



TC

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA, KAFEİK
ASİT FENETİL ESTER'İN (KAFFE) ANTİOKSİDAN VE ANTİAPOPTOTİK
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

HANDE CARVER

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ TÜLİN FIRAT

Ağustos 2019

BOLU



TC

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA, KAFEİK
ASİT FENETİL ESTER'İN (KAFFE) ANTIOKSİDAN VE ANTIAPOPTOTİK
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

HANDE CARVER

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ TÜLİN FIRAT

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje no:2018.08.03.1362)

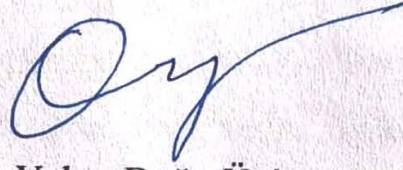
Ağustos BOLU

2019

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

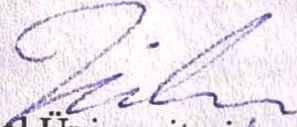
Prof. Dr. Aysel KÜKNER*



(imza)

Histoloji ve Embriyoloji ABD, Yakın Doğu Üniversitesi

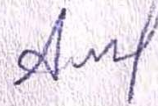
Dr. Öğr. Üyesi Tülin FIRAT**



(imza)

Histoloji ve Embriyoloji ABD, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan ŞAYLAN



(imza)

Histoloji ve Embriyoloji ABD, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Tarih: 19/08/2019

Bu tez ile Bolu AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Hande CARVER'in Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYZAZ

(imza)

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Jüri Başkanının

** Tez danışmanının

ÖZET

RATLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA, KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN (KAFFE) ANTİOKSİDAN VE ANTİAPOPTOTİK ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Sisplatin kemoterapide yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Sisplatin replikasyon ve transkripsiyon gibi hayati süreçleri durdurur ve sonuçta apoptozise yol açar. Sisplatinle oluşan toksisitenin arkasındaki neden Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretimidir. ROS üretimi testis hücrelerine, özellikle de spermatozoaya zarar verir. Spermatozoanın çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşan plazma membranının ana bileşenleri ROS'a karşı aşırı duyarlılık gösterir. Bu nedenle ROS üretimi erkek infertilitesinin önde gelen nedenidir. Son zamanlarda erkeğe bağlı infertilitede alternatif tedaviler yaygın bir araştırma alanıdır. Geçmişte yapılan araştırmalar, antioksidanların spermatozoayı ROS'dan koruduğunu, anormal spermatozoa üretimini önlediğini ve sperm kalitesini iyileştirdiğini göstermiştir. Bu çalışmada, antioksidan özelliği olan Kafeik asit fenetil ester (KAFFE) 'in Sisplatin ile indüklenen testis hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini, sperm kromatin bütünlüğünü, DNA hasarı tespiti, Kaspaz bağımlı apoptoz arasındaki ilişkileri araştırılmıştır.

Çalışma 2-3 aylık Wistar albino cinsi erkek ratlarda yapıldı. Deney grupları; Kontrol, KAFFE, Sisplatin, Sisplatin+KAFFE grubu olmak üzere 4 grup olarak belirlendi. Deneysel toksisite oluşturmak için Sisplatin, 0.9% izotonik salin solüsyonunda çözülerek günde 1 defa, 1., 3. ve 5. günlerde 3 mg/kg i.p. olarak verildi. Tedavi grubunda KAFFE, 2 ml'lik izotonik salinde çözülerek 45 gün boyunca 10 µmol/kg i.p. olarak verildi. Ratlar 45. günde sakrifiye edildi.

Histolojik olarak, Sisplatin grubuna ait testis dokularında intertübüler alanlarda konjesyon, kalınlaşma, ödem, seminifer tübül yapılarında bozukluk, vakuolizasyon, bağ dokuda ve interstisyel alanda hiyalinizasyon, germinal epitellerde düzensizlik ve lümenlerinde hücre döküntüleri mevcut iken Sisplatin + KAFFE grubundaki yapısal bozukluklar ve konjesyon, Sisplatin grubuna göre minimal seviyelerde gözlemlendi. Apoptotik hücre sayılarında, Sisplatin+KAFFE grubunda Sisplatin grubuna göre anlamlı bir azalma ($p \leq 0.05$), apoptotik sperm yüzdeleri baz alınarak

karşılaştırıldığında, yine Sisplatin+KAFE grubunda Sisplatin grubuna göre anlamlı bir azalma ($p \leq 0.05$) olduğu görüldü.

Çalışmanın sonucunda, KAFE'in Sisplatin ile oluşturulan testis toksisite hasarında koruyucu etkisi olduğu, apoptozu engellediği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, Kafeik asit fenetil ester (KAFE), Testis toksisitesi, Kaspaz-3



ABSTRACT

HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF ANTIOXIDAN AND ANTIAPOPTOTIC EFFECTS OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON CISPLATIN-INDUCED TESTICULAR TOXICITY IN RATS

Cisplatin is a commonly used chemotherapy agent. Cisplatin terminates vital processes such as replication and transcription, and ultimately leads to apoptosis. The cause behind Cisplatin-induced toxicity is the production of reactive oxygen species (ROS) that damage testicular cells, particularly spermatozoa. Polyunsaturated fatty acids, which are susceptible to damage caused by ROS, are the main components of the plasma membrane of the spermatozoan. For this reason, ROS production is a leading cause of male infertility. Recently, alternative therapies in male infertility are a common area of research. Past researches have shown that antioxidants protect spermatozoa from ROS, prevent abnormal spermatozoa production, cleanse the produced ROS, prevent DNA fragmentation, improve sperm quality and prevent premature sperm maturation. In this study, we performed biochemical and histological analyses of the protective and healing effects of Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on Cisplatin-induced testis injury in rats.

The study was performed in Wistar albino male rats, 2-3 months old. The experimental groups were divided into four: Kontrol, CAPE, Cisplatin, and Cisplatin+CAPE. For the experimental toxicity model, Cisplatin was dissolved in 0.9% isotonic saline solution, and it was given once a day on days 1, 3, and 5, up to 3 mg / kg intraperitoneally. CAPE was dissolved in 2 ml of isotonic saline, and it was given 10 μ mol / kg intraperitoneally for 45 days. The rats were sacrificed on the 45th day.

Histologically, we observed congestion, thickening, edema, seminiferous tubule structures, vacuolization, hyalinization of connective tissue and interstitial space, irregularities in germinal epithelium, and cell rashes in the interstitial areas of testis tissues belonging to the Cisplatin group. On the other hand, structural disorders and congestion in the Cisplatin + CAPE group were minimal compared to the Cisplatin

group. We noted a significant decrease in apoptotic cell count in the Cisplatin + CAPE group compared to the Cisplatin group ($p \leq 0.05$). When apoptotic sperm percentages were compared, a significant decrease ($p \leq 0.05$) was observed in the Cisplatin + CAPE group compared to the Cisplatin group.

As a result of this study, we found that CAPE had a protective effect on Cisplatin-induced testicular toxicity damage and it prevented apoptosis.

Key words: Cisplatin, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), Testicular toxicity, Caspase-3



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan ve insanlığıyla bana örnek olana değerli hocameski Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e ve tez sürecimde danışmanlığımı yapan, bilgisiyle bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tülin FIRAT'a, ve tez aşamasındaki yardımlarından dolayı değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan ŞAYLAN'a çok teşekkür ederim.

Projemde emeği geçen, destek ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Özgür YİS'e teşekkür ederim.

Deney aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Enes EĞİLMEZ'e, arkadaşım Serhat GÖKDAŞ'a, Esra FİDAN'ave tüm AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Bu projeyi finansal olarak destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez sürecimde, istatistiksel değerlendirmeler sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Bölümü Üyesi Sayın Ar. Gör. Merve BAŞOL'a teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm arkadaşlarım Melek USTA ve Gizem DEDE'ye yardımları ve yüksek lisans eğitim sürecimi daha anlamlı, daha eğlenceli hale getirdiği için, uzakta da olsak yanımda olduğunu hissettiren, kimi zaman arayarak, kimi zamanda mesajlarıyla beni rahatlatan sevgili arkadaşım Cemre Nur BALCI'ya ve zorlandığım anlarda yardımına koşan, elinden geleni yapan ve işlerimi yoluna koymama yardım eden sevgili arkadaşım Gizem İLTER AKTAŞ'a ve güler yüzüyle içimi rahatlatan, bana yol gösteren, her koşulda destek olan biricik dostum Didem AYHAN'a, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat DIRAMALI'ya ve değerli ablam Sevilay ERİMŞAH'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, yaptığım seçimlerde her zaman arkamda duran, güçlü duruşlarını örnek aldığım, bana etrafımdaki güzellikleri

görmeyi öğreten canımdan çok sevdiğim sevgili dedemAbdulkadir YILMAZ ve sevgili anneannem Süreyya YILMAZ'a, canım annem Nurhayat BÜYÜKSOY ve babam Recep BÜYÜKSOY'a ve zor zamanlarımda beni dinleyip telkin eden biricik kardeşim Mustafa Çağlar BÜYÜKSOY'a,yüksek lisans eğitim süresinde hayatımı birleştirdiğim,üzüntüme ve sevincime ortak olan, beni cesaretlendiren ve başarabileceğim şeylerin farkına varmamı sağlayan güzel insan, biricik eşim Keith Richard CARVER'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
GRAFİKLER	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1.GİRİŞ	17
2. GENEL BİLGİLER.....	20
2.1 Testis Anatomisi:	20
2.2. Testis Embriyolojisi:.....	22
2.3. Testis Histolojisi:.....	24
2.3.1 Sertoli Hücreleri:	25
2.3.2 Leydig Hücreleri:	27
2.3.3 Spermatogenez:	27
2.3.4 Spermiyogenez:.....	29
2.3.5 Spermin Yapısı:.....	31
2.3.6 Epididimis Histolojisi:.....	33
2.4 Sisplatin:	34
2.5 Oksidatif Stres ve Radikaller:	38
2.6 Antioksidanlar:	41
2.6.1 Kafeik Asit Fenetil Ester (KAPE):	42
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	43
3.1. Deney Hayvanları	43
3.2. Deney Grupları	43
3.3. Işık Mikroskopik İncelemeler.....	44
3.3.1. Hematoksilen-eozin boyaması	44
3.3.2. Periodik Asit-Schiff boyaması	45
3.3.3.Asidik Anilin mavisi boyaması	45
3.3.4. Johnsen skorlaması.....	46
3.3.5. Kaspaze-3 immün işaretleme	47
3.4. Floresan Mikroskopik İncelemeler	48
3.4.1. Floresan TUNEL boyama	48
3.4.2. %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu hazırlanması (100 ml).....	48
3.4.3. %0,1 Triton X-100 ile permeabilizasyon solüsyonu hazırlanması.....	49
3.4.4. TUNEL karışım solüsyonu.....	49
3.4.5. Floresan boyama basamakları	49
3.4.6. TUNEL Floresan boyama yöntemi ile DNA fragmantasyonunun incelenmesi ..	49
3.5. Sperm analizi (Spermiyogram)	50
3.6. Biyokimyasal İncelemeler	50
3.7. İstatistiksel Analiz.....	50

4. BULGULAR	51
4.1. Biyokimyasal Bulgular:	51
4.2. Spermiyogram bulguları:	52
4.3. Histolojik Bulgular	54
4.3.1. Hemotoksilen ve Eozin boyası:	54
4.3.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyası:.....	60
4.3.3. Asidik Anilin Mavisi Boyası:.....	60
4.4. Seminifer Tübül Çapı ve Johnsen Skoru Bulguları:	60
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	62
4.5.1. Kaspaz 3 immün işaretleme:.....	62
4.6. Floresan Mikroskopik Bulgular	66
4.6.1. Floresan TUNEL boyaması ile sperm DNA fragmentasyonu	66
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7.KAYNAKLAR	75
8.EKLER	82
Ek 1: Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu Onayı	82
Ek 2: Yüksek Lisans Tez Çalışması Orjinallik Raporu	83
9.ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Testisin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi.
- Şekil 2.2.** Testisin sagittal kesitinin şematik gösterimi.
- Şekil 2.3.** Testis ve over gelişiminin şematik gösterimi.
- Şekil 2.4.** Seminifer epitelin şematik gösterimi.
- Şekil 2.5.** Spermatogenezin hormonal kontrolünün şematik gösterimi.
- Şekil 2.6.** Spermatogenez.
- Şeki 2.7.** Spermin yapısı.
- Şekil 2.8.** Testis ve epididimis.
- Şekil 2.9.** Epididimisin bölümleri.
- Şekil 2.10.** MAPK ve protein kinaz B yolaklarının apoptozis mekanizmalarına etkileri.
- Şekil 2.11.** MAPK yolağının şematik gösterimi ve Sisplatin'in apoptoz veya hücre sağkalımını desteklemedeki rolü.
- Şekil 2.12.** Apoptozisin düzenlenmesi.
- Şekil 2.13.** Serbest radikal üretiminin şematik gösterimi.
- Şekil 2.14.** Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları.
- Şekil 2.15.** Lipid peroksidasyon son ürünü olan Malondialdehit (MDA) oluşumu.
- Şekil 4.1.** Kontrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x20
- Şekil 4.2.** Sisplatin grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x10
- Şekil 4.3.** Sisplatin grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x20
- Şekil 4.4.** KAFE grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x20
- Şekil 4.5.** Tedavi grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x10
- Şekil 4.6.** Tedavi grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x20
- Şekil 4.7.** Kontrol grubuna ait Kaspaz-3 boyaması, x20
- Şekil 4.8.** Sisplatin grubuna ait Kaspaz-3 boyaması, x20
- Şekil 4.9.** KAFE grubuna ait Kaspaz-3 boyaması, x20
- Şekil 4.10.** Tedavi grubuna ait Kaspaz-3 boyaması, x20

Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait floresan TUNEL boyaması, x60

Şekil 4.12. Sisplatin grubuna ait Floresan TUNEL boyaması, x60

Şekil 4.13. KAFE grubuna ait floresan TUNEL boyaması, x60

Şekil 4.14. Tedavi grubuna ait floresan TUNEL boyaması x60



TABLULAR

Tablo 4.1. Serum MDA değerleri

Tablo 4.2. Serum Testosteron değerleri

Tablo 4.3. Sperm konsantrasyon değerleri

Tablo 4.4. Total motil sperm yzdeleri

Tablo 4.5. Tübül apı değerleri

Tablo 4.6. Johnsen skorlaması değerleri

Tablo 4.7. Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Tablo 4.8. FloresanTUNEL ile pozitif boyanan hücre sayıları

GRAFİKLER

- Grafik 4.1.** Tüm grupların serum MDA değerleri
- Grafik 4.2.** Tüm grupların serum Testosteron değerleri
- Grafik 4.3.** Tüm grupların sperm konsantrasyon değerleri
- Grafik 4.4.** Tüm grupların total motil sperm yüzdeleri
- Grafik 4.5.** Tüm grupların tübül çapı değerleri
- Grafik 4.6.** Tüm grupların Johnsen skorlama değerleri
- Grafik 4.7.** Tüm grupların Kaspaz-3 pozitif hücre sayısı
- Grafik 4.8.** Tüm grupların floresan TUNEL pozitif hücre sayımı değerleri

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP:	Androjen Bağlayıcı Protein
CARD:	Kaspaz Aktive edici Domain
DMSO:	Dimetilsülfoksit
ELISA:	Enzim bağımlı Immunosorbent Analizi
FSH:	Folikül Uyarıcı Hormon
KATP:	ATP Bağımlı Potasyum Kanalları
LH:	Luteinize Hormon
MDA:	Malondihaldehit
KAFE:	Kafeik Asit Fenetil Ester
CP:	Sisplatin
CDPP:	Cis-diamminedichlorideplatinum
GSH:	Glutasyon
RSH:	Sülfür merkezli radikaller
SS:	Disülfid
O₂:	Süperoksit Anyonu
OH:	Hidroksil Radikali
PBS:	Fosfat Tamponlu Çözelti
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
SOD:	Süperoksit Dismutaz
MAPK:	Mitojen aktive protein kinaz
TDF:	Testis Belirleyici Faktör
SRY:	Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor-Alpha
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
JTBS:	Johnsen testiküler biyopsi skoru

1.GİRİŞ

Sisplatin (cis-diamminedichlorideplatinum (II), CDPP) ağır bir metal olan Platin (Pt) içeren güçlü bir antineoplastik ajandır (1-5). Sisplatin (CP) kemoterapide yaygın olarak kullanılır ve önemli ilaçların içinde bulunduğu Dünya Sağlık Örgütü model listesine eklenmiştir (6). Platinin de içinde bulunduğu VIII. grup metallerin nötral kompleksleri antitümör ve karsinojenik etki gücüne sahiptir. Aralarında en etkin olan Pt kompleksleridir ve Sisplatin de bunlardan biridir. Bu bileşikler selektif ve spesifik olarak hücre çoğalmasını inhibe ederler, ayrıca antibakteriyel özellikleri de mevcuttur (7). Bileşiğin cis konfigürasyonu antitümör aktiviteye sahiptir (8) ve baş, boyun, akciğer, idrar kesesi, testis, ovaryum, endometriyum ve serviks dahil olmak üzere çeşitli neoplazmalara karşı kullanılmaktadır (9,10). Sisplatin toksisitesinden sorumlu birden fazla mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Sisplatin hücre içerisine difüzyon yoluyla girdikten sonra, antitümöral ve hatta nefrotoksik etkisini, hücre içinde reaktif platin türlerine hidrolize olarak gösterir (11). Sisplatin DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu bağların ortaya çıkışı ise DNA transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eder. Sisplatinin modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutta ise, hücre tarafından tolere edilemez ve hücre ölümüne neden olur (12). Sisplatinin neden olduğu oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri de mitokondriyal hasar ve Kaspaz 9 üzerinden apoptozisi tetiklemektedir (13). Sisplatin gerek süperoksit iyonları gerekse hidroksil radikalleri gibi aktif oksijen türlerini üretebilir, normal dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir (14). Bu nedenle, normal dokulara zarar vermemek koşuluyla, antitümöral etkinliği olmaksızın, ilaçların meydana getirdiği hasarı azaltmak amacıyla çok sayıda koruyucu ajan antitümöral ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır (15). Germ hücre apoptozisi, Leydig hücre disfonksiyonu ve testiküler steroidojenik bozukluk ile karakterize olan infertiliteye kadar testis hasarı ile sonuçlanır (16). Sisplatin, germ hücrelerinin nükleik asit sentezini de etkilerken, spermatogenezisin tüm süreci bozulmaktadır. Leydig hücreleri Sisplatin tedavisi ile hasar gördüğünden, testesteron üretimi de bozulmuştur (17). Sisplatin, kansere neden olan bileşiğin kovalent olarak DNA'ya bağlanmış halini oluşturur (DNA adduct) ve replikasyon ve transkripsiyon

gibi hayati süreçleri sona erdirir ve nihayetinde apoptozise yol açar. CP'den kaynaklanan testiküler toksisite gerçekten şiddetli ve geri döndürülemezdir (18,19). Sisplatin kaynaklı toksisitenin arkasındaki neden, testiküler hücelere, özellikle spermatozoaya zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimidir. Çoklu doymamış yağ asitleri, spermatozoanın plazma membranının ana bileşenleridir ve bu da ROS'un neden olduğu hasara karşı hassastır (20). Bu nedenle ROS üretimi, erkek infertilitesinin önde gelen sebebi olarak atfedilmiştir (21,22).

Erkek infertilitesinde alternatif tedavi yöntemleri günümüzde yaygın bir araştırma alanıdır. Yapılan çalışmalar; antioksidanların spermatozoayı ROS'dan koruyarak anormal spermatozoa üretimini engellediğini, üretilen ROS'u temizleyip DNA fragmantasyonunu önlediğini, sperm kalitesini iyileştirdiğini ve prematüre sperm olgunlaşmasını engellediğini göstermiştir (23). Doğal ürünlerin hastalıkların tedavisinde kullanımı için birçok araştırma yapılmaktadır. Polifenolikler doğal kökenli biyoaktif bileşiklerin önemli bir kategorisini oluşturmaktadır. Propolis, polifenolik bileşikler bakımından zengin, bal arısı (*Apis mellifera*L.) tarafından üretilen doğal bir maddedir (24). Propolisin etken maddelerinden bir tanesi Kafeik Asit Fenetil Ester'dir (KAFE). KAFE'in tam kimyasal adı: (E) -3- (3,4-dihidroksifenil) -2-propiyonik asit, 2-fenil 3- (3,4-dihidroksifenil) -2-propenoat'dır (25-28). KAFE, beyaz, ince kristal toz halindedir, suda çözünmez, ancak izotonik salin solüsyonu, etanol, metanol, aseton ve DMSO'da çözünür. KAFE'in bu çözücülerde çözünürlüğü yaklaşık 10 mg/ml'dir (27). Anti-inflamatuar (29), antioksidan (27) ve antikanser (30) aktivitelere sahiptir. KAFE ayrıca nöroprotektif, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif kapasitelere de sahiptir (31). Bu umut vaadeden bileşik, *in vitro* ve *in vivo* kanıtlandığı gibi güçlü antioksidan ve sitoprotektif etkilere sahiptir. Deneysel çalışmalara göre, KAFE'in çeşitli antibiyotikler ve kemoterapötik ajanlar da dahil olmak üzere ilaçların yan etkilerine karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (32).

Bu çalışmada ratlarda Sisplatin ile oluşturulan testis toksisite hasarı üzerinde Kafeik Asit Fenetil Ester maddesinin antioksidan ve antiapoptotik etkisi araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak apoptozisi değerlendirmek için Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması yapılmıştır. Ayrıca sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için Anilin mavisi ve DNA hasarı tespiti için TUNEL Floresan boyamaları yapılmıştır. Biyokimyasal olarak ise serum Malondialdehit (MDA) ve

plazma testesteron seviyeleri ölçülmüştür. Ayrıca ışık mikroskopik olarak testis dokuları incelenerek, seminifer tübül çapları ölçülmüştür. Spermatogenez değişikliklerini saptamak için Johnsen skorlaması ve epididimiden alınan sperm örneklerinde ışık mikroskopik olarak sayım yapılmıştır.



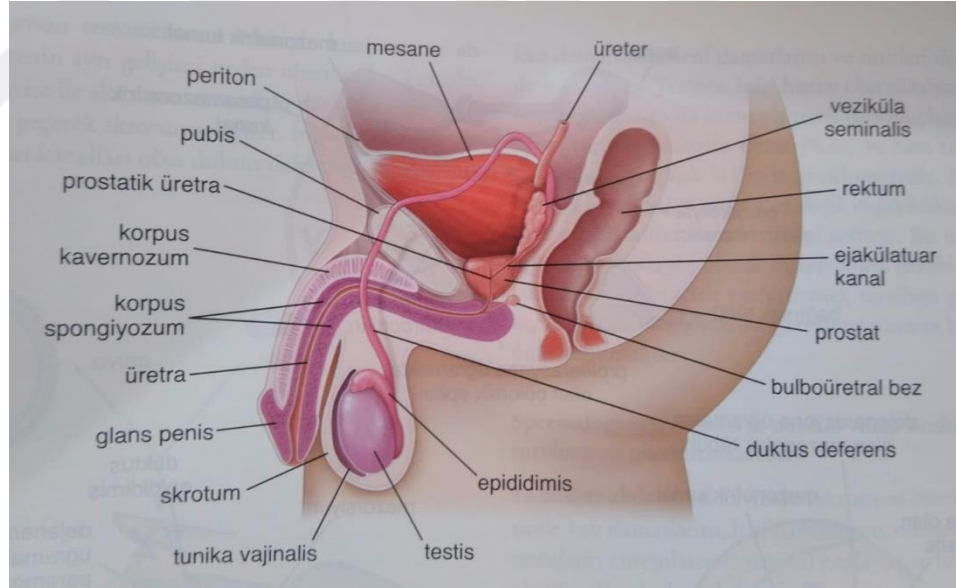
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Testis Anatomisi:

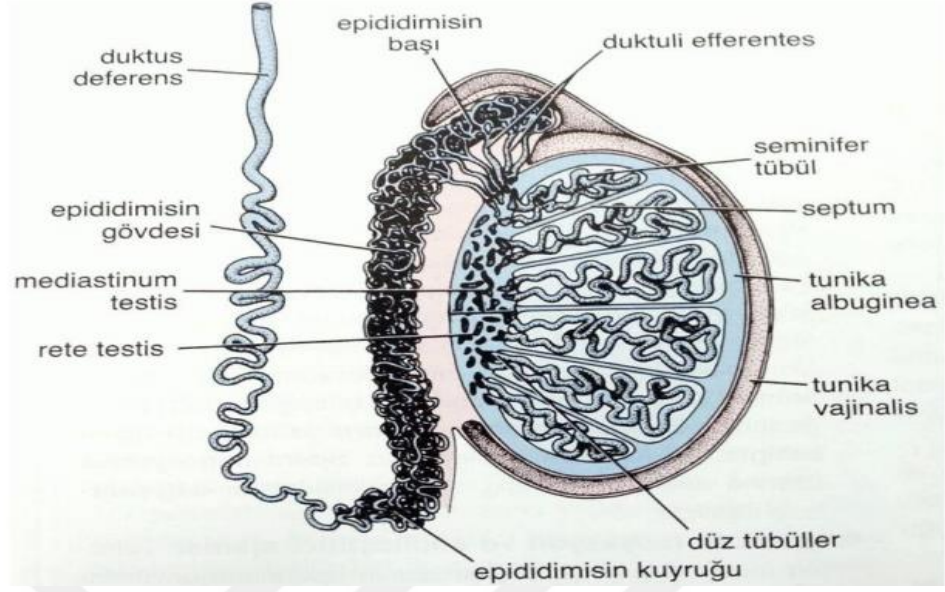
Erkek üreme sistemi; erkek üreme hücresi olan spermi ve erkek üreme sistemi hormonları olan androjenleri üreten **testis**lerden; spermin depolanması ve taşınmasından sorumlu olan kanallar sistemini oluşturan **duktus epididimis**, **vas deferens (duktus deferens)**, **ejakülatuar kanal** ve **üretranın bir kısmından**; salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozaya besinler sağlayan yardımcı bezlerden (**seminal vezikül**, **prostat bezi** ve **bulboüretral bez**) ve **penisten** oluşmaktadır.

