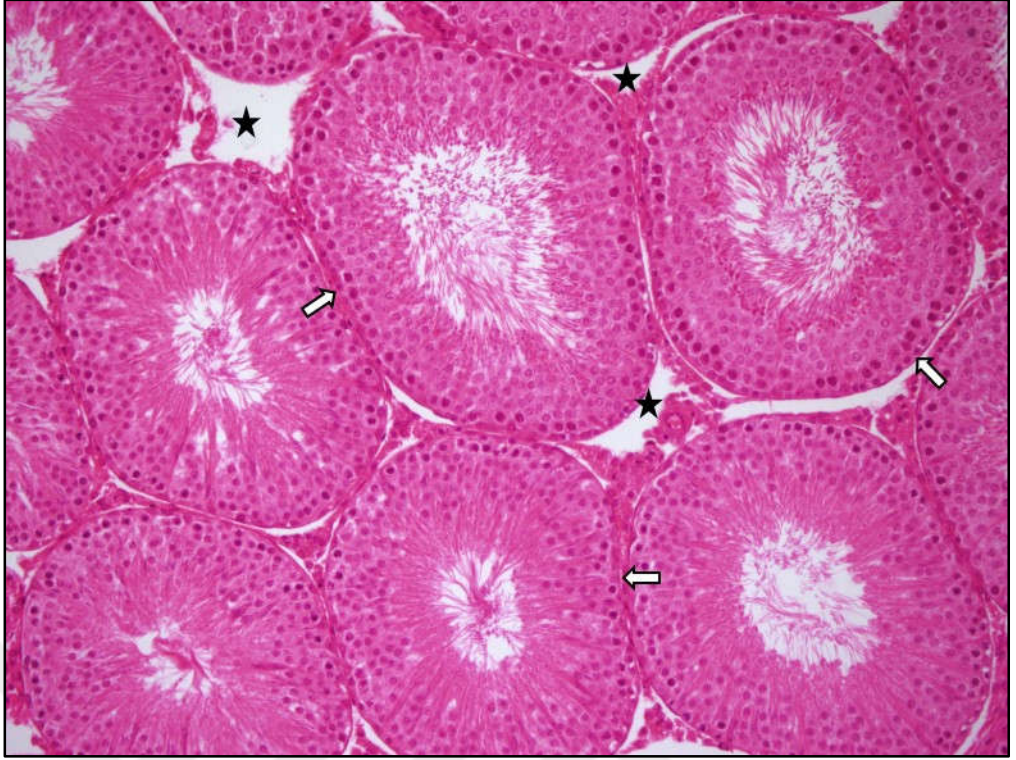
**Şekil 17: Gruplara ait histomorfometrik ait bulgular.** A. Gruplara ait ortalama MJS, B. Gruplara ait ortalama GEH ve STD'ler ve C. Gruplara ait ortalama GHD yüzdeleri. a: MJS, CP ve CP+Ptr gruplarında K grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $p=0,001$  ve  $p=0,049$ ). b: CP ve CP+Ptr gruplarında, GHD yüzdesi K grubuna göre anlamlı olarak arttı (sırasıyla  $p=0.015$  ve  $p=0.008$ ). Modifiye Johsen Skoru: MJS, Seminifer tübül çapı: STD, Germinal epitelyal yükseklik: GEH, İmmatür germinal hücre dökülmesi: GHD, K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu.



**Resim 5: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-1.** Tunika albuginea (siyah ok), seminifer tübüller (beyaz ok) ve aralarındaki interstisyel bağ dokusu (yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X40).



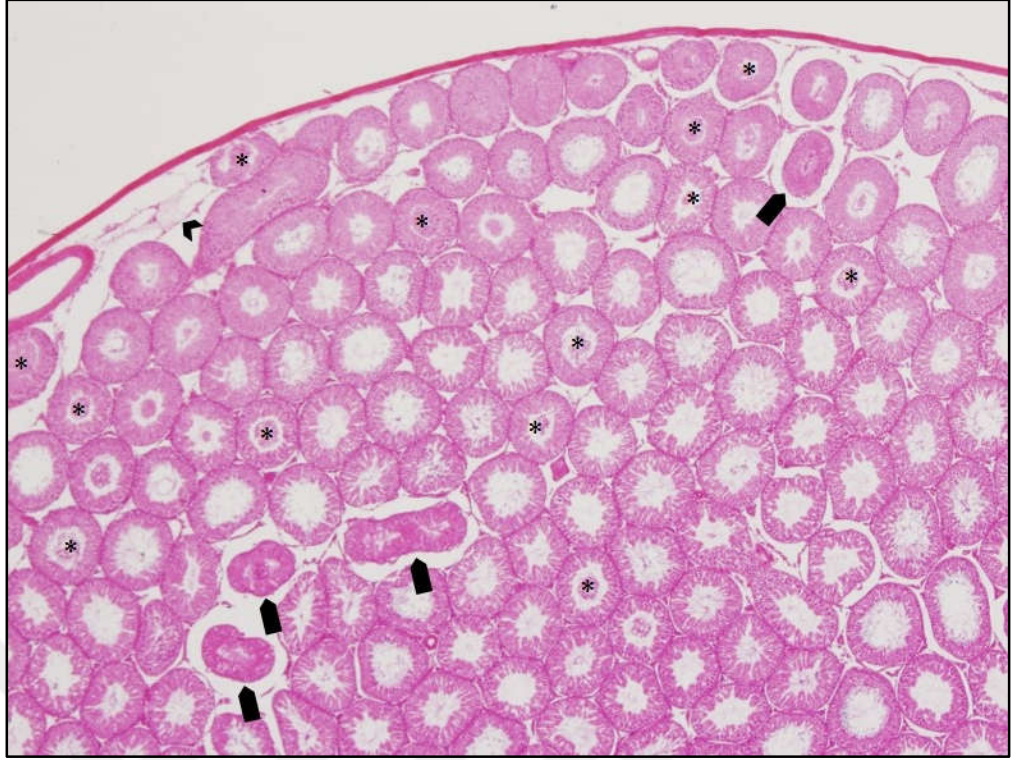
**Resim 6: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-2.** Tunika albuginea (siyah ok), seminifer tübüller (beyaz ok) ve aralarındaki interstisyel bağ dokusu (yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X100).



**Resim 7: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-3.** Seminifer tübüller (beyaz ok) ve aralarındaki interstisyel bağ dokusu (yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X200).

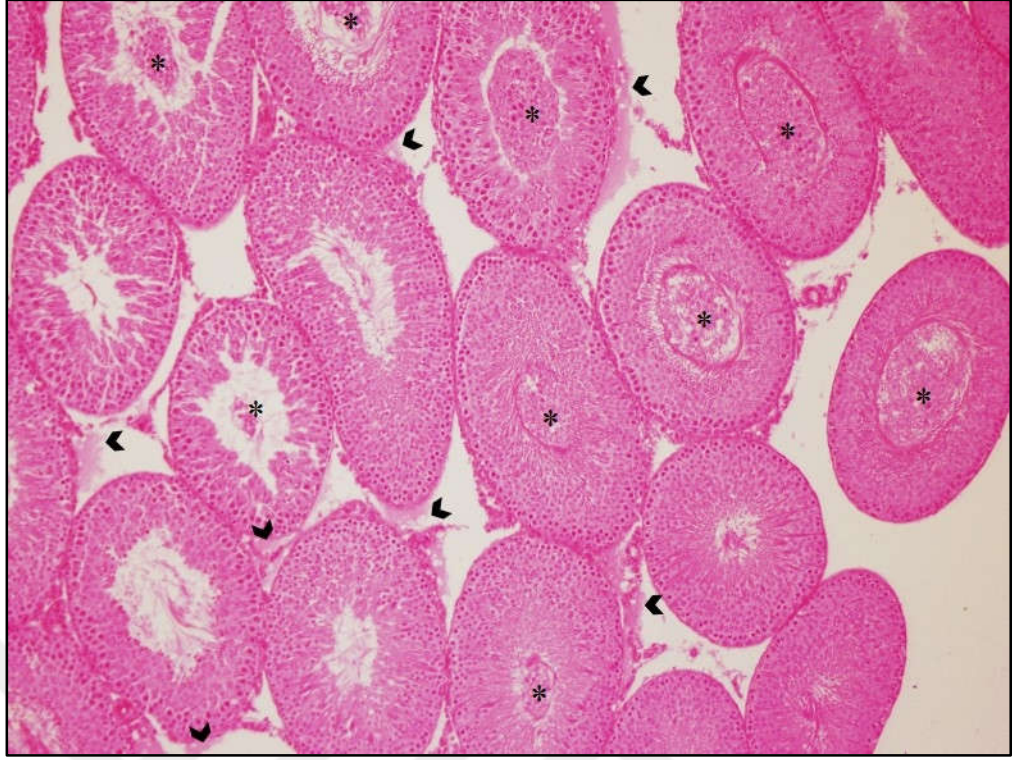


**Resim 8: Kontrol grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-4.** Leydig hücresi (sarı ok), Sertoli hücresi (mor ok), spermatogonyum (yeşil ok), primer spermatosit (pembe ok), yuvarlak spermatid (kırmızı ok), uzamış spermatid (mavi ok) ve interstisyel bağ dokusu (yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X400).



**Resim 9: Siklofosamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-1.** Tübüler atrofi (beşgen), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (H&E, X40).





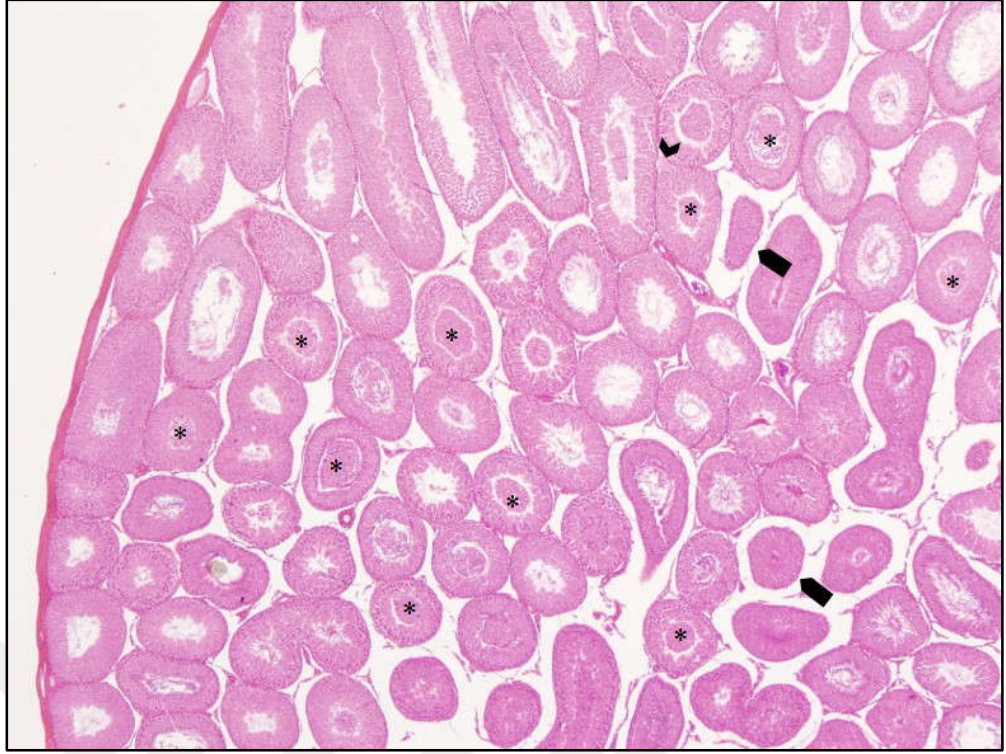
**Resim 10: Siklofosamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-2.** İmmatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (H&E, X100).



**Resim 11: Siklofosamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-3.** Bazal membranda düzensizlik (beyaz çentikli ok), germinal epitelde ayrılma (siyah çentikli ok), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve interstisyel ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (H&E, X200).