Testisler, bir çift oval şekilli organ olarak karın boşluğunun dışında yerleşiktirler. Bunlar penisin hemen arkasında ve anüsün önünde bulunan skrotal kese içinde yer alırlar (Şekil 2.1.). Testis ve epididimis **spermatik kordon** ile skrotal kese içinde asılı olarak bulunurlar. Spermatik kordon; vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksuslarla karakterizedir. Testis, kalın bir bağ dokusu kapsülü olan **tunika albuginea** ile çevrelenmiştir (Şekil 2.2). Tunika albuginea'nın arka yüzünden testis içine doğru septum biçiminde yayılan bağ dokusu **mediastinum testis** uzanır. Her bir testis, kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki **septum** adı verilen lifli doku bölümleri ile 250 ila 300 lobçuğa bölünür. Her lob içinde sperm hücrelerini üreten **seminifer tübül** olarak adlandırılan bir ila dört sarmal tübül vardır. Her seminifer tübül yaklaşık olarak 50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır ve rete testise açılır. Seminifer tübülleri rete testise bağlayan yapıya **tubulus rektus** adı verilir. **Rete testis**, seminifer epitelyumun ürünlerini (sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır. Testisler, olgun spermatozoa'yı farklılaştıran germ hücrelerini, **Sertoli hücreleri** olarak adlandırılan hücreleri ve **Leydig (interstisyel) hücreleri** olarak adlandırılan testosteron üreten hücreleri içerir. Sertoli hücreleri, komşu spermatogentik hücreleri çevreleyip aralarındaki boşlukları doldururlar. Bu hücreler yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Leydig hücreleri poligonal şekillidirler. Sıklıkla lipid damlacıkları, pigment granülleri ve sitoplazmik kristaller olan **Reinke kristalleri** yapılarını içerirler.

Testisler abdomende oluşur ve androjenler tarafından uyarıldıklarında, gebeliğin yedinci ayında (26. haftasında) skrotuma inerler. Fetal testisler tarafından testosteron üretimi, plasenta tarafından salgılanan bir hormon olan insan koryonik gonadotropin tarafından uyarılır. Doğumdan sonraki birkaç hafta içinde testosteron sekresyonu durur ve testislerin içindeki hücreler erken çocukluk döneminde gelişmemiş kalır; ergenlik döneminde, hipofiz bezinden gonadotropik hormonlar, doku gelişimini uyarır ve testisler, sperm ve androjenleri üretme kapasitesine sahiptir. Testisler inerken, testis yapısıyla birlikte kan damarları, lenf damarları, otonomik sinirler ve **tunika vajinalis** adı verilen testis yüzeyini saran abdominal periton uzantısı da sürüklenir. Her bir testis, abdominal aortanın dalı olan **testiküler arter** aracılığıyla kanlanır. Testis yakınında kıvrımlı olan testiküler arterin çevresinde abdominal venlere testisten aldığı kanı taşıyan **pampiniform venöz pleksus** bulunur. Kan damarlarında karşılıklı ısı değişimine olanak sağlayan bu düzenleme testislerin vücut ısısından 2-3 C° düşük ısıda tutulmalarına sağlamaktadır (33,34).



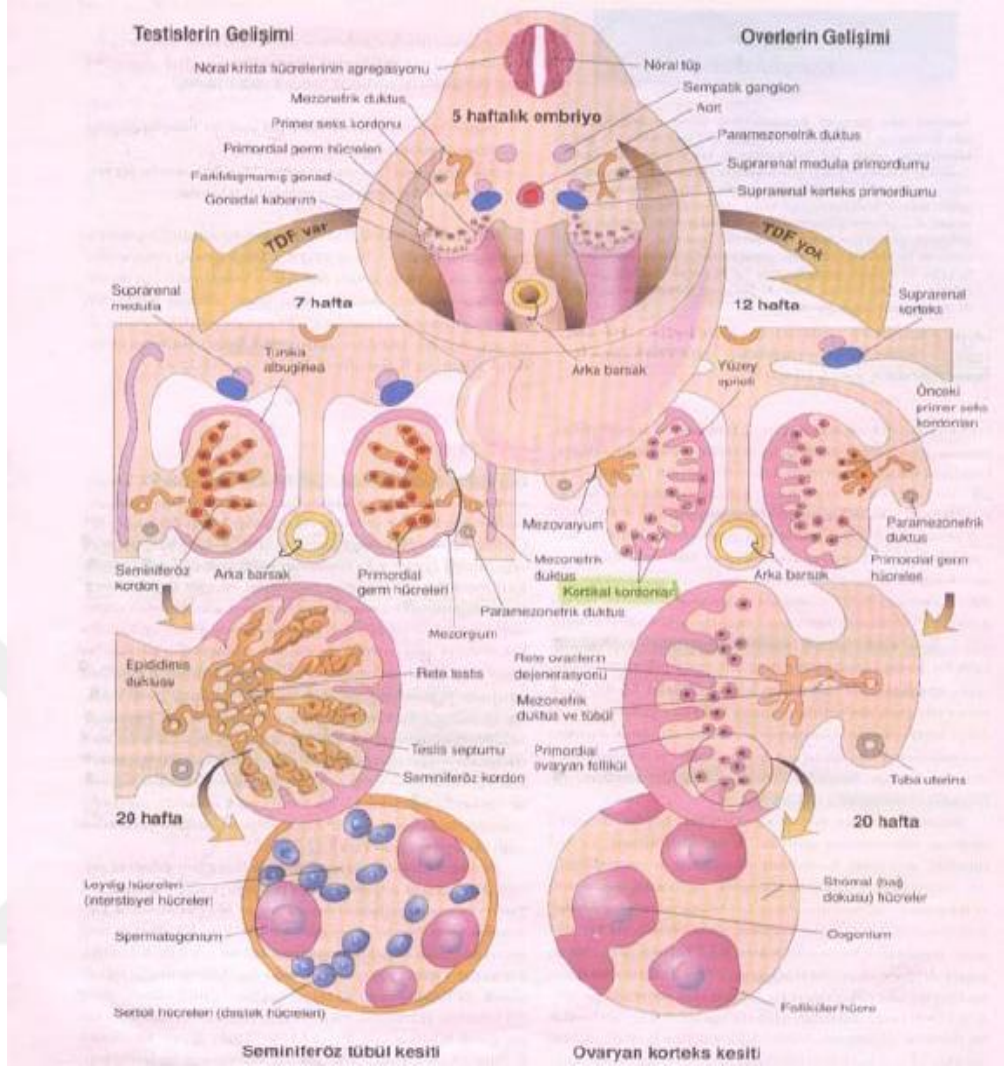
Şekil 2.1. Testisin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi (33).



Şekil 2.2. Testisin sagittal kesitinin şematik gösterimi (33).

2.2. Testis Embriyolojisi:

Gametlerin geliştiği hücre dizisine germline adı verilir. Gelişimin 4. Haftasında ortaya çıkan ve vitellus kesesinin arka duvarındaki endodermden köken alan bu hücreler **primordial germ hücresi** olarak adlandırılırlar. Dördüncü haftada yolk kesesinden, gelişmekte olan primitif gonadlara doğru yer değiştirmeye başlayan primitif germ hücreleri, göçlerini 5. haftada tamamlarlar (35). 6. haftada genital kabartılara göç ederler. Primordial germ hücreler buradaki mezodermal hücreleri ve çöломik mezotelium hücrelerini çoğaltarak, **primer sex kordonlarını** oluşturmak üzere uyarılırlar (33).



Şekil 2.3. Testis ve over gelişiminin şematik gösterimi (36).

Fetal gelişimin 7. haftasına kadar, gonadal gelişimin farklılaşmamış döneminde, her iki cinsiyet için yalnızca bir genel gonad tipi vardır. Bu yapı; dışta korteks, içte ise medulladan oluşmaktadır. Daha sonra dişide korteks ovaryuma farklılanır ve medulla gerilemeye başlar. Erkekte ise, korteks geriler ve medulla testisi oluşturmak üzere farklılanır. **Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi** (sex-determining region of Y chromosome, **SRY**) üzerindeki gen ile kodlanan ve **testis-belirleyici faktör** (testis-determining factor, **TDF**) olarak adlandırılan bir gen ürünü ile testis gelişimi kontrol edilir (34).

Testis belirleyici faktör, seminiferöz kordonlarını uyararak, kordonların farklılaşmamış gonadın medullasının iç kısımlarına doğru uzamasına ve anastomoz yaparak **rete testisi** oluşturmalarına olanak sağlar. Fibröz kapsül tunika albugenia'nın

gelişiminden sonra seminiferöz kordonların yüzey epiteli ile bağlantısını kaybeder. Seminiferöz tübüller, mezenkim ile ayrılırlar. 8. haftadan itibaren androjenik hormonlar olan testesteron ve androstenedionu salgılamaya başlayan Leydig hücreleri mezonefrik duktusların ve dış genitallerin maskülin olarak farklanmasını uyarır. Fetal Sertoli hücreleri, Müller (paramezonefrik) kanalların gelişmesini engelleyen Müllerian inhibe edici madde (Mullerian Inhibiting Substance, MIS) salgılayarak uterus ve tuba uterinalara farklanan paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar. MIS yokluğunda, paramezonefrik kanallar varlığını sürdürür ve dişi genital organları meydana gelir.

İnsan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu testesteron üretimini uyarır. Bu hormon 8. ve 12. haftalar arasındaki dönemde en yüksek değerine ulaşır. Erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli bir yer tutan **Wolff (mezonefrik) kanalının** sefalik ucu epididim, vas deferens ve ejakülatuar kanalı meydana getirir. Mezonefrik (Wolff kanalı) kanalından gelişen Vas deferensin bir çıkıntısı seminal vezikülleri meydana getirir.

Testisin alt kutbunda **gubernakulum** oluşur, karın duvarına oblik (eğimli) olarak karşıya uzanır ve labioskrotal şişkinliklerden oluşan skrotomal şişkinliğe tutunur. Testis 28. Haftada aşağıya inguinal halkanın içine doğru hareket eder. Bu aşamadan sonra gubernakulum büyür ve testis skrotum içine inerek burada yerleşir (36).

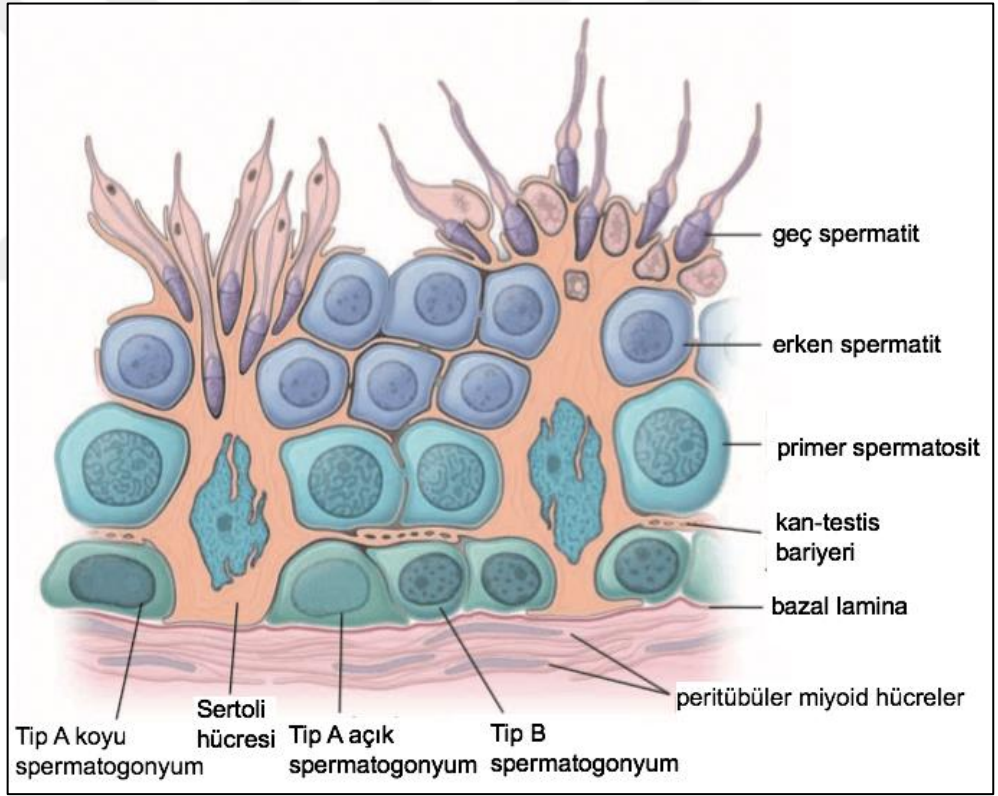
2.3. Testis Histolojisi:

Testis tunika albugenia adı verilen sıkı bağ dokusu tarafından sarılır. Kapsülün içinde kan damarlarını içeren gevşek bağ doku tunika vasküloza bulunur. Kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar her bir testisi yaklaşık 250 ila 300 lobüle böler. Testis lobüllerinden her biri, içinde sperm üretilen yaklaşık 1 ila 4 seminifer tübülden ve Leydig (interstisyel) hücrelerinin bulunduğu bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelmektedir. Tunika albugenia, testisin arka yüzeyi boyunca kalınlaşır ve içeriye doğru mediastinum testisi oluşturur. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise giriş ve çıkışlarda mediastinumun içinden geçer (33).

Her bir testiste yaklaşık 250 ila 1000 seminifer tübül mevcuttur. Bu seminifer tübüllerden her biri yaklaşık 150 ila 250 µm çapında olmakla birlikte 30 ila 70 cm

uzunluğundadır. Tübüller kıvrımlıdır ve düz tübüller (tubuli rekti) aracılığıyla rete testise bağlanırlar. Rete testis kanalları, yaklaşık 10 ila 20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına tutunurlar (37).

Seminifer tübüller, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olarak adlandırılan iki baskın hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli bir lümeninden meydana gelirler (Şekil 2.4.). Seminifer tübüller arasındaki boşluklarda ise kan damarları ve lenfoid sinüzoidler ile Leydig hücre toplulukları mevcuttur. Seminifer epitel bazal membran, fibroblastlar ve miyoid hücrelerden meydana gelir. Motil olmayan spermleri rete testise doğru hareket ettiren miyoid hücreler ritmik kasılma altivitelerinden sorumludur. Spermier epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri hareketlilik özelliklerini kazanırlar (34).



Şekil 2.4. Seminifer epitelin şematik gösterimi (33).

2.3.1 Sertoli Hücreleri:

Sertoli hücreleri, destek veya sustentaküler hücreler olarak da adlandırılırlar. Bu hücreler, puberteye kadar seminifer epitelyumun baskın hücre

tipidirler. Seminifer túbülde, bazal laminadan túbül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin, komşu separamatogenik hücreleri çevreleyen ve bu hücrelerin aralarındaki boşlukları dolduran yaygın apikal ve lateral uzantıları bulunur. Oluklu çekirdekleri ve geniş çekirdekçikleri vardır. Bazolateral bölgelerinde, Sertoli hücreleri ile komşu Sertoli arasında zonula okludens tipi sıkı bağlantıları vardır (33,34).

Sertoli hücrelerinin önemli bir görevi olan kan-testis bariyerinin oluşumu, bazolateral hücre zarları arasında sıkı bağlantılar ile seminifer epitelde gerçekleşir. Bu bariyer memelilerdeki en sıkı kan-doku bariyeridir. Kan-testis bariyeri sayesinde, bağışıklık sistemi olgunlaşmış, vücudun kendi hücrelerine karşı toleransı geliştikten sonra gözlenen özgün spermatogenik hücreler, vücudun otoimmün saldırılarından korunurlar (37).

Sertoli hücrelerinin **diğer önemli görevleri ise**; spermatogenik hücelere destek sağlamak, korumak ve beslemek; spermatidler tarafından atılan artık (rezidual) cisimcikleri fagositoz yoluyla ortadan kaldırmak, olgun spermatidlerin seminifer túbül lümenine salınımını kolaylaştırmak ve seminifer túbül lümenine proteinler ve iyonlardan bakımından zengin bir sıvı salgısı yapmaktır (33,34).

Sertoli hücrelerinin hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapma yetenekleri vardır. Bu hücreler, testisten yeni üretilen ve olgunlaşmakta olan spermlerin kanallara ilerlemesini sağlayan sıvının yanı sıra çeşitli önem arz eden faktörlerde üretmektedirler. Testesteronun spermiyogenez için gereken konsantrasyona ulaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP) bunlardan biridir. Sertoli hücreleri inhibin ve aktivinin α ve β alt ünitelerini salgırlar. İnhibinin, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve FSH salınımı üzerine negatif feedback etkisi olup, aktivinin FSH salınımı üzerine pozitif feedback etkisi vardır. Sertoli hücrelerinin yüzeyinde **FSH** ve **Testosteron** reseptörleri bulunduğundan dolayı, salgılama fonksiyonları FSH ve Testosteron tarafından kontrol edilirler. Androjen bağlayıcı protein sentezi ve salgılanması FSH tarafından düzenlenir (34,37).

Sertoli hücreleri, fetüste anti müllerian hormon (AMH) olarak adlandırılan glikoproteinin üretilmesinden sorumludurlar. Embriyonik gelişimde anti müllerian hormon paramezonefrik (Müller) kanalların gerilemesiyle ilişkilidir ve bu hormonun

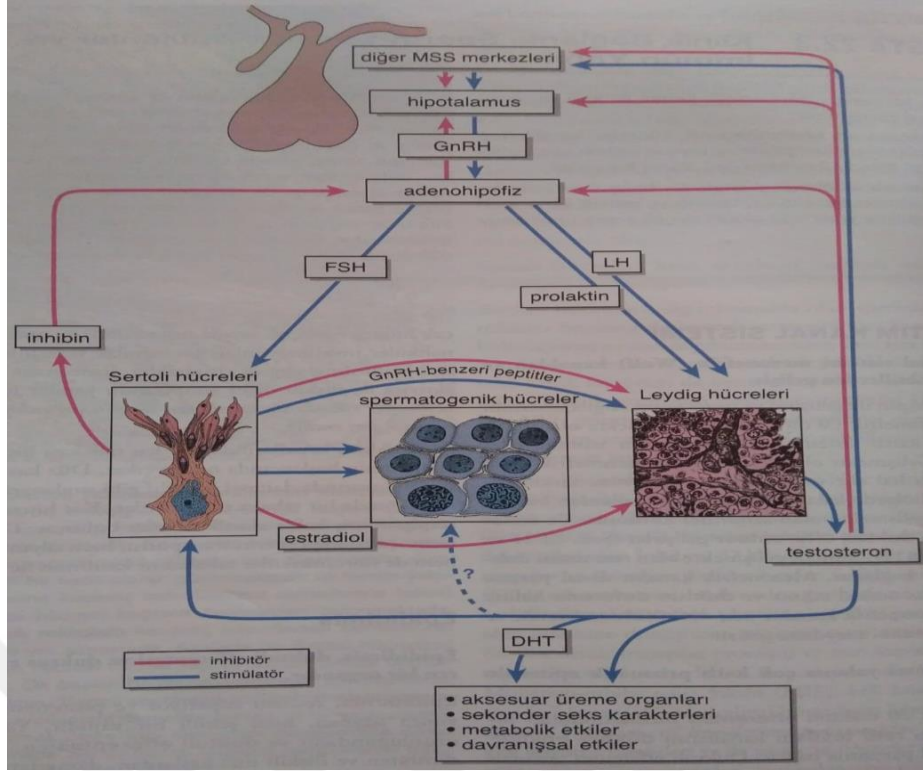
yokluğunda paramezonefrik kanallar varlığını devam ettirerek dişi üreme sistemine katılırlar (37).

2.3.2 Leydig Hücreleri:

Lobüller arası alanda kan damarları, lenfatik kanal ve sinozoidler yakınında gözlenen Leydig (interstisyel) hücreleri lipid damlacıkları içeren, büyük, poligonal şekilli ve eozinifilik hücrelerdir. Bu hücreler, hipofizden salgılanan bir gonadotropin olan LH ile uyarılmasının ardından steroid hormon olan **testosteronu** üretirler. Testesteron hormonu ikincil (sekonder) erkek cinsiyet özelliklerinin meydana gelmesini destekler. Bu hormonun salgılanması; embriyonik gelişim, cinsel olgunluk ve üreme kabiliyeti için elzemdir. Erkek fetusta, gebeliğin 8. haftasından itibaren Fetal Leydig hücrelerinde testesteron üretimi aktif hale gelir. Daha sonra bu hücreler fetal hayatın yaklaşık olarak 5. ayından başlayarak inaktif bir döneme girerler. Pubertede gonadotropik (LH) uyarının etkisiyle tekrar aktif hale geçerek yaşam boyu testesteron sentezini sürdürürler (33,34,37).

2.3.3 Spermatogenez:

Spermatogenez, testislerdeki seminifer tübüllerde meydana gelen, spermatogonyumdan olgun sperm gelişim prosesidir. Bu proses hormonal bir kontrol altında olup, nöroendokrin aktivite ile yönetilir (Şekil 2.5.). Fetal ve postnatal dönem boyunca seminifer tübüllerde pasif olarak bekleyen spermatogonia, puberteden kısa bir süre önce pitüiter gonadotropin seviyelerinin artmasının etkisiyle olgunlaşma sürecine başlar ve hayat boyu devam eder. Spermatogonia mitoz bölünmeler geçirerek proliferasyona başlar ve değişikliğe uğrar.



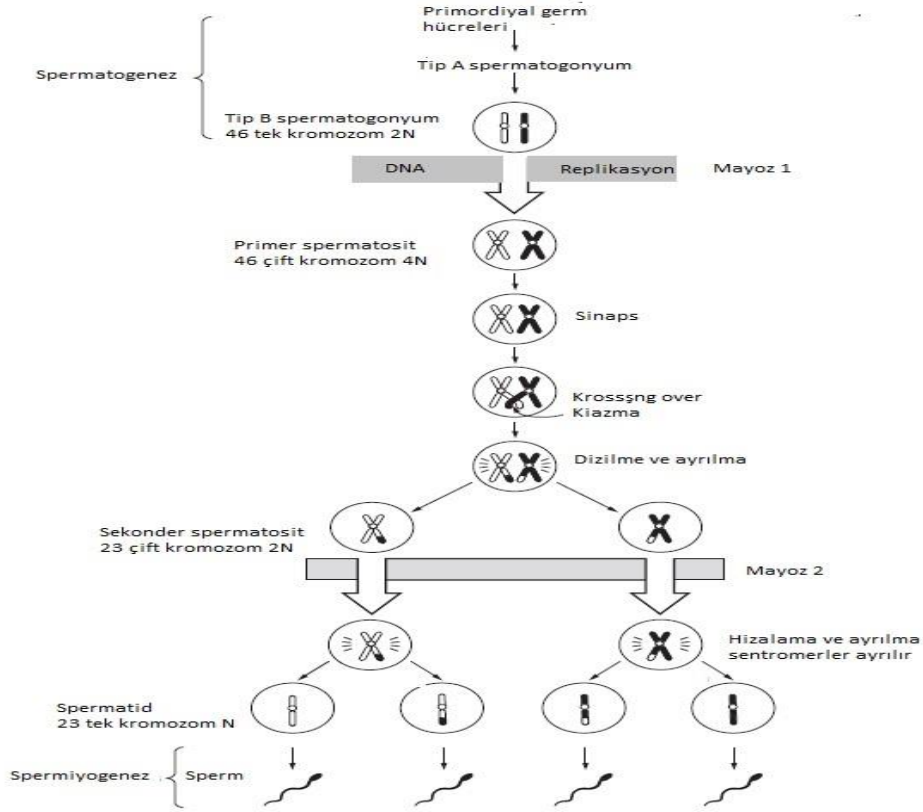
Şekil 2.5. Spermatojenin hormonal kontrolünün şematik gösterimi (33).