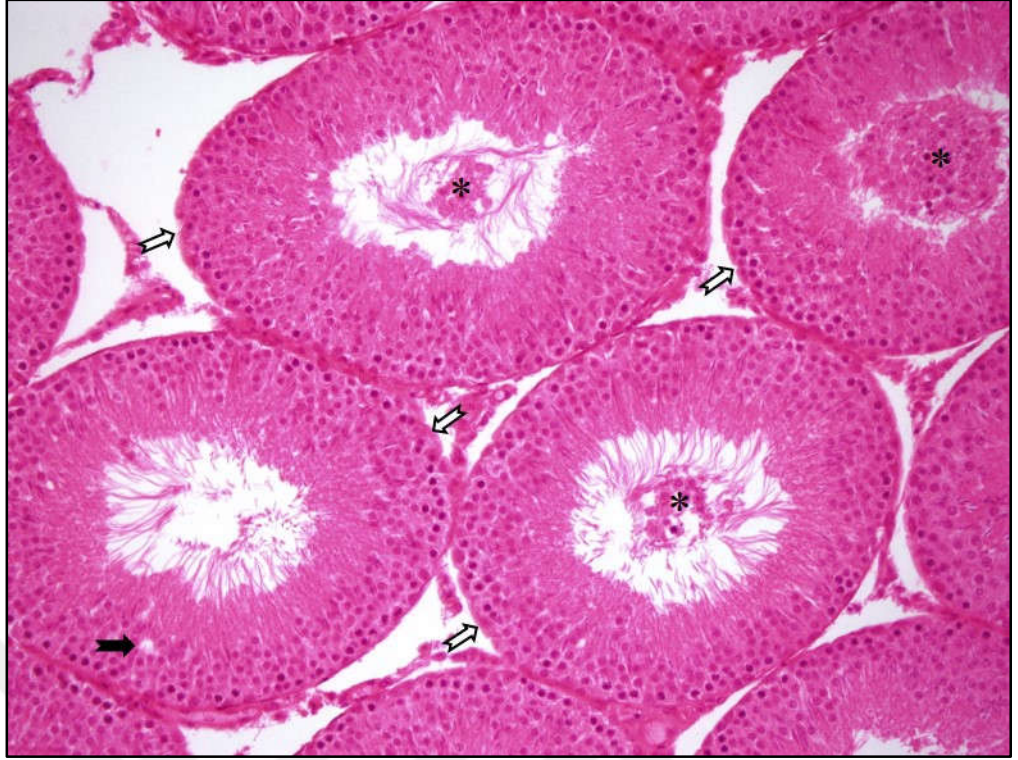
**Resim 12: Siklofosamid grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-4.** Bazal membranda düzensizlik (beyaz çentikli ok), germinal epitelde ayrılma (siyah çentikli ok), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve interstisyel ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (H&E, X400).



**Resim 13: Siklofosamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-1.** Tübüler atrofi (beşgen), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve interstisyel ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (H&E, X40).



**Resim 14: Siklofosamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-2. İmmatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) izlenmektedir (H&E, X100).**

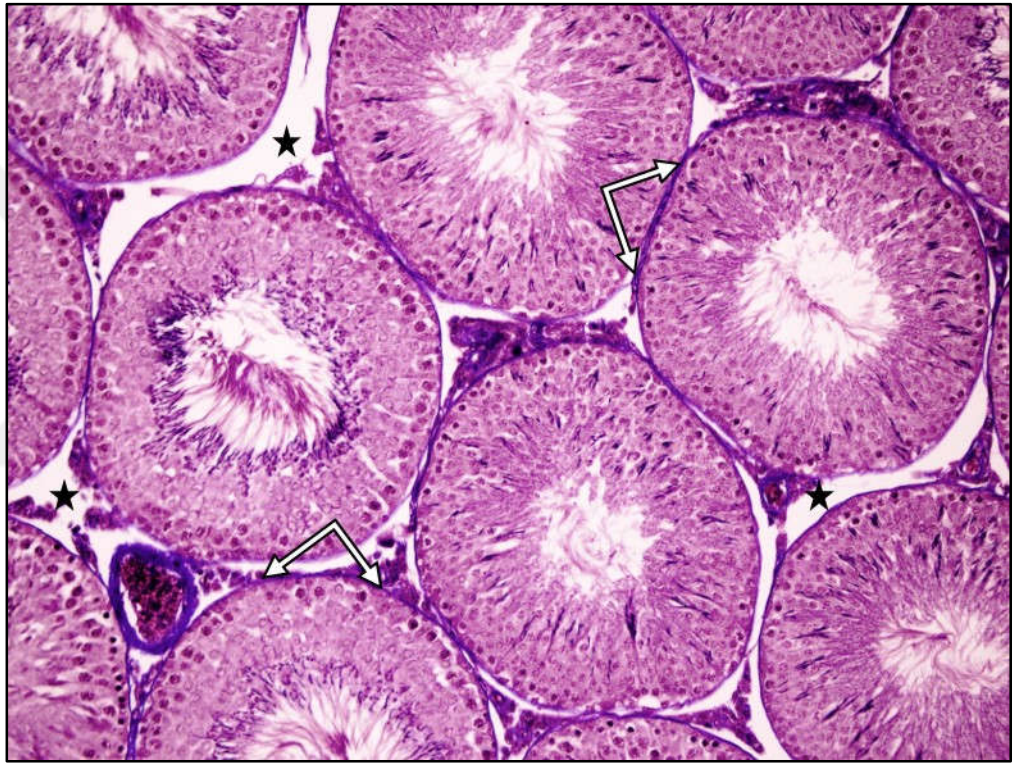


**Resim 15: Siklofosfamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-3.** Bazal membranda düzensizlik (beyaz çentikli ok), germinal epitelde ayrılma (siyah çentikli ok) ve immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) izlenmektedir (H&E, X200).



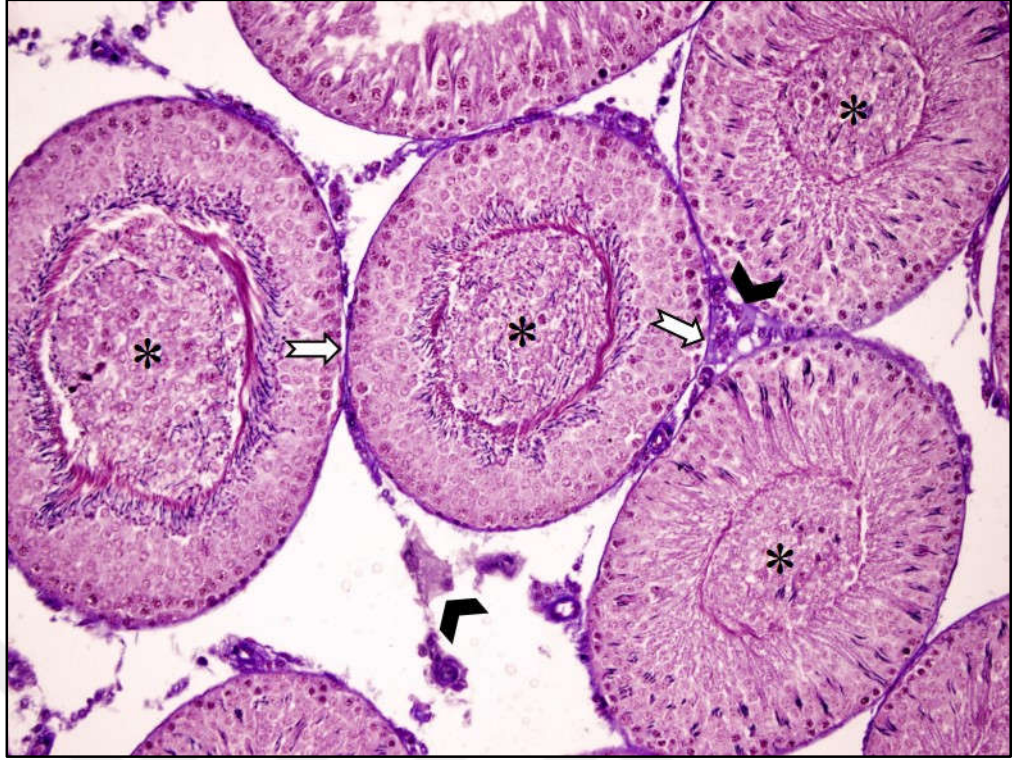
**Resim 16: Siklofosfamid+Ptr grubunun H&E ile boyanmış testis kesiti-4.** Bazal membranda düzensizlik (beyaz çentikli ok), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (H&E, X400).

Masson Trikrom boyalı kesitlerde K grubunda interstisyel bağ dokusu ve kollajen yoğunluğu olağan gözlenirken, diğer gruplarda da K grubuna benzer interstisyel bağ dokusu ve kollajen yoğunluğu mevcuttu. Hematoksilen & eozin ile boyanmış preparatlarda olduğu gibi K grubunda; seminifer tübüllerin, germinal epitelin ve peritübüler bağ dokusunun normal olduğu görüldü. Siklofosamid+Ptr grubunda daha az olmak üzere CP ve CP+Ptr gruplarında yer yer seminifer tübüllerin bütünlüğünün bozulduğu, germinal epitelde ayrılmaların mevcut olduğu ve interstisyumda ödem olduğu tespit edildi (Resim 17- 19).

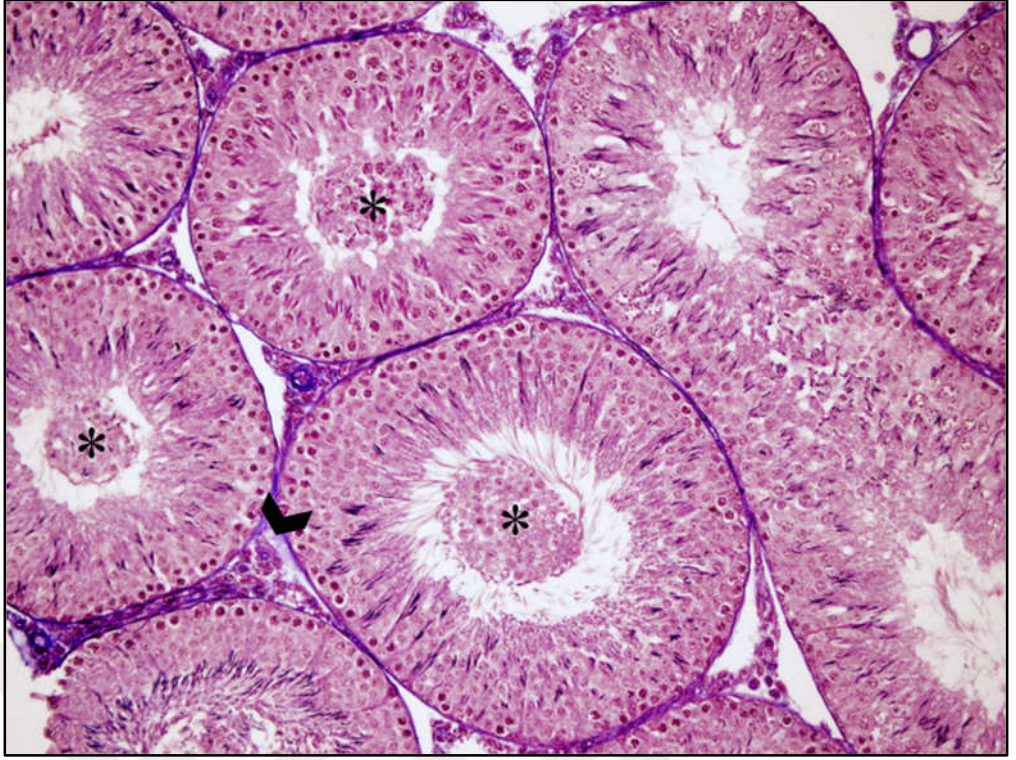


**Resim 17: Kontrol grubunun Masson Trikrom ile boyanmış testis kesiti.** İnterstisyum (yıldız) ve seminifer tübülleri saran tunika propria (çift başlı beyaz ok) doğal olarak görülmektedir (Masson Trikrom, X200).



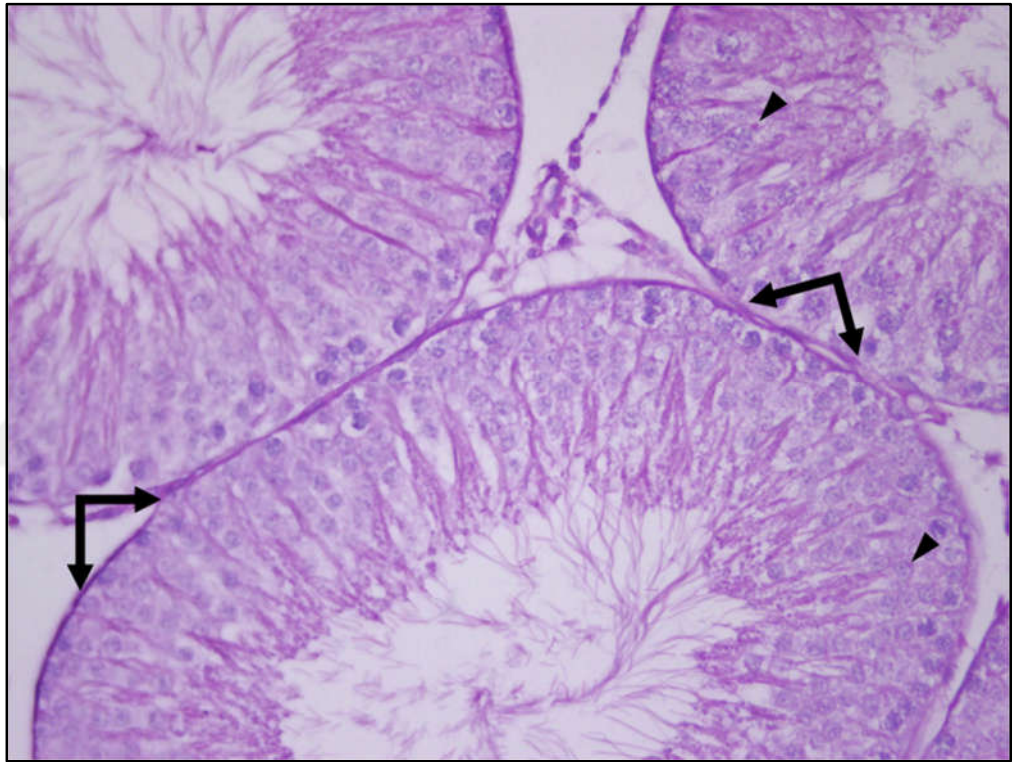


**Resim 18: Siklofosamid grubunun Masson Trikrom ile boyanmış testis kesiti.** Seminifer tübül bazal membranında ayrılma (beyaz çentikli ok), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve interstisyel ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).