Bu süreç esas olarak üç farklı safhaya ayrılmaktadır: Spermatojenyal faz, spermatozit fazı (mayoz), Spermatoit faz (spermioyenez). Spermatojenyal fazda, kök hücreler çok sayıda mitoz bölünme geçirerek kendi yerlerine geçecek hücreleri ve primer spermatoitlere farklılaşacak olan spermatojenyum popülasyonunu oluştururlar. Rutin histolojik preparatlardaki nükleusların görünümü esas alınarak 3 gruba ayrılmaktadırlar (33).

Tip A koyu (Ad) spermatojenyumların kök hücre oldukları düşünülmektedir. Bu tip spermatojenyumlar oval şekilli ve yoğun bazofilik nükleuslara sahiptirler. Düzensiz bölünmeler geçirerek bir kısmı kök hücre olarak kalan Tip A koyu spermatojenyumları, diğer bir kısmı ise Tip A açık spermatojenyumları oluştururlar.

Tip A açık (Ap) spermatojenyumların açık renkte boyanan oval şekilli nükleusları vardır. Peş peşe mitotik bölünmeler geçirerek sayılarını arttırlar. Bu tip spermatojenyumlar, spermio üreten farklılaşma sürecine girecek hücrelerdir.

Tip B spermatogonyumlar, Tip A açık spermatogonyumların peş peşe mitotik bölünmeler geçirdikten sonra farklılaşmasıyla meydana gelirler. Yoğunlaşmış kromatinli yuvarlak nukleusları sahiptirler. Bu hücrelerin görünümü, spermatogonial fazdaki son safhayı temsil eder. Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi sonucunda primer spermatozitler üretilir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Spermatogenez.

2.3.4 Spermiyogenez:

Golgi Fazı:

Bu fazda spermatid sitoplazması, çekirdeğe komşu olan belirgin bir Golgi cisimciği, mitokondriler, bir çift sentriyol ve serbest ribozomlar içerir (37). Bu faz periyodik asit-Shiff (PAS) pozitif granüllerin varlığı ile karakterizedir. Bu **proakrozomal** granüller, glikoprotein bakımından zengin olup, akrozomal vezikül olarak adlandırılan ve nüklear zarfa komşu, bir membranla sınırlı bir vezikülü oluşturmak için bir araya gelirler. Bu fazda genişleyen akrozomal vezikülün içeriği

artar ve akrozomal vezikülün konumu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Bu sırada sentriyoller de junkstanüklear bölgeden spermatidin arka kutbuna taşınırlar. Arka kutba yerleşen olgun sentriyol plazma zarına dik açı ile hizalanır. Daha sonra, sentriyol sperm kuyruğunun **aksonemini** oluşturacak olan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi yerleşimli mikrotübül parçalarının bir araya gelmesini başlatır (33).

Kep Fazı:

Bu fazda akrozomal vezikül yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır. Nükleusun ön yarısında şekillenen bu yeni yapıya **akrozomal kep** adı verilir (33). Akrozom, **akrosin** (tripsin ve hiyalüronidaz benzeri proteaz) gibi hidrolitik enzimleri bulunduran özelleşmiş bir lizozom türüdür. Spermatozoon bir oositle karşılaştığı an, bu enzimler salınarak oositi çevreleyen korona radiata hücrelerini birbirinden ayırır ve daha sonra zona pellisudayı sindirir. Bu olay, **akrozomal reaksiyon** olarak tanımlanır ve fertilizasyonun ilk basamaklarından bir tanesidir (37).

Akrozom Fazı:

Bu fazda spermatid yeniden konumlanır. Baş, Sertoli hücresinin içerisine iyice gömülerek bazal laminaya doğru yönelir. Gelişim aşamasında olan flagellum seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu yassılaştır ve uzar. Nükleus ve çevresindeki akrozom da plazma zarının ön kısmına yakın bir pozisyona taşınır ve daha sonra sitoplazma posteriyora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller silindirik bir kılıf olan **manşeti** oluşturmak üzere akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanarak organize olurlar. Sentriyoller gelişme aşamasında olan spermin boyun bölgesini oluşturmak üzere modifiye olurlar. Nükleuse tutunan sentriyollerden dokuz tane kalın fibril gelişerek aksonemin mikrotübüllerinin periferinde yer alan dış yoğun fiberler olarak kuyruğun içine uzanırlar. Bu fiberler nükleus ile flagellumu birleştirerek **bağlantı parçasını** oluştururlar (33).

Daha sonra manşet kaybolur, mitokondriyonlar, boyun bölgesindeki fibrillerin etrafında ve boyun bölgesinin porteriyo uzantısında sıkı heliks tarzında bir kılıf oluşturmak için sitoplazmanın kalan kısmından göç ederek sperm kuyruğunun **orta parçasını** oluştururlar. Orta kısmın distaliinde çok sayıda bağlantı

noktasında oluşan bir **fibröz kılıf**, **esas parçanın** dokuz longitudinal fiberini çevreleyerek flagellumun neredeyse ucuna kadar uzanarak **son parçayı** oluşturur (33).

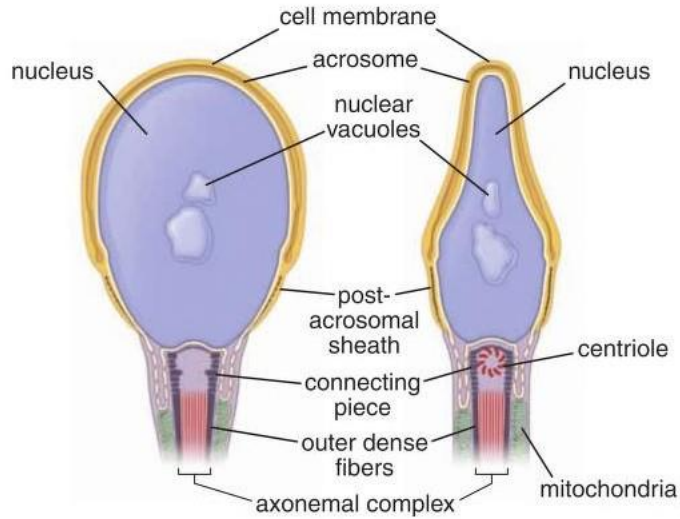
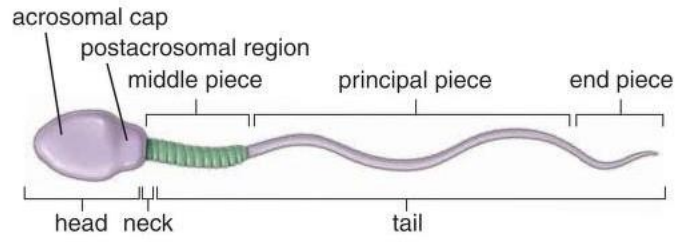
Olgunlaşma Fazı:

Olgunlaşma evresinde keratin içeriğine sahip olan dış yoğun lifler gelişir ve aksonem boyunca sıralanırlar. Mitokondriyonlar, gelişmekte olan flagellum (kuyruk) boyunca dizilmelerini tamamladıktan sonra flagellum, keratin içerikli dış yoğun liflerle sarılı merkezi bir aksonemden meydana gelir. Çekirdek yoğunlaşır ve uzar. Manşet kaudale göç ederek dağılır (34). Spermatid olgunlaşmasının bu son fazında flagellum etrafındaki sitoplazma azaltılarak olgun spermatozoon meydana gelir. Atılan sitoplazmik kısım **rezidüal cisimcik** olarak da adlandırılır. Bu kısım daha sonra Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (33).

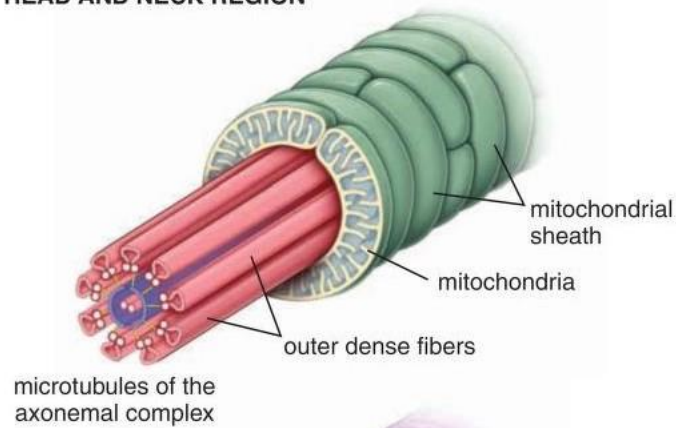
Spermiyogenezdeki olaylar yapısal olarak bakıldığında eşsiz bir hücrenin meydana gelmesi ile sonuçlanmaktadır. Spermatogenezin sonunda spermatitler son olgunlaşma evresini de geçirdikten sonra **spermiasyon** olarak adlandırılan bir süreç ile seminifer tübülün lümenine salıverilirler (33).

2.3.5 Sperm Yapısı:

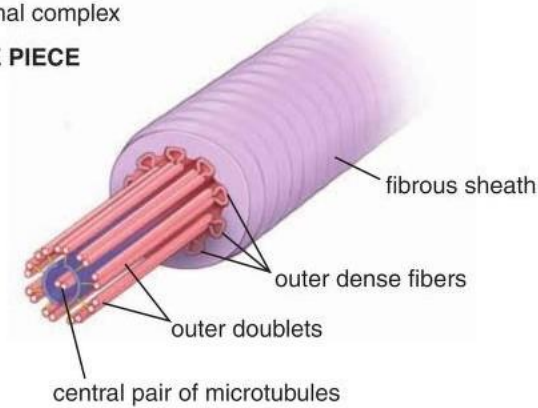
Olgun bir sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Baş ve kuyruğu bağlantı parçası bağlamaktadır. Baş ve kuyruk bölgelerini bir plazma zarı çevreler. Sperm başı akrozom başlıkla sarılan bir çekirdekten oluşmaktadır. Çekirdek akrozomdan dolayı yassı bir hal alır. Akrozom hidrolitik enzimlerden zengindir. Sperm boyun bölgesinde çift sentriyol bulunmaktadır. Kuyruğun orta parçasında heliks şeklinde dizilen mitokondriyonların yanı sıra aksonemden uzanan 9 adet kolon bulunmaktadır. Esas parçasında ise 7 adet yoğun lif (kalın lif) ile sarılmış aksonem ile fibröz kılıftan oluşmaktadır. Esas parça kuyruğun en uzun kısmı olup, fibröz kılıf kolonlardan çıkan iskelet tarafından oluşturulur ve keratin içerir (34). Kuyruğun son parçası ise yalnızca aksonemal kompleksi bulundurur (Şekil 2.7.) (33).