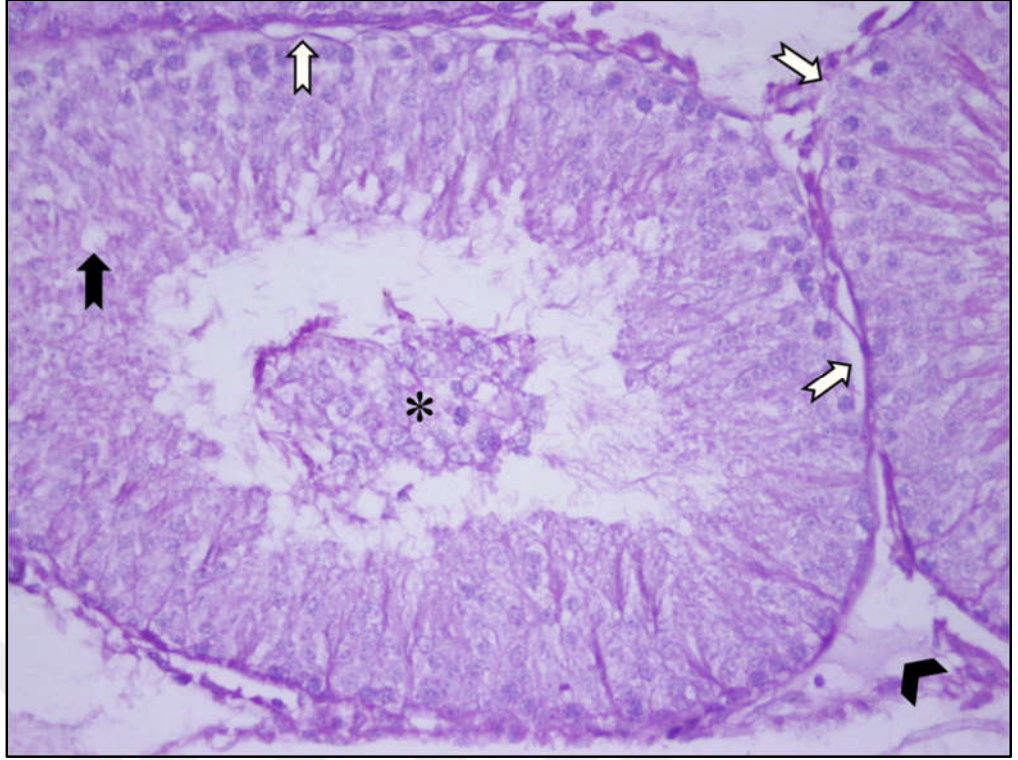


**Resim 19: Siklofosfamid+Ptr grubunun Masson Trikrom ile boyanmış testis kesiti.** Seminifer tübül lümeninde immatür germinal hücreler (yıldız) ve interstisyel ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).

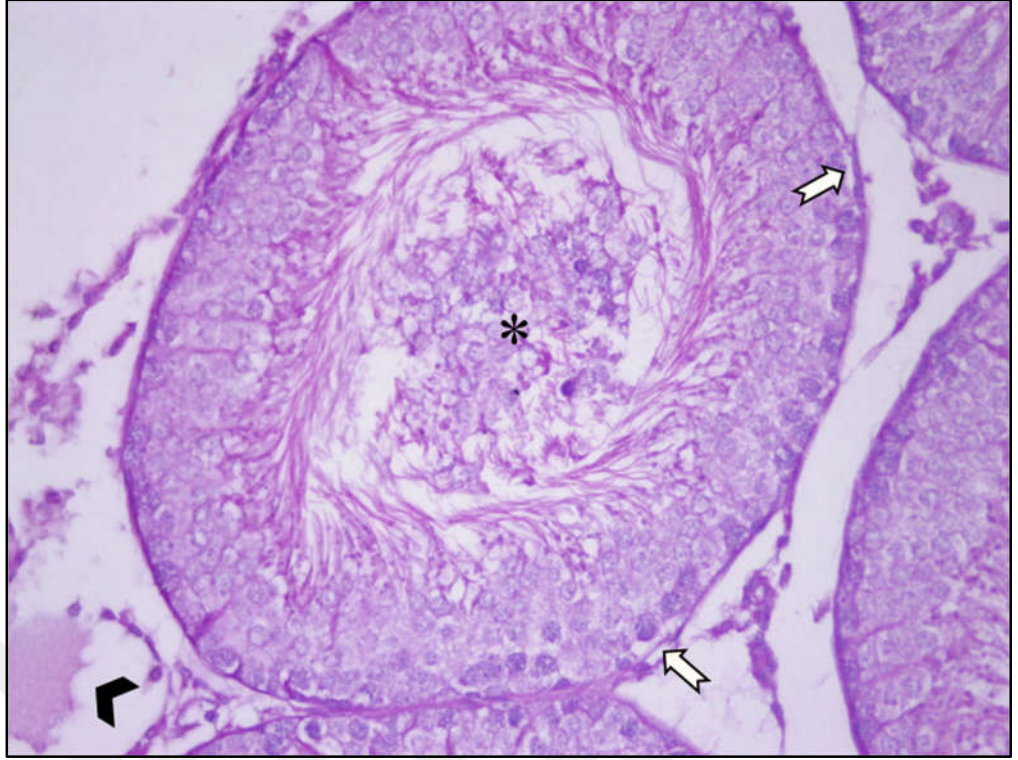
Testis dokusuna ait PAS boyalı kesitler incelendiğinde; K grubunun seminifer tübüllerinin düzgün, kesintisiz PAS (+) bir bazal membranla çevrelendiği ve germinal epitel içerisinde sperm akrozomlarının da PAS (+) boyandığı görüldü (Resim 20). Siklofosfamid grubunda PAS (+) boyanmış bazal membranda yer yer düzensizlik ve ayrılmalar mevcuttu. Ayrıca seminifer tübül lümenine belirgin GHD, germinal epitelde ayrılma ile interstisyumda ödem tespit edildi. (Resim 21). Bu bulgular CP+Ptr grubunda da gözlenmekle birlikte CP grubuna göre hafiflemiş olduğu izlendi (Resim 22).



**Resim 20: Kontrol grubunun PAS ile boyanmış testis kesiti.** Seminifer tübüle ait bütünlüğünü korumuş bazal membran yapısının (çift başlı siyah ok) ve akrozomun (ok başı) PAS (+) boyandığı izlenmektedir (PAS, X400).



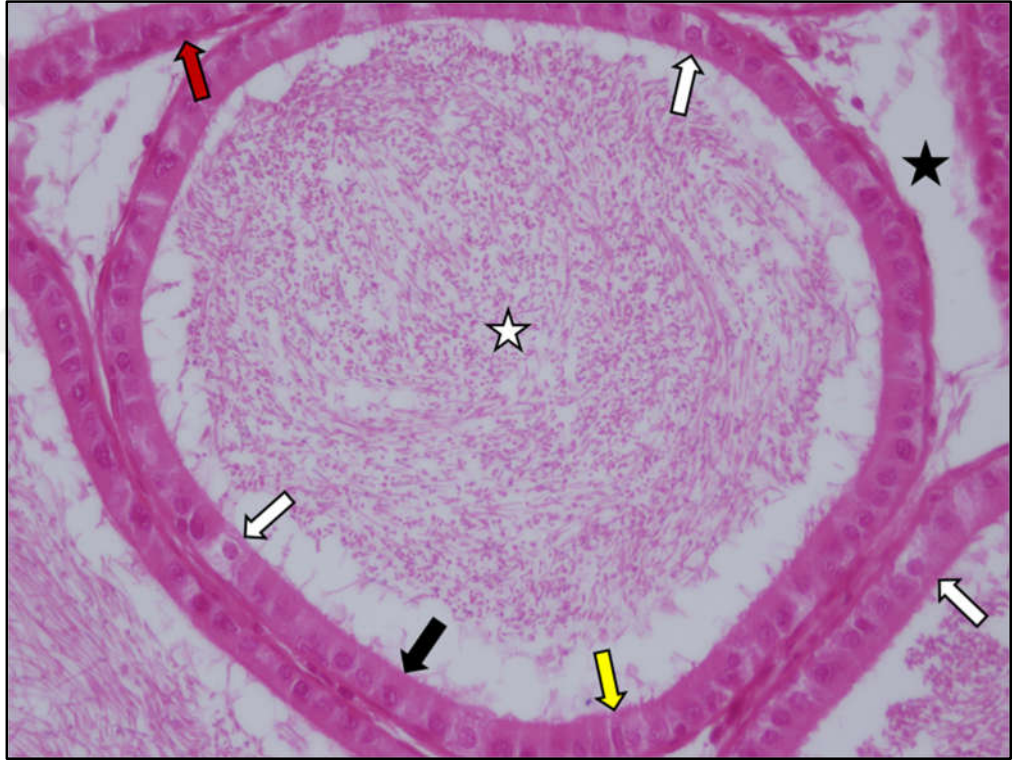
**Resim 21: Siklofosamid grubunun PAS ile boyanmış testis kesiti.** Bazal membranda düzensizlik ve bazal membran ile germinal hücreler arasında ayrılma (beyaz çentikli ok), germinal epitelde ayrılma (siyah çentikli ok), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve interstisyel ödem (köşeli çift ayraç ok) izlenmektedir (PAS, X400).



**Resim 22: Siklofosamid+Ptr grubunun PAS ile boyanmış testis kesiti.** Germinal hücrelerden ayrılan ve düzensizleşen bazal membran (beyaz çentikli ok), immatür germinal hücre dökülmesi (yıldız) ve interstisyel ödem izlenmektedir (PAS, X400).

### 4.3.2. Epididim Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyalı Kesitlerin Bulguları

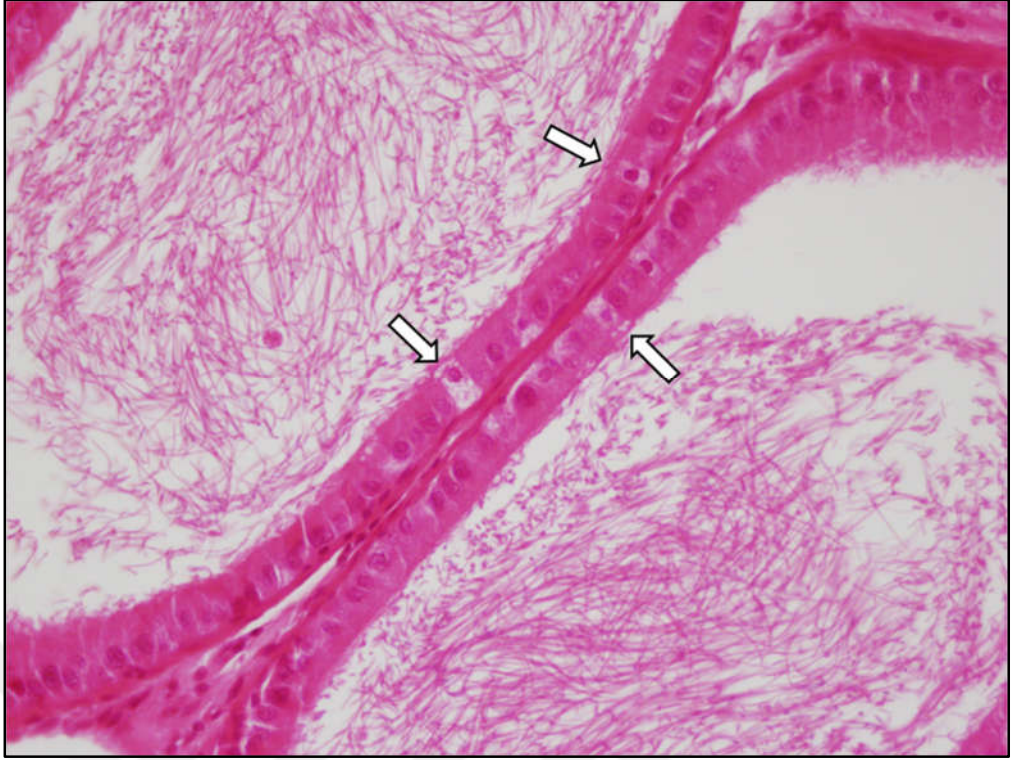
Epididime ait kesitlerin incelenmesi sonucu K grubunda, lümeni çevreleyen yalancı çok katlı stereosilyalı epitelin düzenli olduğu görüldü. Epitelde berrak, dar, esas ve bazal hücreler oldukça net ayırt edilebiliyordu. (Resim 23). Siklofosfamid grubunda ise K grubundan farklı olarak berrak hücre miktarında azalma, halo hücrelerinde artış ve bazı epitel hücrelerinde sitoplazmik vakuoller izlendi (Resim 24). Bunun aksine CP+Ptr grubunda berrak ve halo hücresi miktarı kontrole benzerdi ve sitoplazmik vakuoller kaybolmuştu (Resim 25).



**Resim 23: Kontrol grubunun epididim kesiti.** Duktus epididimisin lümeninde yer alan sperm yığını (beyaz yıldız), epitelin barındırdığı esas hücre (siyah ok), bazal hücre (kırmızı ok), berrak hücre (beyaz ok), dar hücre (sarı ok) ve interstisyum (siyah yıldız) olağan görülmektedir (H&E, X400).



**Resim 24: Siklofosamid grubunun epididim kesiti.** Berrak hücre (beyaz ok), halo hücresi (mavi ok) ve hücrelerdeki sitoplazmik vakuoller (çizgi ok) görülmektedir (H&E, X400).



**Resim 25: Siklofosamid+Ptr grubunun epididim kesiti.** Bol miktarda berrak hücre (beyaz ok) görülmektedir (H&E, X400).



#### 4.4. Testis Dokusunun Biyokimyasal Bulguları

Biyokimyasal verilere göre CP grubundaki MDA düzeyleri, K ve CP+Ptr gruplarına göre belirgin olarak artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo 11, Şekil 18).

İstatistiksel anlamlılık göstermese de SOD seviyeleri açısından CP grubunda, K ve CP+Ptr gruplarına göre belirgin düşüş vardı (Tablo 11, Şekil 18).

Siklofosfamid grubu CAT seviyeleri, K grubuna göre düşüktü ( $p=0,015$ ); CP+Ptr grubunda ise, CP grubuna göre anlamlı olarak arttı ( $p=0,005$ ) (Tablo 11, Şekil 18).

**Tablo 11: Testis dokusu biyokimya parametrelerinin verilerine ait ortalama ve standart sapma değerleri.**

	<b>K</b>	<b>CP</b>	<b>CP+Ptr</b>
	Ort.±SD	Ort.±SD	Ort.±SD
MDA	25,20±7,31	40,31±17,54	24,38±4,26
SOD	0,50±0,18	0,36±0,18	0,58±0,32
CAT	21,6±5,73	11,11±2,3 <sup>a</sup>	23,68±7,21 <sup>b</sup>
TOS	26,5±9,47	45,12±24,95	23,11±6,35 <sup>c</sup>
TAS	0,89±0,23	0,63±0,19	0,79±0,21
OSI	3,17±1,44	9,32±9,42	3,11±1,37
Kaspaz-3	0,19±0,02	0,27±0,11	0,21±0,03
Testosteron	12,98±1,94	9,68±1,76 <sup>d</sup>	12,32±4,78

<sup>a</sup> CP grubunda, doku CAT düzeyi K grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,015$ ).

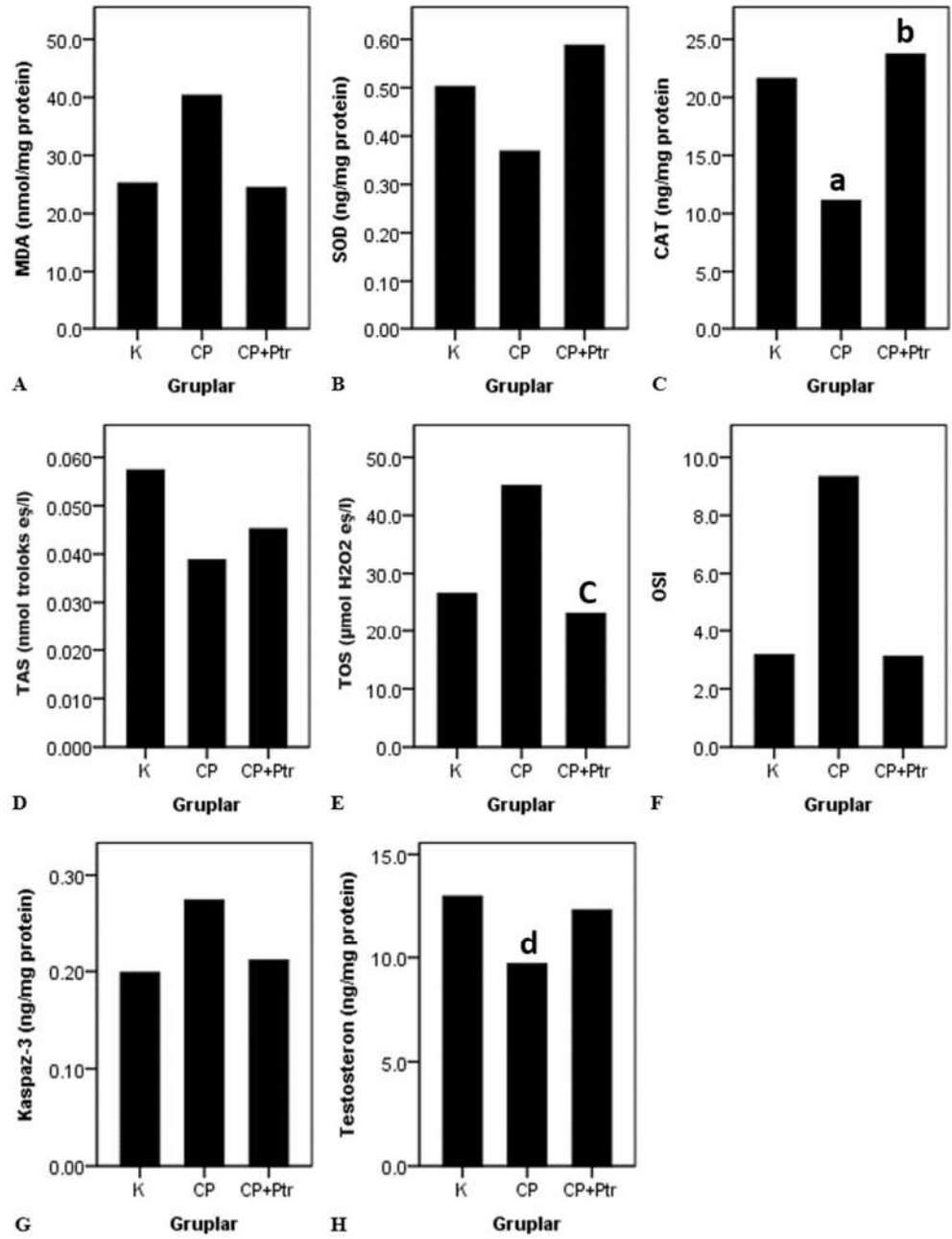
<sup>b</sup> CP+Ptr grubunda, doku CAT düzeyi CP grubuna göre anlamlı olarak arttı ( $p=0,005$ ).

<sup>c</sup> CP+Ptr grubunda, doku TOS düzeyi CP grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,04$ ).

<sup>d</sup> CP grubunda, doku testosteron düzeyi K grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,015$ ).

Veriler, ortalama ± Standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, TAS: Total antioksidan durum, TOS: Total oksidan durum, OSI: Oksidatif stres indeksi.

Total oksidan durum düzeyleri, CP grubunda hem K hem de CP+Ptr grubuna göre yüksek olmasına rağmen bu yükseklik istatistiksel farka neden olmadı. Ancak, CP+Ptr grubunda CP grubuna göre istatistiksel anlamlı bir azalma izlendi ( $p=0,04$ ) (Tablo 11, Şekil 18).



**Şekil 18: Grupların biyokimyasal analiz bulguları.** A. Gruplara ait ortalama MDA düzeyleri. B. Gruplara ait ortalama SOD seviyeleri. C. Gruplara ait ortalama CAT seviyeleri. D. Gruplara ait ortalama TAS seviyeleri. E. Gruplara ait ortalama TOS seviyeleri. F. Gruplara ait ortalama OSI verileri. G. Gruplara ait ortalama kaspaz-3 seviyeleri H. Gruplara ait ortalama testosteron seviyeleri. a: CP grubunda, doku CAT düzeyi K grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,015$ ). b: CP+Ptr grubunda doku CAT düzeyi CP grubuna göre anlamlı olarak arttı ( $p=0,005$ ). c: CP+Ptr grubunda, doku TOS düzeyi CP grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,04$ ). d: CP grubunda, doku testosteron düzeyi K grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p=0,015$ ). K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+Ptr: Siklofosfamid+Pterostilben grubu, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, TAS: Total antioksidan durum, TOS: Total oksidan durum, OSI: Oksidatif stres indeksi.

Gruplar arasında TAS ve OSI deęerleri bakımından anlamlı fark olmamasına karřın; CP grubunda TAS seviyeleri dięer gruplara nazaran daha dūřuk, OSI ise yūksekti (Tablo 11, Őekil 18).

Kaspaz-3 seviyeleri CP ve CP+Ptr gruplarında K grubuna gōre artmışken, bu artış CP grubunda daha belirgindi; ancak gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 11, Şekil 18).

Testosteron seviyeleri CP grubunda hem K grubuna gōre hem de CP+Ptr grubuna gōre dūřūktū. Ancak istatistiksel olarak sadece CP grubunun testosteron seviyesindeki dūřūř, K grubuna gōre anlamlıydı ( $p=0,015$ ) (Tablo 11, Őekil 18).



## 5. TARTIŞMA

Günümüzde yaygın kullanılan, oral ve paranteral uygulanabilen alkilleyici antineoplastik ajanlardan biri olan CP, otoimmün hastalıkların tedavisinde de sıkça tercih edilir (57,60,61).

Antineoplastik ilaçlar, kullanılan ilacın dozu, süresi ve türü gibi faktörlere bağlı olarak değişen miktarlarda gonadotoksik etki gösterirler. Siklofosfamidin de dahil olduğu bu sitotoksik ajanlar, uzun süreli ve kalıcı gonadal toksisiteye bağlı olarak infertiliteye neden olabilirler (24,137).

Literatürde, CP'nin hem dişi hem de erkekte neden olduğu gonadotoksik etkilerini araştıran çok sayıda araştırma mevcuttur. Alkilleyici ajanlar ve bu gruptan özellikle CP; ovaryan foliküllerde kalıcı hasara ve maturasyon defektlerine, amenore ve prematür ovaryan yetmezliğe neden olabilir (137,138). Testisler üzerine de olumsuz etkilere sahip olan CP'nin klinikte uzamış veya kalıcı azospermi yapabildiği bilinmektedir (138,139). Deneysel çalışmalarda CP'nin hem vücut hem de testis ağırlığında azalmaya da neden olduğu gösterilmiştir (13,21). İlave olarak birçok çalışmada da histolojik olarak CP'nin testis tübüllerinde; GEH ve STD'de azalma, tübüler atrofi, germinal epitel ve bazal membran bütünlüğünde bozulma, interstisyumda ödem, kollajen yoğunluğunda artış ve Leydig hücre atrofisine neden olabileceği bildirilmiştir (9,13,22,23,129). Bu etkilerin yanı sıra CP, gerek doku gerekse serum testosteron seviyelerinde azalmaya da yol açabilir (13,21,23). Bazı çalışmalarda ise sperm sayısında, canlılık yüzdesinde, motilite oranında ve normal morfoloji yüzdesinde azalma izlendiği rapor edilmiştir (16,17,22,23). Birçok çalışmada, CP'nin bu istenmeyen etkilerinin dokularda oksidatif stresi indüklemesine ve oksidan-antioksidan dengeyi bozmasına bağlı olabileceği ifade edilmiştir (140,141).

Literatürde, CP'nin neden olduğu gonadal hasarın önlenmesi ya da iyileştirilmesi için antioksidan özelliği olan çinko, melatonin, amifostin ve diallil disülfid gibi farklı maddelerin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (13,129,142,143). Ancak üzüm, yaban mersini, hint kino ağacı gibi bitkilerde bulunan Ptr'in bu amaçla antioksidan olarak kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Resveratrol gibi Ptr de bir fenol grubu bileşiktir. Pterostilbenin

lipofilik olması ve enterohepatik sirkülasyona katılması onun resveratrol'den daha aktif olmasını sağlar. Bu da son yıllarda, bir antioksidan olarak Ptr'in üzerindeki ilginin artmasına neden olmuştur (79,80,82,87,89). Bu nedenle biz de çalışmamızda CP ile hasar oluşturduğumuz rat testislerinde bir antioksidan olarak Ptr'in etkilerini araştırdık.