HEAD AND NECK REGION



MIDDLE PIECE

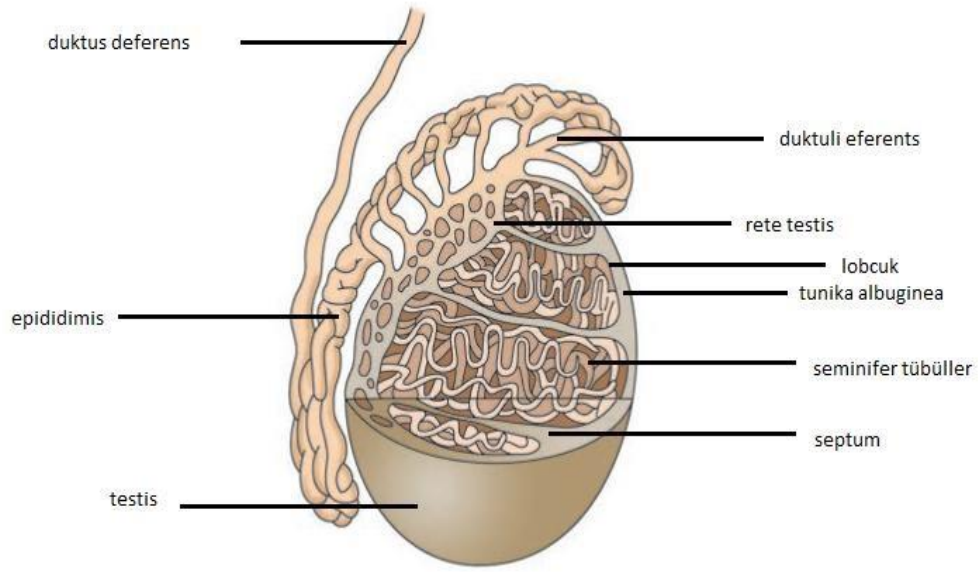


PRINCIPAL PIECE

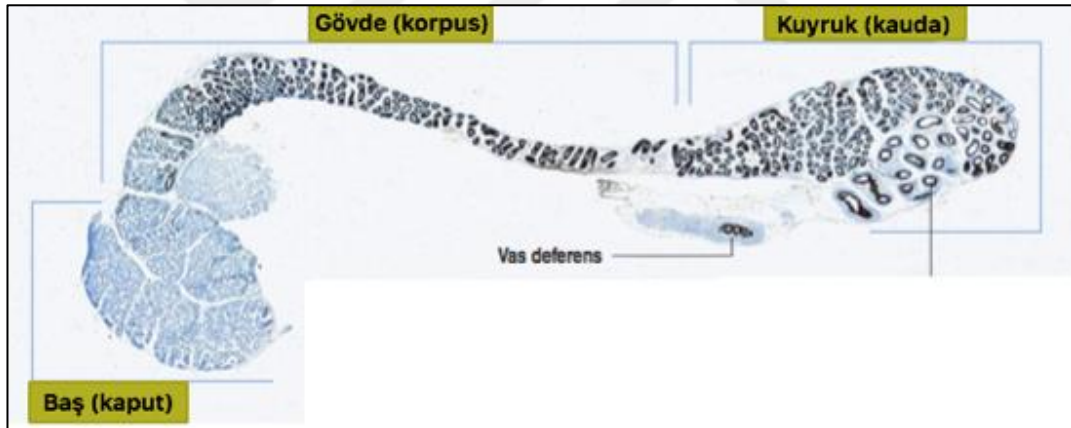
Şekil 2.7. Spermin yapısı (33).

2.3.6 Epididimis Histolojisi:

Seminifer tübül lümeninde, Sertoli hücrelerinin salgılamış olduğu bir sıvı içerisinde testislerde üretilen spermler bulunur. Miyoid hücrelerin peristaltik hareketleri yardımıyla epididimisten ayrılarak kanallar boyunca ilerlemeye başlarlar. Seminifer tübüllerden tubuli rekti diye adlandırılan düz tübüllere geçerler ve buradan sırasıyla rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens yolunu takip ederek ejakülatuar kanala ulaşır, daha sonra buradan da ejakülasyon ile dışarıya atılırlar (şekil 2.8.). Epididimis, testisin süperiyor ve posteriyor yüzeyleri boyunca uzanan, kıvrımlı yapıda bir tbldr. Bu yapı duktuli efferentes, duktus epididimis, düz kas, damarlar ve bağ dokusundan oluşmaktadır. Epididimis kanalı; **baş** (kaput), **gövde** (korpus), **kuyruk** (kauda) olmak üzere üç ana bölüme ayrılmaktadır (şekil 2.9). Epididimis epiteli **stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik** bir epiteldir. Epitel 2 ana hücre tipi içermekte olup buna **esas hücreler ve** lümene uzanan stereosilyalı uzun prizmatik hücrelerdir. **Bazal hücreler** ise bazal lamina üzerindeki kk yuvarlak hücrelerdir (34).



Şekil 2.8. Seminifer tübül ve epididimis (38,39).



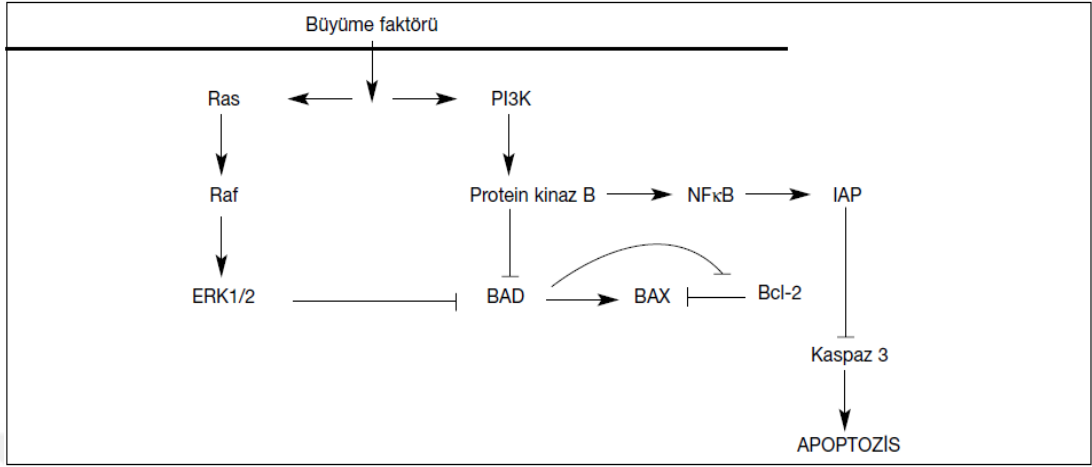
Şekil 2.9. Epididimisin bölümleri (34).

2.4 Sisplatin:

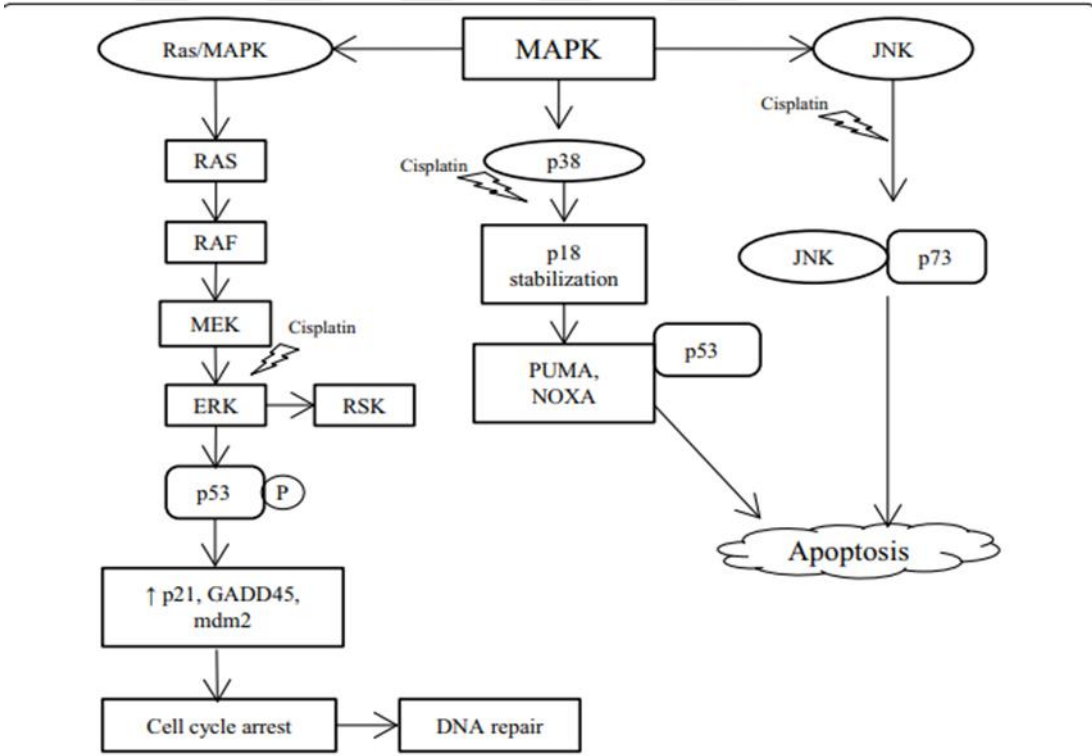
Sisplatin (Cisplatinum, (CDDP)) yaygın olarak bilinen kemoterapötik bir ajandır. Sisplatin platinyum (kapboplatin ve oksaplatin) platinyum içeren antikanser özellikte bir ilaçtır. Etki mekanizması, bulundurduğu platinyum kompleksleriyle DNA bağlarında kopmalara neden olarak kanserli hücrelerde apoptozisi aktive etmeye yönelterek, kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamak şeklindedir (40,41). Sisplatin klinikte sarkomalarda, lenfomalarda, karsinomlarda, serviks kanseri gibi

çeşitlikanser tedavilerinde kullanılmaktadır. Sisplatinin testis kanserlerinde ki başarısı %10- %85 arasındadır (42). Sisplatin yaygın bir klinik kullanımına rağmen, aynı zamanda da sitotoksik bir ajandır. Sisplatin, doza bağlı olarak başta nefrotoksite olmakla birlikte nörotoksite, infertilite, hipokalsemi, kemik iliğini baskılama, hemolitik anemi ve stria vaskulariste oksidatif strese aracılığıyla sağlığa yol açmakgibi birden fazla farklı yan etkileri bulunmaktadır. Bununla birlikte Sisplatinin bazı özel genlerde değişikliklere yol açtığı da bildirilmiştir. Bu genlerden bazıları; ilaç direnç geni (MDR-1, P-gp), hücre iskelet yapısı ve fonksiyonundan sorumlu genler (Vim, Tubb5, Tmsb10, Tmsb4x, Anxa2), apoptozis sorumlu genleri (Bid, Bad, Bax), doku remodeling geni (klusterin, IGFBP-1, TIMP-1), ve detoksifikasyondan sorumlu genler (Gstm2, Gtp2) dir (41). Sisplatin kaynaklı toksisitede hücrelerde mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) hücre içi sinyal yollarıyla etki ederek hasara neden olur. MAPK'larlerin / treonin kinazların paralel kaskadlarından oluşan bir dizidir. MAPK hücre çoğalması, farklılaşması ve var oluşun devam ettirilmesi gibi görevlerde rol oynayanbir hücresel sinyal yolağıdır. MAPK başlıca 3 büyük yoldan oluşur. Bunlar hücre dışı düzenlenmiş kinaz (ERK), p38 ve Jun N-terminal kinaz / stresle aktivasyonu sağlanan proteinkinazdır (JNK / SAPK). ERK sinyal yolağı, hücre dışı büyüme faktörleri ile etkinleştirilir ve hücrenin hayatta kalması ve hücrenin ölümü ile bağlantılıdır. ERK ailesi üyeleri, G protein ya da tirozin kinaz proteinleri ile münasebetli reseptörlerle bir ilişki içerisinde görev yaparlar. cAMP ile kalsiyum (Ca²⁺) bağımlı mekanizma, ERK yolağının aktivasyonu veya baskılanmasında rol oynarlar. Sisplatin hipokalsemiye neden olarak ERK yolağına etki ederken, P38 ve JNK / SAPK yolağı da UV ışınlama, hiperosmolarite, inflamatuvar sitokinler ve stres ile aktive edilir (Şekil 2.10) (41,43,44).