Siklofosfamid, hızlı bölünen hücrelerde daha belirgin olmak üzere bölünme üzerinde baskılayıcı etkiye sahiptir. Bu nedenle gerek organizmanın tamamında gerekse organ bazında ağırlık kaybına neden olabilir (2). Nitekim deneyin 7. günü 200 mg/kg dozunda ip. CP uygulanan bir çalışmada, 15. gün sakrifiye edilen farelerin vücut ve testis ağırlıklarında belirgin azalma tespit edilmiştir (144). El Tawab ve ark. (2015) da CP ile oluşturulan testis hasarına karşı kış zahteri (Satureja Montana)'nin etkilerini inceledikleri bir başka çalışmada; deneyin 7. günü 200 mg/kg ip. CP uyguladıkları CP grubuna ait sıçanların 15. gün testis ve vücut ağırlıklarında belirgin azalma olduğunu rapor ettiler (12). Oyagbemi ve ark. (2015) ise tek doz 200mg/kg CP uygulamasından sonra; sıçan testis ağırlıklarında düşüş bulmalarına rağmen çalışmamıza benzer şekilde istatistiksel anlamlılık bulamadılar (145). Bizim çalışmamızda da her ne kadar literatürle uyumlu olarak CP grubu sıçanların hem vücut hem de testis ağırlıklarında azalma mevcutsa da bu azalma istatistiksel farka neden olmadı. Bunun nedeni, gruptaki denek sayısının azlığı olabilir. Ayrıca CP grubuna deney süresince verdiğimiz ayçiçeği yağı da bu gruptaki sıçanların kilo kayıplarını biraz önlemiş olabilir (146).

Pterostilben, antiobezitik etkilere de sahip bir antioksidandır. Çalışmamızda CP+Ptr grubunda 15. gün vücut ağırlığında tespit ettiğimiz anlamlı düşüş ise bize göre hem CP'nin hem de Ptr'in ortak kümülatif etkileri sonucu ortaya çıkmış olabilir (107,147).

Sperm analizi, erkek infertilitesinin saptanmasında kullanılan en önemli ve ilk aşama testlerden biridir (148,149). Radyoterapi, kemoterapi ve bazı ilaçların kullanımı; sperm analizinde incelenen parametrelerden (sperm sayısı, hareketliliği, canlılığı ve morfoloji) en az birinde bozukluk yaratarak infertiliteye neden olabilir. Kemoterapötik bir ajan olan CP de sperm analizinde bozulmalara neden olarak infertiliteye yol açabilir (150,151). Literatürdeki bir çalışmada; 5 gün boyunca 28mg/kg/gün CP uygulamasının epididimal sperm analizinde sperm sayısı, hareketlilik

ve normal morfolojisinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (152). Gallik asitin, CP'nin indüklediği testis hasarına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da 200 mg/kg tek doz CP uygulamasının sperm motilite ve canlılığında belirgin düşüşe yol açtığı gösterilmiştir (145). Biz de çalışmamızda literatüre benzer şekilde CP'nin; sperm sayı, motilite, canlılık ve normal morfolojide belirgin azalmaya neden olduğunu gördük. Sperm morfolojisindeki CP kaynaklı bozulmanın, CP+Ptr grubunda muhtemelen Ptr'in antioksidan etkisi ile düzeldiğini gözlemledik. Ancak aynı düzelmeyi sperm sayı ve canlılığında göremedik. Bunun nedeninin ise bazı çalışmalarda gösterilmiş olan, Ptr'in hasarlı hücreleri apoptoza sürükleme etkisine bağlı olabileceğini düşündük (153,154). Sonuçta, bizim çalışmamızda da CP+Ptr grubunda Ptr; CP'nin morfolojisini bozduğu spermeleri apoptoza sürükleyerek sperm sayısında azalma ve dolaylı olarak da sperm morfolojisinde düzelmeye sağlamış olabilir.

Sitotoksik ajanlardan biri olan CP, hücre için gerekli birçok molekülün sentezini engelleyip hücreler üzerinde zararlı etki göstererek doku morfolojisinde de bozulmalara neden olabilir (1,2). Hamzeh ve ark. (2019)'nın 200 mg/kg CP uyguladıkları farelerin testislerinde; spermatogenik hücrelerde dökülme, bozuk seminifer tübülde yapısal bozukluklar ve interstisyumda ödem tespit etmişlerdir (141). Bir başka çalışmada CP'nin; seminifer tübüllerde küçülmeye, tübüler ve germinal hücre hasarına ve interstisyel ödeme neden olduğu bildirilmiştir (21). Biz de literatürle uyumlu olarak CP grubu ratların testis dokusunda; bazı seminifer tübüllerde atrofi, germinal epitelde ayrılma ve dökülmeler, interstisyumda ödem, seminifer tübül bazal membranında kalınlaşma ve düzensizlikler gibi patolojik değişiklikler belirledik (12,155). İmmatür germinal hücre dökülmesi dışında bu verilerin, CP+Ptr grubunda azalmış olması bize Ptr'in, literatürdeki farklı çalışmalarda farklı nedenlerle oluşan karaciğer veya böbrek hasarını gidermesi gibi CP'nin testisteki olumsuz etkilerini de azaltabileceğini gösterdi (98,156). İmmatür germinal hücre dökülmesinde ise azalma olmayıp hatta istatistiksel olarak bir artış mevcuttu. Bunun nedeni hem CP'nin yol açtığı hasar hem de normalde kanser hücreleri gibi patolojik hücrelerce indüklenen Ptr kaynaklı apoptotik mekanizmaların, CP'nin genetik yapısını bozduğu hücrelerde bazı moleküllerce

indüklenmesi olabilir diye düşündük. Çünkü Ptr, genetik yapısı bozulmuş kanserli hücrelerde p53 indüksiyonu yaparak onları apoptoza sürükleyebilir (153).

Epididim de testis gibi CP'nin olumsuz etkilerine maruz kalabilir. Akamofole ve ark. (2020) yapmış oldukları bir çalışmada, 150 mg/kg CP verdikleri sıçan epididimlerinde genel histolojik yapının bozulduğunu ve hemorajik alanlar görüldüğünü rapor etmişlerdir (157). Biz ise çalışmamızda, CP grubunda genel yapının korunduğunu, ancak bazı hücrelerde patolojik sitoplazmik vakuoller görüldüğünü tespit ettik. Trasler ve ark. (1988) da farklı sürelerde 5,1 ve 6,8 mg/kg dozlarında uyguladıkları CP'nin epididimdeki berrak ve halo hücrelerde artışa neden olduğunu bildirdiler (158). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde epididimal halo hücreleri artarken; aksine berrak hücreler azalmıştı. Bu farklılığın CP dozu ve süresi ile ilgili olabileceğini düşündük. Siklofosamid+Ptr grubunda ise, sitoplazmadaki patolojik vakuollerin kaybolduğunu, halo ve berrak hücrelerin de miktar olarak azaldığını gözlemledik. İmmünite ile ilgili halo hücre miktarındaki azalmanın Ptr'in anti-inflamatuvar etkisi ile ilgili olabileceğini düşündük (92).

Testis dokusunda CP, histopatolojik hasar oluşturmaya paralel olarak histomorfometrik ölçümlerde de belirgin bozulmalara neden olabilir. Kaya ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada 200 mg/kg CP uygulamasının testiste MJS ve GEH'te belirgin düşüşe neden olduğunu göstermişlerdir (142). Hamzeh ve ark. (2019) da CP ile indüklenen testis hasarı üzerine seryum oksit nano partiküllerinin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada MJS, STD ve GEH'te belirgin azalma bulmuşlardır (141). Biz de çalışmamızın CP grubunda, literatürle uyumlu şekilde MJS, GEH ve STD' de düşüş tespit ettik; bu düşüş MJS için anlamlıydı. Bu histomorfometrik değerlerde saptanan düşüşlerin; sitotoksik bir ajan olan CP'nin, özellikle hızlı bölünen germ hücrelerini hedef almasına bağlı olabileceğini düşündük (159). Ayrıca STD ölçümü sırasında testisteki atrofik tübüleri ölçüm dışı bırakmamız da tübül atrofisinin daha yoğun olduğu CP grubunda STD'deki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasını açıklayabilir.

Sıçanlarda testiküler iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine Ptr'in koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 50 mg/kg tek doz uygulanan Ptr'in, Johnsen skorunu ve STD'yi hasar grubuna göre artırdığı, yani hasarı düzeltme yönünde çalıştığı gösterilmiştir (106). Bizim çalışmamızda da Ptr, her ne kadar istatistiksel

anlamli olmasa da Kim ve ark. (2015)'nin çalişmasına benzer şekilde hem STD hem de MJS'de bir miktar artış, yani iyileşme sağlamıştır (106).

Oksidatif stres, herhangi bir nedenle ROS artışına neden olan bir durum olup CP ile de indüklenebilir (14,16,19,160). İlave olarak CP'nin de içinde bulunduğu antineoplastikler ve Ptr'in dahil olduğu antioksidanlar da dokuda oksidan ve antioksidan parametreler üzerinde etki yaparak oksidatif dengeyi değiştirebilir (161,162). Literatürde, 200 mg/kg CP uygulamasının testis dokusunda MDA'yı artırdığı; CAT'ı azalttığı çalişmalar mevcuttur (144,145). Bir başka çalişmada ise CP'nin testis dokusunda MDA'da artışa; TAS'ta düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (12). Biz de çalişmamızda literatürle uyumlu olarak CP grubu testislerde -bazıları istatistiksel anlamli olmasa da- oksidatif stres göstergelerinden MDA, TOS ve OSI'de artış ve antioksidan parametrelerden CAT, SOD ve TAS'ta düşüş belirledik. Bu bize, CP'nin testis dokusunda yaptığı hasarın oksidatif kaynaklı olabileceğini düşündürdü. İlave olarak kontrole göre CP grubu doku CAT seviyesindeki istatistiksel anlamli düşüş; artan oksidatif stresin kompanse edilebilmesi için kullanılan CAT miktarının artışı veya antineoplastiklerin CAT üzerindeki baskılayıcı etkisi ile açıklanabilir. Testis dokusu gibi epididimal spermeler de oksidatif strese oldukça hassastırlar (143). Çalişmamızda, epididim dokusunun oksidan-antioksidan düzeyleri bakılamamıştır ancak organizma bir bütündür ve testisteki oksidan durum göz önüne alındığında; çalişmamızda CP grubu sperm parametrelerindeki düşüşün sebebi de hem testisi hem de epididimi etkileyen oksidatif stres olabilir.

Literatürde Ptr'in antioksidan etkisini gösteren çok sayıda çalişma mevcuttur (34,98,156). Bu çalişmalardan birinde Fan ve ark. (2018) asetaminofenle indüklene karaciğer hasarında, Ptr uygulamasının MDA'da azalma ile SOD ve GSH'de artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (163). Bir başka çalişmada ise diyabet modeli oluşturulan sıçanların kalplerinde Ptr'in; MDA'yı düşürdüğü, SOD, CAT, GSH-Px ve GSH'yi artırdığı görülmüştür (34). Testis dokusunda da iskemi/reperfüzyon hasarına karşı uygulanan Ptr'in testiküler MDA'yı azalttığı, TAS'ı artırdığı bulunmuştur (106). Biz de tüm parametrelerimizde literatüre benzer sonuçlar elde ettik, ancak sadece CAT miktarındaki artış ve TOS miktarındaki azalma istatistiksel anlamlilik gösterdi. Siklofosfamid+Ptr grubunda TOS düzeyinin anlamli olarak azalması Ptr'in oksidatif stresi azalttığını gösterebilir. Doku CAT düzeyinin CP



grubuna göre anlamlı olarak artışı ise Ptr'in antioksidan etkisinin bir göstergesi olabilir ve dokulardaki iyileşmeyi açıklayabilir.

Dokuda oksidatif dengenin oksidanlar lehine değişmesiyle apoptoz indüklenebilir (164). El Tawab ve ark. (2014) CP'nin testis dokusu üzerindeki apoptotik etkisini göstermişlerdir (12). Bir başka çalışmada, üç immünohistokimyasal yöntem (TUNEL, APAF-1 ve kaspaz-3) ile CP'nin apoptotik indeksi arttırdığı tespit edilmiştir (165). Hamzeh ve ark. (2019) da CP grubunda testis dokusunda kaspaz-3 immün reaktivitesinin arttığını göstermişlerdir (141). Biz de ELISA yöntemiyle kaspaz-3'ü analiz ettiğimiz çalışmamızda literatüre benzer şekilde CP grubunda kaspaz-3 düzeylerinde K grubuna göre artış gördük. Her ne kadar bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da indüklenmiş apoptozun bir göstergesi olabilir. Ayrıca CP grubunda tespit edilen yoğun hasarın; apoptozun yanında otofaji, nekroz gibi farklı mekanizmaların da ortak sonucu olabileceğini düşündük (141,166). İlave olarak daha sonraki çalışmalarımızda, dokuda apoptozun tam olarak değerlendirilebilmesi için farklı yöntemlerin kombine kullanılmasının da yararlı olabileceği kanaatindeyiz (167).

Kanserli hücreleri apoptoza götüren Ptr, antioksidan etkisi ile sağlıklı hücreleri apoptozdan koruyabilir (168). Yapılan bir çalışmada Ptr'in kanserli hücreleri p53 indüksiyonu yaparak apoptoza götürdüğü rapor edilmiştir (153). Literatürde başka bir çalışmada ise, Ptr'in testis dokusundaki antiapoptotik etkisi immünohistokimyasal (TUNEL yöntemi ve kaspaz-3, 8, ve 9) olarak gösterilmiştir (106). Biz de çalışmamızda CP+Ptr grubunda kaspaz-3 seviyelerinin kontrole benzer olduğunu gördük. Bu seviyelerin CP grubuna göre düştüğünü ancak gruplar arasında fark olmadığını tespit ettik. Bunun nedeni, Ptr'in bir yandan sorunlu hücreleri apoptoza gönderirken diğer yandan sağlıklı hücrelerde antiapoptotik etki göstermesi olabilir diye düşündük. İlave olarak CP+Ptr grubunun GHD'sinin K grubuna göre anlamlı olarak artmasına rağmen CP ile arasında fark bulunmamasını da bu ikili etki ile açıklamak mümkün olabilir. Ayrıca CP'nin germinal hücreler gibi hızlı bölünen hücrelerde belirgin hasara neden olması ve Ptr'in normal hücreler üzerinde antiapoptotik etkiye sahipken, hasarlı hücreler üzerinde p53 indüksiyonu yaparak apoptotik etki göstermesi bunda rol oynayabilir (153,169).

Dolaşımdaki temel androjen testosterondur ve erkekte büyük oranda testisteki Leydig hücrelerince sentezlenir (110). Sertoli hücresinin salgıladığı ABP testosteronu bağlar ve onun seminifer tübülde konsantrasyonunu artırır. Testosteron spermatogenezin seyrinde önemli role sahiptir (41). Kullanılan antineoplastik ajanlar, testisin Sertoli ve germinal hücrelerine ilaveten Leydig hücreleri üzerinde de etkili olabilir (170,171). Literatürde, CP'nin serum testosteron seviyelerinde azalmaya yol açtığı ve bunun sebebinin, CP'nin Leydig hücreleri üzerindeki oksidan etkisi olabileceği rapor edilmiştir (12,144,165). Biz de literatürde görülen serum testosteron seviyelerindeki düşmeye benzer şekilde CP grubu testis dokusu testosteron seviyelerinde de anlamlı düşüş tespit ettik. Bu etki, çalışmamızda CP'nin neden olduğu oksidatif strese bağlanabilir. Ayrıca CP'nin, Leydig hücre DNA'sını alkillemesine bağlı olarak Leydig hücre çoğalmasını ve gerekli moleküllerin sentezini engellemesi de buna yol açmış olabilir (1,2). Literatürdeki pek çok çalışmada bir stilben olan resveratrolün farklı moleküllerle hasar oluşturulan deneklerde serum testosteron seviyelerindeki düşüşü düzelttiği bildirilmiştir (172,173). Bizim çalışmamızda ise CP+Ptr grubunda doku testosteron değerleri CP grubuna göre yükselmiş ve kontrol grubu ile arasındaki fark kalkmıştır. Serum testosteron seviyelerinde resveratrolün yaptığı gibi Ptr de, doku testosteron seviyelerinde düzelleme sağlamıştır.

Sonuç olarak CP, testis ve epididim doku biyokimyası ve histolojisi ile sperm analizinde bozulmalara yol açabilir. Pterostilben ise bu dokularda CP ile indüklenen oksidatif hasarı azaltabilir. Ancak bu iyileştirici etkinin daha iyi değerlendirilebilmesi için farklı doz ve uygulama süreleri ile yeni çalışmalar planlanmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Pterostilbenin, erişkin erkek sıçan testis ve epididim dokularındaki CP ile indüklenen hasarı önleme ve/veya iyileştirmesindeki rolünü deneysel olarak araştırdığımız çalışmamızda:

Siklofosfamidin;

1. Sperm motilite, canlılık ve normal morfoloji oranını azalttığı,
2. Testis dokusunda MJS'de düşüşe, GHD'de artışa neden olduğu,
3. Testis ve epididim dokusunun histolojik yapısında bozulmaya sebep olduğu,
4. Doku CAT ve testosteron düzeylerini azalttığı görüldü.

Pterostilbenin;

1. Vücut ağırlığını azalttığı,
2. Siklofosfamidin bozmuş olduğu sperm morfolojisini düzelttiği, ancak sperm canlılığı ve motilitesini etkilemediği,
3. Siklofosfamidin hasarlamış olduğu testis ve epididim dokularında histolojik olarak iyileşme sağladığı, ancak MJS ve GHD üzerindeki etkisini değiştirmedeği,
4. Testis dokusunda CP'nin azalttığı CAT düzeylerini artırdığı ve CP'nin artırdığı TOS düzeylerini azalttığı tespit edildi.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda yapılacak sonraki çalışmalarda;

1. Pterostilbenin iyileştirici etkisinin daha iyi değerlendirilebilmesi için farklı doz ve süre uygulamaları yapılabilir.
2. Dokularda çalışılan oksidan ve antioksidan parametreler genişletilebilir.
3. Ayrıca bu parametreler üzerindeki etkilerin araştırılması için gen düzeyinde çalışmalar yapılabilir.
4. Dokulardaki apoptozu daha efektif değerlendirebilmek için farklı apoptoz belirleme yöntemleri daha sonraki çalışmalara ilave edilebilir.
5. Testis dokusu germinal epitelinde yer alan hücrelerin apoptoz oranları ile lümene dökülmüş germinal hücrelerin apoptoz oranlarının kıyaslanması yapılabilir.

6. Siklofosfamidin ve Ptr'in Leydig hücresi üzerindeki etkisini belirlemek için bu hücrelerin sayı ve boyut ölçümleri yapılabilir.
7. Testis doku testosteron seviyelerine ilave olarak androjen reseptörü, ABP seviyeleri ve serum testosteron düzeyleri de analiz edilebilir.
8. Epididim dokusunda da oksidatif denge ve apoptoz araştırılabilir.
9. Sperm DNA hasarını ve onarımını belirlemek için comet assay, TUNEL gibi yöntemler kullanılabilir.
10. Elektron mikroskopik çalışma ile epididim ve testisteki hücrelerin ve germinal epiteldeki hücreler arası bağlantıların değerlendirilmesi yapılabilir.



## KAYNAKLAR

1. Lednicer D. Alkylating Agents. In: Antineoplastic Drugs : Organic Syntheses [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2015 [cited 2020 Feb 28]. p. 2–12. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/ktulibrary-ebooks/reader.action?docID=1964101>
2. Curtis JJ. Cyclophosphamide. In: Kaplan B, Burkhart GJ, Lakkis FG, editors. Immunotherapy in Transplantation : Principles and Practice [Internet]. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2012 [cited 2020 Feb 28]. p. 290–5. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/ktulibrary-ebooks/detail.action?docID=861626&query=cyclophosphamide>
3. Oyagbemi AA, Omobowale OT, Asenuga ER, Akinleye AS, Ogunsanwo RO, Saba AB. Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in wistar rats: The modulatory role of gallic acid as a hepatoprotective and chemopreventive phytochemical. *Int J Prev Med.* 2016;7(1):51–68.
4. Saba, Khan S, Parvez S, Chaudhari B, Ahmad F, Anjum S, et al. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2020 Feb 28];58:210–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603381>
5. Singh C, Prakash C, Tiwari KN, Mishra SK, Kumar V. Premna integrifolia ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulation of oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:634–43.
6. Kurauchi K, Nishikawa T, Miyahara E, Okamoto Y, Kawano Y. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. *BMC Res Notes.* 2017;10(1):406.
7. Murali VP, Kuttan G. Curculigo orchioides Gaertn Effectively Ameliorates the Uro- and Nephrotoxicities Induced by Cyclophosphamide Administration in Experimental Animals. *Integr Cancer Ther.* 2016;15(2):205–15.
8. Gunes S, Sahinturk V, Uslu S, Ayhanci A, Kacar S, Uyar R. Protective Effects of Selenium on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Kidney Injury. *Biol Trace Elem Res.* 2018 Sep 1;185(1):116–23.
9. Singh S, Lata S, Tiwari KN. Antioxidant potential of phyllanthus fraternus webster on cyclophosphamide induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in mice. *Indian J Exp Biol.* 2015;53(10):647–56.
10. Hamzeh M, Seyed Jalal H, Hamid Reza M, Saeed Yaghubi B, Ayat D, Fereshteh Talebpour A. Atorvastatin attenuates the ovarian damage induced by cyclophosphamide in rat: An experimental study. *Int J Reprod Biomed.* 2018;16(5):323–34.

11. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. Robbins Basic Pathology [Internet]. Elsevier Inc.; 2018 [cited 2020 Feb 28]. p. 31–56. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323353175000028?indexOverride=GLOBAL>
12. Abd El Tawab AM, Shahin NN, Abdelmohsen MM. Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chem Biol Interact*. 2014;224:196–205.
13. Maremanda KP, Khan S, Jena G. Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: Involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;445(3):591–6.
14. Roy SS, Chakraborty P, Bhattacharya S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2014 Feb 12 [cited 2020 Feb 28];73:195–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412495>
15. Li J, Hu Y, Zhang Q, Ma B, Wu Z, Wang Y, et al. Strontium fructose 1, 6-diphosphate alleviate cyclophosphamide-induced oligozoospermia by improving antioxidant and inhibiting testicular apoptosis via FAS/FASL pathway. *Andrologia*. 2015;47(9):995–1003.
16. Zhao H, Jin B, Zhang X, Cui Y, Sun D, Gao C, et al. Yangjing Capsule Ameliorates Spermatogenesis in Male Mice Exposed to Cyclophosphamide. Evidence-based Complement Altern Med. 2015;2015.
17. Yuan D, Wang H, He H, Jia L, He Y, Wang T, et al. Protective effects of total flavonoids from epimedium on the male mouse reproductive system against cyclophosphamide-induced oxidative injury by up-regulating the expressions of SOD3 and GPX1. *Phyther Res*. 2014;28(1):88–97.
18. Zhu B, Zheng Y, Zhang Y, Cao Y, Zhang L, Li X, et al. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. *J Zhejiang Univ B*. 2015;16(9):780–7.
19. Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L, Meistrich ML. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2020 Feb 28];32(4):395–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001253>
20. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*. 2008 Jun 27;248(2–3):96–103.

21. Ahmed LA, El-Maraghy SA, Rizk SM. Role of the KATP channel in the protective effect of nicorandil on cyclophosphamide-induced lung and testicular toxicity in rats. *Sci Rep*. 2015;5:14043.
22. Le X, Luo P, Gu Y, Tao Y, Liu H. Interventional effects of squid ink polysaccharides on cyclophosphamide-associated testicular damage in mice. *Bratisl Lek Listy [Internet]*. 2015 [cited 2020 Feb 28];116(5):334–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25924645>
23. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril*. 2009;92(3):1124–32.
24. Cigni A, Faedda R, Atzeni MM, Pileri PV, Alagna S, Rovasio P, et al. Hormonal Strategies for Fertility Preservation in Patients Receiving Cyclophosphamide to Treat Glomerulonephritis: A Nonrandomized Trial and Review of the Literature. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(5):887–96.
25. Currey H, Harris J, Mason R, Woodland J, Beveridge T, Roberts C, et al. Comparison of azathioprine, cyclophosphamide, and gold in treatment of rheumatoid arthritis. *Br Med J*. 1974;28(3):763–6.
26. Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(4):587–96.
27. Potnuri AG, Allakonda L, Lahkar M. Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:174–80.
28. Yu D, Zhang Y, Chen G, Xie Y, Xu Z, Chang S, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by pterostilbene attenuates mantle cell lymphoma progression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018;50(8):782–92.
29. Liu X, Yang X, Han L, Ye F, Liu M, Fan W, et al. Pterostilbene alleviates polymicrobial sepsis-induced liver injury: Possible role of SIRT1 signaling. *Int Immunopharmacol*. 2017;49:50–9.
30. Yu Z, Wang S, Zhang X, Li Y, Zhao Q, Liu T. Pterostilbene protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppressing oxidative/nitrative stress and inflammatory response. *Int Immunopharmacol*. 2017;43:7–15.
31. Yang Y, Fan C, Wang B, Ma Z, Wang D, Gong B, et al. Pterostilbene attenuates high glucose-induced oxidative injury in hippocampal neuronal cells by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(4):827–37.