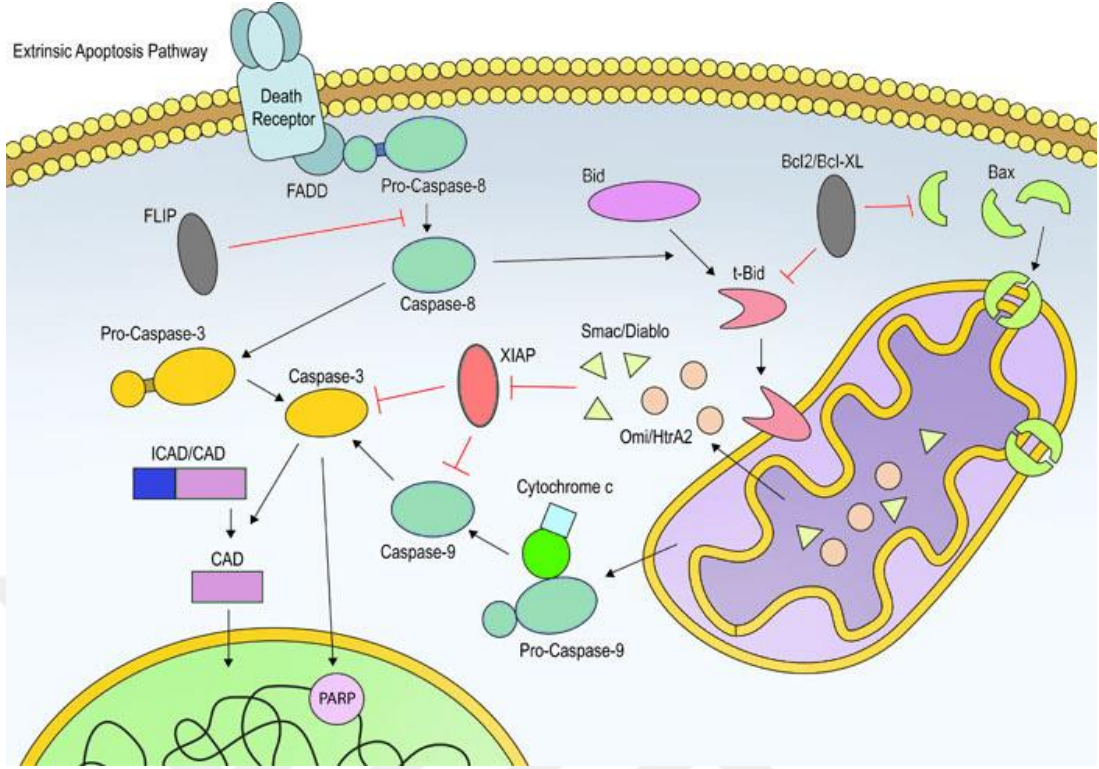
Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Sisplatin'in in vitro ve in vivo olarak, üç MAPK yolunu da aktive ettiği belirtilmiştir. Bununla birlikte ERK ve p38 yolları tümör nekrosis fatkör- α (TNF- α) üretimini de artırır. ERK yolağının seminifer tübül hücrelerinde apoptosizi regüle eden Kaspaz-3'ü aktive ettiği bilinmekle birlikte, P38 aktivasyonunun da seminifer tübül hücrelerinde hasara neden olduğu gösterilmiştir. Hidroksil radikallerinin, Sisplatin tarafından p38 yolağının uyarılmasında aracılık ettikleri gösterilmiştir (Şekil 2.11).



Şekil 2.10. MAPK ve protein kinaz B yollarının apoptozis mekanizmalarına etkileri (41,43,44).



Şekil 2.11. MAPK yolağının şematik gösterimi ve Sisplatin'in apoptozu desteklemedeki rolü (41,43,44).



Şekil 2.12. Apoptozun düzenlenmesinin şematik gösterimi.

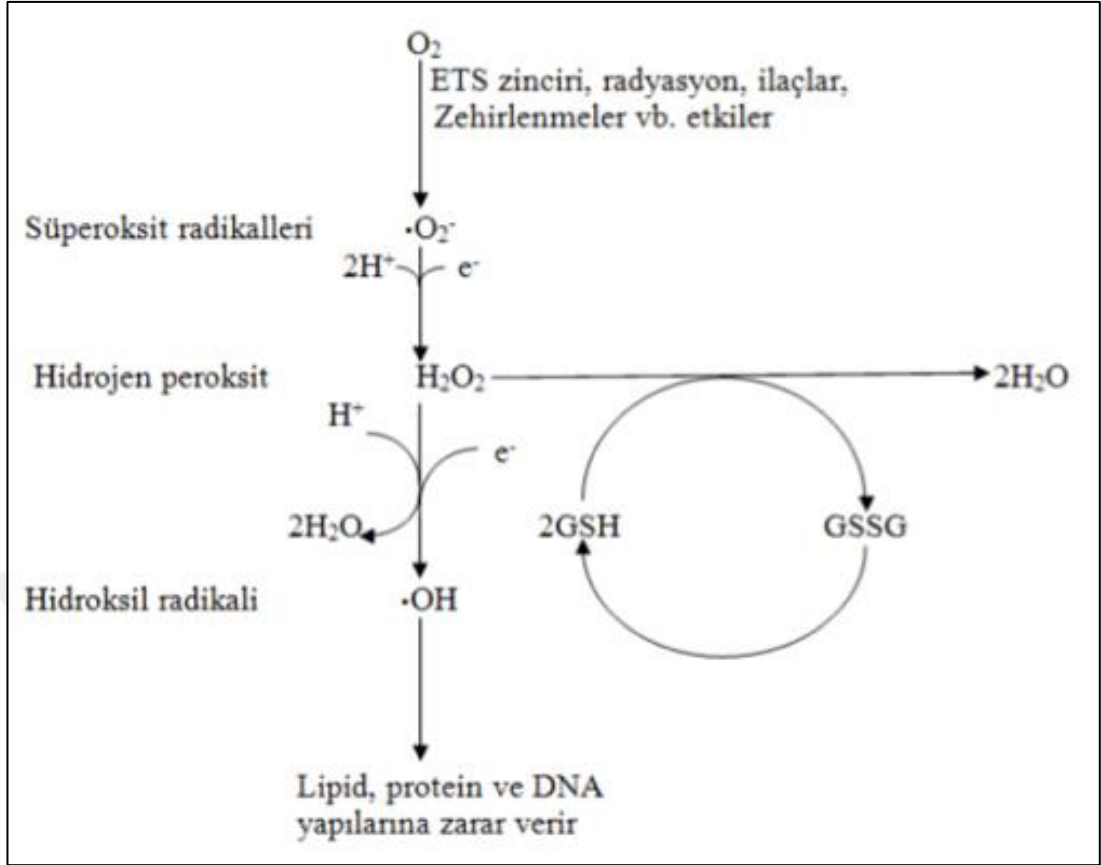
Sisplatinin nedenli toksisitenin çeşitli mekanizmaları vardır ve oldukça karmaşıktır. Bununla birlikte literatürde belirtildiği üzere, Sisplatinin çeşitli organlarda oksidatif strese, inflamasyona ve fibrogenezise yol açtığı ve apoptozisi indüklediği raporlanmıştır. Bazı kaynaklarda Sisplatin'in, yüksek konsantrasyonlarda seminifer tübüllerin germinal epitelinde nekroze yol açtığı; düşük konsantrasyonlarda ise Kaspaz-9 yolağı vasıtasıyla apoptozisi indüklediğini gösterilmiştir (Şekil 2.12.) (41,43). Wang ve arkadaşları Sisplatine bağlı gelişen oksidatif stresin akut testis hasarına yol açtığını göstermişlerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS) direkt olarak lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerini etkileyerek ana yapının bozulmasına neden olurlar. Sisplatin ROS, ksantin-ksantin oksidaz sistemi, mitokondri ve NADPH oksidaz üzerinden ROS üretimini artırdığı ve testis dokusunda hasarlara sebebiyet verdiği gösterilmiştir (40,45). Sisplatin, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesini stimule ederek hücre içi kalsiyum seviyesinde artışa ve böylece NADPH oksidaz enziminin aktivasyonuna, dolayısıyla da hasarlı mitokondrilerde serbest radikallerin üretiminin artışına neden olur. Bunun yanı sıra

serbest radikallerin mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (40,46).

Sisplatin'in, testis dokusunda antioksidan enzimlerin üretimini inhibe ettiği, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin faaliyetlerini büyük lde azalttığı bildirilmiştir. Sisplatin'in, Leydig hücrelerinde luteizan hormonreseptr bağlanma kapasitesini yaklaşık %80 oranında azaltarak, Leydig hücrelerinde disfonksiyona neden olduğu da bildirilmiştir (45,46).

2.5 Oksidatif Stres ve Radikaller:

Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya birden daha fazla eşleşmemiş elektron cerirler. Bu nedenle kararsız yapıda olan, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük etkin moleküllerdir. Serbest radikaller, organizma da endojen ve eksojen etkenlerin etkisiyle olmak üzere iki şekilde oluşabilmektedir. Serbest radikaller kararsız yapıda oldukları için, çok aktif yapıda olup çeşitli enzimlerin ve diğer tüm hücre birleşenlerinin kararlı yapılarına etki edebilmektedirler (47,48). Aerobik canlıların hücrelerinde metabolik olarak O₂ türevi, karbon ve kükürt merkezli serbest radikaller fonksiyonel olarak belirli düzeylerde oluşmaktadır (49). Serbest radikallerin oluşumuna neden olan bazı çevresel faktörler vardır; bunlar arasında başta iyonize ve ultraviyole radyasyon olmak üzere; virüsler, enfeksiyon, stres, parakuat, allokсан, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler, pestisidler, karbon tetraklorür, parasetamol türevi ilaç toksikasyonları, Sisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, nikel, krom, civa demir, bakır, kadmiyum, gibi ağır metal iyonları, asbest lifleri, ozon, mineral tozlar, karbon monoksit, silika, aflatoksin B1 ve PCB (poliklorlubifenil)'ler sayılabilir. Hem endojen hem de eksojen kaynaklı serbest oksijen radikalleri hücrelerde DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girerek oksidatif DNA hasarı, karsinogene ve yaşlanmaya sebep olmaktadır. Serbest radikallerin DNA zerindeki hasar mekanizması, serbest radikallerin ayrılma ve birleşme tepkimelerinden ibarettir. Bu tepkimenin de karbon merkezli çeker radikallerinin OH- veya H- bağlı olarak bulunan heterosiklik baz radikallerinin oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (şekil 2.13.) (şekil 2.14.) (47,48).



Şekil 2.13. Serbest radikal üretiminin şematik gösterimi (50).

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2\cdot$	Hidroperoksil radikali ($HO_2\cdot$)
$HO_2\cdot \rightarrow H^+ + O_2\cdot$	Süperoksit radikali ($O_2\cdot$)
$O_2\cdot + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
$H_2O_2 + e \rightarrow OH + OH\cdot$	Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)
$OH\cdot + e + H^+ \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Şekil 2.14. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları (50).

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak isteyen hücreler, serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldıran antioksidanlar üretmektedirler. Metabolik olarak açığa çıkan serbest radikallerin oluşum hızı ve miktarı, aynı zamanda bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunur. Bu sayede hücre serbest radikallerin negatif etkilerinden korunur. Eğer bu denge bozulursa ve oluşan serbest oksijenler ortadan kaldırılmazsa, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin yaptıkları hasara 'oksidatif stres' denir (48). Oksidatif stresin;

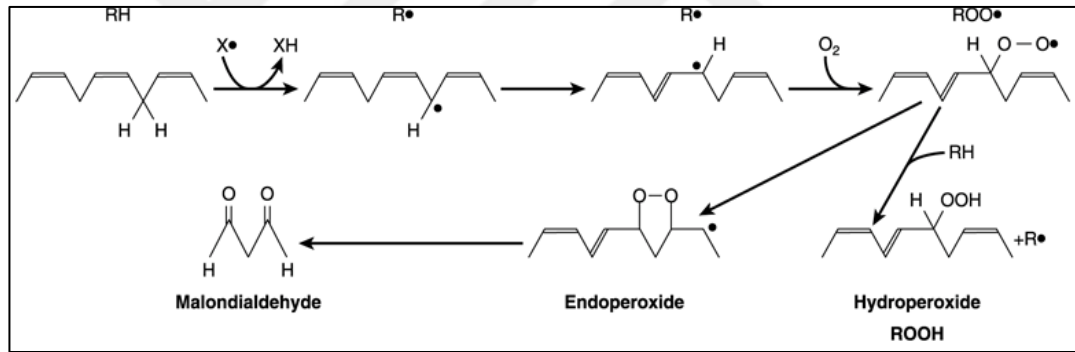
Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Hutchinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların fizyopatolojisinde rol aldığı bilinmekle birlikte, endotelde oluşan oksidatif stresin ateroskleroz ve diğer damar hastalıkları ve insüline bağlı tip-1 diyabet gibi dejeneratif hastalıklara da yol açtığı gösterilmiştir (41).

Serbest radikaller membran lipidleri peroksidasyonuna yol açmak, Glutatyon (GSH) gibi tiyollerin konfigürasyonuna dolayısıyla da metabolik aktivasyonuna zarar vermek ve buna ek olarak direkt DNA hasarı oluşturmak üzere bilinen 3 mekanizma ile hücreye zarar verir. Serbest radikaller membran lipidleri peroksidasyonu ile hücre membranının geçirgenlik, transport ve bunlar gibi çeşitli fonksiyonlarını bozarak hücrelerin hızlı bir biçimde hasar görmesine neden olurlar. Glutatyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonuna neden olan serbest radikaller, tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Oluşan sülfür merkezli radikallerde (RSH) sülfür monomerlerinin karşılıklı bağlanmasına neden olan reaksiyonlar oluşur. Bu sayede disülfid bağının (SS) oluşumu proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerine mâni olur. Serbest radikallerden biri olan hidroksil radikali (OH), doğrudan pürin, primidin bazları ve deoksiriboz monomerleri başta olmak üzere DNA'nın tüm bileşenleriyle reaksiyona girer ve hasara neden olur. Bunlardan en önemlisi, DNA'nın çaprazbağlarına eklenerek, Timinin metil grubundan bir hidrojen atomunu ve 2' deoksiribozunbeş karbon atomunu ekarte etmesidir. Yeni konfigürasyonda oluşan modifiye baz ve şekiller, DNA proteinlerinin çapraz bağlanmalarında çeşitliliği yol açmaktadır. Eğer DNA'nın canlı organizmalarda nesilden nesile aktarıldığı göz önünde bulundurulursa, DNA hasarının ROS ile indüklenen hücresel modifikasyonlarının gelecek nesiller için ciddi tehlike olduğu aşikardır. Buradan yola çıkarak, oksidatif DNA modifikasyonlarının diyabet, kanser gelişimleri ve yaşlanma mekanizmalarına katkıda buldukları ortaya atılmıştır (47,49). Endojen ROS, mitokondrilerde elektron taşınması zincirinden elektron kaçağına bağlı olarak ve ksantin oksidaz, dioksijenaz, hemoglobin gibi pek çok enzim ve proteinin katalitik döngüsü sırasında oluşabilir (47,50,51).