32. Song Z, Han S, Pan X, Gong Y, Wang M. Pterostilbene mediates neuroprotection against oxidative toxicity via oestrogen receptor  $\alpha$  signalling pathways. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(5):720–30.
33. Riche DM, Riche KD, Blackshear CT, McEwen CL, Sherman JJ, Wofford MR, et al. Pterostilbene on Metabolic Parameters: A Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2014;2014:1–8.
34. Kosuru R, Kandula V, Rai U, Prakash S, Xia Z, Singh S. Pterostilbene Decreases Cardiac Oxidative Stress and Inflammation via Activation of AMPK/Nrf2/HO-1 Pathway in Fructose-Fed Diabetic Rats. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018;32(2):147–63.
35. Pari L, Satheesh MA. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2006;79(7):641–5.
36. McCormack DE, Mannal P, McDonald D, Tighe S, Hanson J, McFadden D. Genomic Analysis of Pterostilbene Predicts Its Antiproliferative Effects Against Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo. *J Gastrointest Surg* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Feb 28];16(6):1136–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450950>
37. Wen W, Lowe G, Roberts CM, Finlay J, Han ES, Glackin CA, et al. Pterostilbene, a natural phenolic compound, synergizes the antineoplastic effects of megestrol acetate in endometrial cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10.
38. Wen W, Lowe G, Roberts CM, Finlay J, Han ES, Glackin CA, et al. Pterostilbene suppresses ovarian cancer growth via induction of apoptosis and blockade of cell cycle progression involving inhibition of the STAT3 pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1983.
39. Daniel M, Tollefsbol TO. Pterostilbene down-regulates hTERT at physiological concentrations in breast cancer cells: Potentially through the inhibition of cMyc. *J Cell Biochem* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2020 Feb 28];119(4):3326–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29125889>
40. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West P. Development of the Reproductive System. In: Larsen's Human Embryology [Internet]. 5th ed. Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc.; 2015 [cited 2020 Feb 29]. p. 394–428. Available from: <https://www.clinicalkey.com#!/content/book/3-s2.0-B9781455706846000163>
41. Carlson BM. Urogenital System. In: Human Embryology and Developmental Biology [Internet]. 6th ed. Elsevier, Inc.; 2019 [cited 2020 Feb 29]. p. 358–90. Available from: <https://www.clinicalkey.com#!/content/book/3-s2.0-B9780323523752000165>



42. Sadler TW. Urogenital System. In: Langman's Medical Embryology. 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 232–59.
43. Sadler TW. Gametogenesis: Conversion of Germ Cells into Male and Female Gametes. In: Langman's Medical Embryology. 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 10–28.
44. Moore KL, Persaud T, Torchia M. Urogenital System. In: The Developing Human [Internet]. 11th ed. Elsevier Inc.; 2020 [cited 2020 Feb 29]. p. 241–82. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323611541000126?scrollTo=%23hl0001299>
45. Cochard LR. The Urogenital System. In: Netter's Atlas of Human Embryology [Internet]. Updated. Elsevier, Inc.; 2012 [cited 2020 Feb 29]. p. 157–84. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9781455739776000077>
46. Strandring S. Male reproductive system. In: Gray's Anatomy [Internet]. 41st ed. Elsevier Limited.; 2016 [cited 2020 Feb 29]. p. 1272–87. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780702052309000765>
47. Pawlina W, Ross MH. Male Reproductive System. In: Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. 7th ed. Wolters Kluwer Health; 2016. p. 790–833.
48. Lowe JS, Anderson PG, Anderson SI. Male Reproductive System. In: Stevens & Lowe's Human Histology [Internet]. 5th ed. Elsevier Limited; 2020 [cited 2020 Feb 29]. p. 297–313. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323612791000168>
49. Ovalle WK, Nahimey PC. MALE REPRODUCTIVE SYSTEM. In: Netter's Essential Histology [Internet]. 2nd ed. Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2013 [cited 2020 Feb 29]. p. 381–402. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9781455706310500242>
50. Mescher AL. The Male Reproductive System. In: Junqueira's Basic Histology Text & Atlas. 13th ed. McGraw-Hill Education; 2013. p. 947–86.
51. Kierszenbaum AL, Tres LL. SPERMATOGENESIS. In: Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology [Internet]. 5th ed. Elsevier, Inc.; 2020 [cited 2020 Feb 29]. p. 663–700. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323673211500249>
52. Carlson BM. Getting Ready for Pregnancy. In: Human Embryology and Developmental Biology [Internet]. 6th ed. Elsevier, Inc.; 2019 [cited 2020 Feb 29]. p. 2–23. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323523752000013>

53. Gartner LP. Male Reproductive System. In: Textbook of Histology [Internet]. 4th ed. Elsevier, Inc.; 2017 [cited 2020 Feb 29]. p. 559–82. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323355636000215>
54. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Male reproductive system. In: Wheater's Functional Histology [Internet]. 6th ed. Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Ltd.; 2014 [cited 2020 Feb 29]. p. 337–50. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780702047473000185>
55. Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer*. 2001;91(3):613–21.
56. Pettersson T, Pukkala E, Teppo L, Friman C. Increased risk of cancer in patients with systemic lupus erythematosus. Vol. 51, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1992.
57. Cannon GW. Immunosuppressing Drugs Including Corticosteroids. In: Goldman L, Schafer AI, editors. Goldman-Cecil Medicine [Internet]. 25th ed. Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2016 [cited 2020 Feb 29]. p. 162–9. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9781455750177000350>
58. FOYE L V, CHAPMAN CG, WILLETT FM, ADAMS WS. Cyclophosphamide. A preliminary study of a new alkylating agent. *Cancer Chemother reports* [Internet]. 1960 Feb [cited 2020 Feb 28];6:39–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13824276>
59. Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Anticancer drugs. In: Rang & Dale's Pharmacology [Internet]. 9th ed. Elsevier Ltd.; 2020 [cited 2020 Feb 29]. p. 716–32. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780702074486000573?indexOverride=GLOBAL>
60. Gerson SL, Caimi PF, William BM, Creger RJ. Pharmacology and Molecular Mechanisms of Antineoplastic Agents for Hematologic Malignancies. In: Hematology: Basic Principles and Practice [Internet]. 7th ed. Elsevier, Inc.; 2018 [cited 2020 Feb 29]. p. 849–912. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323357623000573?scrollTo=%23hl0000828>
61. Luznik L, O'Donnell P V., Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Feb 28];14(6):641–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489989>

62. Citron ML, Berry DA, Cirrincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ, et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: First report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia. *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1431–9.
63. Roth BBJ, Johnson DH, Einhorn LH, Schacter LP, Cherng NC, Cohen HJ, et al. Randomized Study of Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Vincristine Versus Etoposide and Cisplatin Versus Alternation of These Two Regimens in Extensive Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial of the Southeastern Cancer Study Group. *Journal of Clin.* 1992;10(2):282–91.
64. Aronson JK, editor. Cyclophosphamide. In: *Meyler's Side Effects of Drugs* [Internet]. 16th ed. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2020 Feb 29]. p. 785–94. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780444537171005734>
65. Moore MJ. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet.* 1991;20(3):194–208.
66. Shaunak S, Munro JM, Weinbren K, Walport MJ, Cox TM. Cyclophosphamide-induced liver necrosis: A possible interaction with azathioprine. *Qjm.* 1988;67(252):309–17.
67. Langford CA. Complications of cyclophosphamide therapy. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 1997;254(2):65–72.
68. DeLair SM, De Vere White RW, Kurzrock EA. Secondary transitional cell carcinoma and nitrogen mustard treatment. Vol. 65, *Urology.* 2005.
69. Singal R, Tunnessen WW, Wiley JM, Hood AF. Discrete Pigmentation After Chemotherapy. *Pediatr Dermatol.* 1991;8(3):231–5.
70. Federman DG, Henry G. Chemotherapy-induced myocardial necrosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Respir Med.* 1997;91(9):565–7.
71. Tiersten A, Wo J, Jacobson C, Weitzman A, Horwich T, Hesdorffer C, et al. Cardiac toxicity observed in association with high-dose cyclophosphamide-based chemotherapy for metastatic breast cancer. *The Breast.* 2004;13(4):341–6.
72. Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, Rapoport JM. Cyclophosphamide cardiotoxicity: An analysis of dosing as a risk factor. *Blood.* 1986;68(5):1114–8.
73. Glatt VE, Henke M, Sigmund G, Costabel U. Pneumonitis induced by cyclophosphamide. *RöFo.* 1988;148(5):545–9.

74. Malik SW, Myers JL, DeRemee RA, Specks U. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use: Two distinct patterns. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(6):1851–6.
75. Cavallasca JA, Costa CA, Maliandi M del R, Contini LE, Fernandez de Carrera E, Musuruana JL. Severe Infections in Patients With Autoimmune Diseases Treated With Cyclophosphamide. *Reumatol Clínica (English Ed.* 2015;11(4):221–3.
76. Radis CD, Kahl LE, Baker GL, Chester M, Wasko M, Cash JM, et al. Effects of Syslophosphamide on the Development of Malignancy and on Long-Term Survival of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(8):1120–7.
77. Wang CL, Wang F, Bosco JJ. Ovarian failure in oral cyclophosphamide treatment for systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1995;4(1):11–4.
78. McDermott EM, Powell RJ. Incidence of ovarian failure in systemic lupus erythematosus after treatment with pulse cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis.* 1996;55(4):224–9.
79. Roupe K, Remsberg C, Yanez J, Davies N. Pharmacometrics of Stilbenes: Seeking Towards the Clinic. *Curr Clin Pharmacol.* 2006;1(1):81–101.
80. Kothawade PB, Dudulgaon AP, Haveli T. Phytochemical Investigation & Characterization of Heartwood of *Pterocarpus Marsupium* Roxb. (Family: Leguminosae). *World J Pharm Pharm Sci.* 2018;7(2):806–18.
81. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem.* 2004;52(15):4713–9.
82. Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol.* 1976;9(1):77–86.
83. Langcake P, Cornford CA, Pryce RJ. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry.* 1979;18(6):1025–7.
84. Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM. Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat Prod Rep.* 2012;29(11):1317–33.
85. Ansari M, Sadarani B, Majumdar A. Colon targeted beads loaded with pterostilbene: Formulation, optimization, characterization and in vivo evaluation. *Saudi Pharm J.* 2019;27(1):71–81.
86. Akinwumi BC, Bordun KAM, Anderson HD. Biological activities of stilbenoids. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):1–25.

87. Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(3):593–601.
88. Tsai HY, Ho CT, Chen YK. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *J Food Drug Anal*. 2017;25(1):134–47.
89. Wang TTY, Schoene NW, Kim YS, Mizuno CS, Rimando AM. Differential effects of resveratrol and its naturally occurring methylether analogs on cell cycle and apoptosis in human androgen-responsive LNCaP cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(3):335–44.
90. Dellinger RW, Garcia AMG, Meyskens FL. Differences in the glucuronidation of resveratrol and pterostilbene: Altered enzyme specificity and potential gender differences. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;29(2):112–9.
91. Remsberg CM, Yáñez JA, Ohgami Y, Vega-Villa KR, Rimando AM, Davies NM. Pharmacometrics of pterostilbene: Preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phyther Res*. 2008 Feb;22(2):169–79.
92. Li Q, Chen L, Liu X, Li X, Cao Y, Bai Y, et al. Pterostilbene inhibits amyloid- $\beta$ -induced neuroinflammation in a microglia cell line by inactivating the NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway. *J Cell Biochem*. 2018;119(8):7053–62.
93. Messina F, Guglielmini G, Curini M, Orsini S, Gresele P, Marcotullio MC. Effect of substituted stilbenes on platelet function. *Fitoterapia*. 2015;105:228–33.
94. Park J, Chen Y, Zheng M, Ryu J, Cho GJ, Surh YJ, et al. Pterostilbene 4'- $\beta$ -glucoside attenuates LPS-induced acute lung injury via induction of heme oxygenase-1. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
95. Huang WC, Chan ML, Chen MJ, Tsai TH, Chen YJ. Modulation of macrophage polarization and lung cancer cell stemness by MUC1 and development of a related small-molecule inhibitor pterostilbene. *Oncotarget*. 2016;7(26):39363–75.
96. Ma Z, Yang Y, Di S, Feng X, Liu D, Jiang S, et al. Pterostilbene exerts anticancer activity on non-small-cell lung cancer via activating endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.

97. El-Sayed M, El-Sayed\*, Adel R, Abdallah, AhmedM.Mansour and AAE-A. Thymol and Carvacrol Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2015;29(1):35–42.
98. Bhakkiyalakshmi E, Sireesh D, Sakthivadivel M, Sivasubramanian S, Gunasekaran P, Ramkumar KM. Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. *Eur J Pharmacol*. 2016;777:9–16.
99. Principe DR, Diaz AM, Torres C, Mangan RJ, DeCant B, McKinney R, et al. TGF $\beta$  engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function. *Oncogene*. 2017;36(30):4336–48.
100. Pan MH, Chiou YS, Chen WJ, Wang JM, Badmaev V, Ho CT. Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1234–42.
101. Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, Dong P, Decker EA, McClements DJ, et al. Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: A side-by-side comparison. *J Agric Food Chem*. 2011;59(20):10964–70.
102. Paul S, de Castro AJ, Lee HJ, Smolarek AK, So JY, Simi B, et al. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the  $\beta$ -catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 2010;31(7):1272–8.
103. Pan J, Shi M, Li L, Liu J, Guo F, Feng Y, et al. Pterostilbene, a bioactive component of blueberries, alleviates renal fibrosis in a severe mouse model of hyperuricemic nephropathy. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1802–8.
104. Shi YW, Wang CP, Liu L, Liu YL, Wang X, Hong Y, et al. Antihyperuricemic and nephroprotective effects of resveratrol and its analogues in hyperuricemic mice. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(9):1433–44.
105. Chen RJ, Ho CT, Wang YJ. Pterostilbene induces autophagy and apoptosis in sensitive and chemoresistant human bladder cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(12):1819–32.
106. Kim HJ, Lee JW, Hwang BR, Lee YA, Kim JI, Cho YJ, et al. Protective effect of pterostilbene on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 2016;51(7):1192–6.
107. Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Lasa A, Aguirre L, Rimando AM, Portillo MP. Pterostilbene, a dimethyl ether derivative of resveratrol, reduces fat accumulation in rats fed an obesogenic diet. *J Agric Food Chem*. 2014;62(33):8371–8.

108. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological Actions of Androgens. *Endocr Rev* [Internet]. 1987 Feb 1 [cited 2020 Mar 1];8(1):1–28. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-8-1-1>
109. Hall JE. Reproductive and Hormonal Functions of the Male (and Function of the Pineal Gland). In: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology [Internet]. 13th ed. Elsevier, Inc.; 2016 [cited 2020 Feb 29]. p. 1021–35. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9781455770052000810?indexOverride=GLOBAL>
110. Zarrouf FA, Artz S, Griffith J, Sirbu C, Kommor M. Testosterone and depression: Systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 15, *Journal of Psychiatric Practice*. 2009 [cited 2020 Mar 1]. p. 289–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625884>
111. Creasy DM, Chapin RE. Male Reproductive System. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* [Internet]. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2013 [cited 2020 Mar 1]. p. 2493–598. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780124157590000595?scrollTo=%23hl0002079>
112. Schlatt S, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E. Appearance of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Peritubular Cells of Monkey Testes Is Induced by Androgens, Modulated by Follicle-Stimulating Hormone, and Maintained after Hormonal Withdrawal. *J Androl*. 1993;14(5):340–50.
113. Teerds KJ, De Rooij DG, Rommerts FFG, Van den Hurk R, Wensing CJG. Proliferation and differentiation of possible Leydig cell precursors after destruction of the existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphate: the role of LH/human chorionic gonadotrophin. *J Endocrinol*. 1989 Sep 1;122(3):689–96.
114. McLachlan RI, O'donnell L, Stanton PG, Balourdos G, Frydenberg M, De Kretser DM, et al. Effects of Testosterone Plus Medroxyprogesterone Acetate on Semen Quality, Reproductive Hormones, and Germ Cell Populations in Normal Young Men. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2002 [cited 2020 Mar 1];87(2):546–56. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/87/2/556/2846719>
115. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019;43(6):582–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>
116. Rao NM. Biochemistry of Apoptosis. In: *Medical Biochemistry* [Internet]. 2nd ed. New Age International Ltd; 2006 [cited 2020 Mar 1]. p. 695–701. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/ktulibrary-ebooks/detail.action?docID=346113>

117. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
118. Lehman-Mckeeman LD. Biochemical and Molecular Basis of Toxicity. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* [Internet]. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2013 [cited 2020 Mar 1]. p. 15–38. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780124157590000017?scrollTo=%23hl0000764>
119. Wallig MA, Janovitz EB. Morphologic Manifestations of Toxic Cell Injury. In: Haschek W, Rousseaux C, Wallig M, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 [cited 2020 Mar 1]. p. 77–105. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/3-s2.0-B9780124157590000042?scrollTo=%23hl0000633>
120. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Investig.* 2015;6(3):331–6.
121. Toro J, Rodrigo R. Oxidative Stress: Basic Overview. In: Rodrigo R, editor. *Oxidative stress and antioxidants : their role in human disease.* Nova Science Publishers, Inc.; 2009. p. 1–24.
122. Yıldırım T. İnfeksiyon Hastalıklarında Oksidatif Stres ve Antioksidan Tedavi. *Flora.* 1998;3(4):224–34.
123. Valacchi G, Virgili F, Cervellati C, Pecorelli A. OxInflammation: From subclinical condition to pathological biomarker. *Front Physiol.* 2018;9:858.
124. Dormandy TL. An approach to free radicals. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1983 Oct 29 [cited 2020 Mar 1];2(8357):1010–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6138550>
125. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance | *The American Journal of Clinical Nutrition* | Oxford Academic. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5):715–25.
126. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *MAE Veterinerlik Fakültesi Derg.* 2016;1(1):65–76.
127. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* 2000;50(4–5):279–89.
128. Perecko T, Drabikova K, Lojek A, Ciz M, Ponist S, Bauerova K, et al. The Effects of Pterostilbene on Neutrophil Activity in Experimental Model of Arthritis. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013 [cited 2020 Feb 28];2013. Available from: <http://dx>.



129. Torabi F, Shafaroudi MM, Rezaei N. Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. *Int J Reprod Biomed.* 2017;15(7):403–12.
130. Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Ardekani FM, Mirkhani H, Baker G. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. *Asian J Androl.* 2007;9(2):235–9.
131. Mohamed DA, Abdelrahman SA. The possible protective role of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) on testicular and epididymal structure and sperm parameters in nicotine-treated adult rats (a histological and biochemical study). *Cell Tissue Res.* 2019;375(2):543–58.
132. Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA, Said TM, Mustafa MG, Nada E, et al. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1447–53.
133. Elo T, Sipilä P, Valve E, Kujala P, Toppari J, Poutanen M, et al. Fibroblast Growth Factor 8b Causes Progressive Stromal and Epithelial Changes in the Epididymis and Degeneration of the Seminiferous Epithelium in the Testis of Transgenic Mice. *Biol Reprod.* 2012;86(5):1–12.
134. Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. *Peptides.* 2015;63:47–54.
135. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* [Internet]. 1978 May [cited 2020 Feb 28];86(1):271–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/655387>
136. Yuluğ E, Türedi S, Karagüzel E, ... ÖK-J of pediatric, 2014 U. The short term effects of resveratrol on ischemia–reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2014 [cited 2020 Feb 28];49(3):484–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022346813006957>
137. Vassilakopoulou M, Boostandoost E, Papaxoinis G, de La Motte Rouge T, Khayat D, Psyrris A. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:328–34.
138. Mersereau J, Dooley MA. Gonadal Failure with Cyclophosphamide Therapy for Lupus Nephritis: Advances in Fertility Preservation. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010;36(1):99–108.

139. Kanno TYN, Sensiate LA, De Paula NA, Salles MJS. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian J Pharm Sci.* 2009;45(2):313–9.
140. Çeribaşı AO, Türk G, Sönmez M, Sakin F, Ateahin A. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107(3):730–6.
141. Hamzeh M, Hosseinimehr SJ, Karimpour A, Mohammadi HR, Khalatbary AR, Amiri FT. Cerium oxide nanoparticles protect cyclophosphamide-induced testicular toxicity in mice. *Int J Prev Med.* 2019;10(1):5–14.
142. Kaya C, Baseskioglu AB, Yigitaslan S, Ozatik FY, Ozatik O, Uslu S. The therapeutic potential of amifostine on cyclophosphamide-induced testicular dysfunction in rats: An experimental study. *Int J Reprod Biomed.* 2019;17(4):245–52.
143. Kim S-H, Lee I-C, Baek H-S, Moon C, Kim S-H, Kim J-C. Protective effect of diallyl disulfide on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats. *Lab Anim Res.* 2013;29(4):204–11.
144. Iqbal A, Syed MA, Najmi AK, Ali J, Haque SE. Ameliorative effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced gonadal toxicity in Swiss Albino mice: Biochemical-, histological- and immunohistochemical-based evidences. *Andrologia.* 2020;e13535.
145. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Saba AB, Adedara IA, Olowu ER, Akinrinde AS, et al. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *Andrologia.* 2016;48(4):393–401.
146. Basak A, Banu L, Ahmad N, Rafiq K. Effect of sunflower oil supplementation in feed on body weight and hematobiochemical parameters in mice. *Progress Agric.* 2017;28(1):36–41.
147. Kosuru R, Singh S. Pterostilbene ameliorates insulin sensitivity, glycemic control and oxidative stress in fructose-fed diabetic rats. *Life Sci.* 2017;182:112–21.
148. Ventimiglia E, Capogrosso P, Boeri L, Ippolito S, Scano R, Moschini M, et al. Validation of the American Society for Reproductive Medicine guidelines/recommendations in white European men presenting for couple's infertility. *Fertil Steril.* 2016;106(5):1076–83.
149. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. Vol. Edition, V, World Health. 2010 [cited 2020 Mar 16]. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf)

150. Matthews ML. Evaluation of the Infertile Couple. In: Seli E, editor. Infertility [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2011 [cited 2020 Mar 16]. p. 8–17. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/ktulibrary-ebooks/reader.action?docID=661742>
151. Davies M, Webber L, Overton C. Male fertility. In: Infertility [Internet]. Oxford University Press; 2009 [cited 2020 Mar 16]. p. 55–64. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/ktulibrary-ebooks/reader.action?docID=1100043>
152. Qiu C, Cheng Y. Effect of Astragalus membranaceus polysaccharide on the serum cytokine levels and spermatogenesis of mice. *Int J Biol Macromol*. 2019;140:771–4.
153. Chatterjee K, AlSharif D, Mazza C, Syar P, Sharif M Al, Fata JE. Resveratrol and pterostilbene exhibit anticancer properties involving the downregulation of HPV oncoprotein E6 in cervical cancer cells. *Nutrients*. 2018;10(2):243–58.
154. Pan C, Hu Y, Li J, Wang Z, Huang J, Zhang S, et al. Estrogen receptor- $\alpha$ 36 is involved in pterostilbene-induced apoptosis and anti-proliferation in in vitro and in vivo breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(8):e104459.
155. Bakhtary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanlinejad F. Ethyl Pyruvate Ameliorates The Damage Induced by Cyclophosphamide on Adult Mice Testes. *Royan Inst Int J Fertil Steril*. 2016;10(1):79–86.
156. Zhang Y, Ren S, Ji Y, Liang Y. Pterostilbene Ameliorates Nephropathy Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharmacology*. 2019;104(1–2):71–80.
157. Akomolafe SF, Aluko BT. Protective effect of curcumin on fertility in cyclophosphamide exposed rats: Involvement of multiple pathways. *J Food Biochem*. 2020;44(1):1–15.
158. Trasler JM, Hermo L, Robaire B. Morphological Changes in the Testis and Epididymis of Rats Treated with Cyclophosphamide: A Quantitative Approach1. *Biol Reprod* [Internet]. 1988 Mar 1 [cited 2020 Mar 16];38(2):463–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358980>
159. Hosseini A, Zare S, Borzouei Z, Pakdel FG. Cyclophosphamide-induced testicular toxicity ameliorate by American ginseng treatment: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 2018;16(11):711–8.
160. Yılmaz S, Kaya E. Ratlarda Siklofosamid ile Oluşturulmuş Hemorajik Sistitte Propolis ve Enginarın Koruyucu Etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilim Derg* [Internet]. 2018 [cited 2020 Mar 16];32(2):93–8. Available from: <http://www.fusabil.org>

161. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. *J Androl.* 2008;29(5):488–98.
162. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Reproduction.* 1987;81(2):459–69.
163. Fan X, Wang L, Huang J, Lv H, Deng X, Ci X. Pterostilbene Reduces Acetaminophen-Induced Liver Injury by Activating the Nrf2 Antioxidative Defense System via the AMPK/Akt/GSK3 $\beta$  Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(5):1943–58.
164. Schulze-Osthoff K, Peter ME. THE DEATH RECEPTORS. In: Watters D, Lavin M, editors. *Signalling Pathways in Apoptosis* [Internet]. CRC Press LLC; 1999 [cited 2020 Mar 16]. p. 31–123. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/ktulibrary-ebooks/reader.action?docID=181540#>
165. Yigitaslan S, Ozatik O, Ozatik FY, Erol K, Sirmagul B, Baseskioglu AB. Effects of tadalafil on hemorrhagic cystitis and testicular dysfunction induced by cyclophosphamide in rats. *Urol Int.* 2014;93(1):55–62.
166. Gelen V, Sengül E, Yildirim S, Celebi F, Cinar A. Effects of rutin on bladder contractility and histopathology in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Ataturk Univ Vet Bilim Derg.* 2018;13(3):337–46.
167. Zhao J, Song Q, Wang L, Dong X, Yang X, Bai X, et al. Detrusor myocyte autophagy protects the bladder function via inhibiting the inflammation in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122597.
168. McCormack D, McFadden D. A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013.
169. Riche DM, McEwen CL, Riche KD, Sherman JJ, Wofford MR, Deschamp D, et al. Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. *J Toxicol.* 2013;2013.
170. Gu YP, Yang XM, Duan ZH, Shang JH, Luo P, Xiao W, et al. Squid ink polysaccharide prevents autophagy and oxidative stress affected by cyclophosphamide in Leydig cells of mice: A pilot study. *Iran J Basic Med Sci.* 2017;20(11):1194–9.
171. Gu YP, Yang XM, Luo P, Li YQ, Tao YX, Duan ZH, et al. Inhibition of acrolein-induced autophagy and apoptosis by a glycosaminoglycan from *Sepia esculenta* ink in mouse Leydig cells. *Carbohydr Polym.* 2017;163:270–9.
172. Jalili C, Roshankhah S, Salahshoor MR, Mohammadi MM. Resveratrol Attenuates Malathion Induced Damage in Some Reproductive Parameters by Decreasing Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Male Rats. *J Fam Reprod Heal.* 2019;13(2):70–80.

173. Archana D, Supriya C, Girish BP, Kishori B, Reddy PS. Alleviative effect of resveratrol on polyvinyl chloride-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2018;116(Pt B):173–81.