Spermatogenez ile saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreci gerçekleştiren testislerde serbest radikaller çok ciddi olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Spermatogenez ile doğal olarak meydana gelen yoğun bir hücre bölünmesi vardır. Bu da germinal epitel tarafından yüksek

oranda mitokondriyel oksijen tüketimini gerektirir. Testisteki yoğun hücre bölünmesi ile oldukça önemli bir yeri olan oksijen miktarının gerekliliğinden dolayı bu dokuda zayıf vaskülarizasyona bağlı olarak oksijen miktarının düşük olması serbest oksijen radikallerinin negatif etkilerine karşı bir koruma sağlamaktadır. Ancak bununla beraber testiste fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı, testisi oksidatif strese karşı hassas hale getirmektedir (41,52).

Oksidatif stres, erkek infertilitesinin etiolojisindeki (neden bilimi) en önemli etmenlerin başında yer alır. Spermatozoonlarda ROS saldırısı; lipid peroksidasyonunu başlatarak (Şekil 2.15.), spermatozoonların hem hareketlerini hem de DNA konstruksiyonunu bozmaktadır. Bunun yanında Leydig hücrelerinin steroidogenik kapasitelerinin bozulmasının nedeni olarak, testesteron üretimini de bloke etmektedir. Testiste oksidatif stresin artması ile erkek infertilitesi artması arasında bir korelasyon olduğu klinik çalışmalarca kanıtlanmıştır (53,54).



Şekil 2.15. Lipid peroksidasyon son ürünü olan Malondialdehit (MDA) oluşumu.

2.6 Antioksidanlar:

Antioksidan; bir organizmada serbest radikallerin neden olduğu protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi maddelerin oksidatif hasarını geciktiren veya önleyen maddelerdir (55). Antioksidanların bilinen yararları reaktif oksijen türlerini temizlemek, antioksidan savunmalarını düzenlemek ve ROS üretimini engellemektir (56). Antioksidanlar; serbest oksijen radikallerinin miktarlarının azaltılması, oluşumunun baskılanması, enzimatik reaksiyonlar, mevcut serbest radikallerin yok edilmesi veya metal iyonlarına bağlanmasının sağlanması gibi mekanizmaları içeren etkinlikleriyle aktif bir rol oynarlar (57).

Yapılan alışmalar, antioksidanların spermatozoayı ROS'dan koruyarak anormal spermatozoa üretimini engellediklerini, DNA kırılmalarını önlediklerini ve yardımcı üreme tekniklerinin sonucunu pozitif yönde geliştirdiklerini ortaya koymuştur (23).

Antioksidanlar incelenirken; endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Endojen kaynaklı olan antioksidanlara süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), ferritin, laktoferin, transferrin, hemopeksin, albümin ve seruloplazmin örnek verilebilir. Eksojen kaynaklı olan antioksidanlar arasında ise: Amifostin, tokoferol, curcumin, karoten, askorbik asit, bakır bağlayan proteinler, melatonin, demir bağlayan proteinler sayılabilir. Yapılan alışmalar, KAFE'in çeşitli kematerapötik ajanların yan etkilerine karşı, koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (58,59,60,61,62,63).

2.6.1 Kafeik Asit Fenetil Ester (KAFE):

KAFE farklı organ ve dokularda direkt veya dolaylı olarak antioksidan etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (64,65). KAFE'in hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu dengelediği, yapısında bulunan hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonuyla serbest radikallere bağlanıp bahsi geçen serbest radikalleri platformdan uzaklaştırdığı bildirilmiştir. Süperoksit dismutaz, glutatyon reduktaz, glutatyon peroksidaz, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz uyarımı ve nitrik oksit sentaz baskılaması ile de antioksidan özelliği gösterdiği raporlanmıştır. KAFE'in yukarıda bahsedilen durumlar gibi birçok biyolojik etkilerinden dolayı, kemoterapiye bağlı organ ve doku hasarlarında koruyucu etkiye sahip olabileceği düşünölmektedir (66,67).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2016/04 no'lu karar ile onay alınarak (Bkz. Ek-1) Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütüldü. Ayrıca Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2018.08.03.1362 proje numarası ile desteklendi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma deneysel olarak 2-3 aylık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar üzerinde yapıldı. Çalışmada kullanılacak deney hayvanları, AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ratlar, çalışma başlayıncaya kadar ve çalışma süresince Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, 22 ± 2 °C oda sıcaklığında, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlanacak ve ad libitum beslendi.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada Kontrol grubu, Sisplatin grubu, Kafeik asit fenetil ester grubu (KAFE) ve Sisplatin + KAFE grubu olmak üzere toplamda 4 grup çalışıldı.

- Grup 1: Kontrol grubu (n:8): 45 gün boyunca izotonik salin solusyonu intraperitoneal (i.p.) verildi.
- Grup 2: Sisplatin grubu (n: 12): 1., 3. ve 5, günlerde izotonik salinde çözülen Sisplatin (günlük 3 mg/kg) intraperitoneal olarak ve 2., 4. günlerde ve 5. günden sonraki 40 gün boyunca izotonik salin solusyonu i.p. olarak verildi.
- Grup 3: KAFE grubu (n:8): 2 ml'lik izotonik salinde çözümlenerek 45 gün boyunca 10 µmol/ kg i.p. olarak verildi.
- Grup 4: Sisplatin + KAFE grubu (n:12): 1., 3. ve 5, günlerde Sisplatin (günlük 3 mg/kg) i.p. olarak ve 2., 4. günlerde ve 5. günden sonraki 40 gün boyunca sadece KAFE (10 µmol/kg) intraperitoneal olarak verildi.

3.3. Işık Mikroskopik İncelemeler

1. Dokularbouin solüsyonu ile tespit edildi.
2. Akan musluk suyu altında yıkandı.
3. %70'lik alkolde iki saat bekletildi.
4. %80'lik alkolde iki saat bekletildi.
5. %96'lık alkolde bir saat bekletildi.
6. %96'lık alkolde bir saat bekletildi.
7. %100'lük alkolde bir saat bekletildi.
8. %100'lük alkolde bir saat bekletildi.
9. Ksilol I'de bir saat bekletildi.
10. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
11. Eşit miktarlarda hazırlanan Ksilol-Parafin karışımında 64°C etüvde 30 dakika bekletildi.
12. Parafin I'de 64°C etüvde üç saat bekletildi.
13. Parafin II'de 64°C etüvde üç saat bekletildi.
14. Takip aşamasından geçirilen dokular bloklama kaplarında parafine gömülerek etiketlendi.

Hazırlanan bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom cihazı ile 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin ve Periodik Asit-Schiff boyaması; apoptozisi göstermek için Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyamaları yapıldı.

3.3.1. Hematoksilen-eozin boyaması

1. Parafin kesitler 60-64°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
2. Ksilol I'de 2 dakika bekletildi.
3. Ksilol II'de 2 dakika bekletildi.
4. İki defa %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi.
5. İki defa %96'lık alkolde 1'er dakika bekletildi.
6. Akan suda yıkandı.
7. Hematoksilen boyasında 4-5 dakika bekletildi.
8. Akan suda yıkandı.
9. Asit alkole iki kere daldırıldı.

10. Akan suda yıkandı.
11. Amonyaklı suda 10 saniye bekletildi.
12. Akan suda yıkandı.
13. %80'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
14. Eozin boyasında 1 dakika bekletildi.
15. İki defa %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
16. İki defa %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
17. Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.3.2. Periodik Asit-Schiff boyaması

1. Kesitler deparafinize edildi.
2. Yıkayıp distile suya alındı.
3. Periyodik asit solüsyonunda 20 dk. bekletildi.
4. Distile suda yıkandı.
5. Schiff solüsyonunda 20 dk. Bekletildi.
6. Çeşme suyunda 10 dk. yıkandı.
7. Harris hema toksilende 1 dk. Zıt boyana uygulandı.
8. Distile suda iyice yıkandı.
9. Amonyaklı sudan geçirildi.
10. Distile suda yıkandı.
11. Alkol serileri ve ksilolden geçirildi.
12. Entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.3.3. Asidik Anilin mavisi boyaması

1. Fosfatlı tampon çözeltisi hazırlandı ve ardından 1 lt. distile suya 10 adet hazırlanmış olan tabletlerden atıldı. Hazırlanan solüsyonun pH'ı 7,2'ye ayarlandı.
2. Anilin mavisinden 5 gr alınarak 100 ml PBS ile karıştırıldı. Bu boya çözeltisi 100°Cde kaynatıncaya kadar ısıtıldı. Kaynadıktan sonra soğumaya bırakıldı. Sonrasında bu karışım filtre kâğıdı ile süzüldü ve 2 ay süre ile muhafaza edildi.
3. Boyanın pH'ı %100'lük asetik asitle titre edilerek 3,5'e getirildi.
4. %25'lik hazır glutraldehitden 12 ml alınıp 100 ml'ye PBS ile karıştırılarak tamamlandı, %3'lük glutraldehit elde edildi.

5. Bu üç solüsyon hazırlandıktan sonra boyanacak spermilerin hazırlanmasına geçildi.
6. 1200 devirde 5 dk santrifüj sonrası PBS ile yıkanan ejakülat lamın üzerine ince yayma şeklinde yayıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
7. Kuruyan preparat 30 dk süre ile %3'lük gluteraldehit ile fikse edildi.
8. 8- 10 dk pH 3,5 olan anilin mavisi içinde bekletildi.
9. 2 kez PBS de yıkandı ve kurutma kâğıdı ile iyice kurutuldu.
10. Mikroskopta x100 objektif ile çeşitli alanlardan iyi yapıya sahip 100 adet sperm seçilerek pozitif ve negatif şeklinde skorlandı.

3.3.4. Johnsen skorlaması

Hemotoksilen-eozin ile boyanan kesitlerde, seminifer tübül ve spermatogenez değişikliğini saptamak için Johnsen skorlaması kullanıldı. Her örnekten 20 tübül rastgele seçilip 1'den 10'a kadar puan verildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Johnsen skorlaması aşağıdaki puan sistemine göre elde edilmiştir;

1. Hiç hücre bulunmayan tübüller
2. Germ hücresi bulunmayan ama Sertoli hücresi içeren tübüller
3. Germ hücre olarak sadece spermatogonyum içeren tübüller
4. Spermatozoa ve spermatid içermeyen, spermatositlerin ise 5'den az sayıda bulunduğu tübüller
5. Spermatozit içeren ancak spermatozoa ve spermatid içermeyen tübüller
6. Spermatozoa içermeyen, spermatidlerin ise 10'dan az sayıda bulunduğu tübüller
7. Çok sayıda spermatidi olan ancak spermatozoa içermeyen tübüller
8. Germinal epiteli çok sıralı olan fakat lümeninde 10'dan az spermatozoa içeren tübüller
9. Spermatozoa içeren ancak germinal epitelinin düzeni bozulmuş ve lümenine doğru yığılma görülen tübüller
10. Çok sayıda spermatozoa içeren germinal epiteli çok sıralı ve düzgün olan tübüller

3.3.5. Kaspaze-3 immün işaretleme

Parafin bloklardan adezyonlu (polizimli) lamlara 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler boyama işleminde bir gece önce 37 derecelik etüvde bekletildi. Kaspaz-3 boyaması için Thermo Scientific™ Kaspaze 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody; sekonder olarak ise Thermo Scientific™ Lab Vision™ UltraVision™ Detection System (TP-015-HD) anti-Polyvalent HRP/DAB kit kullanıldı. Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama prosedürü basamakları aşağıdaki verilmiştir;

1. İki kere 5'er dakika Ksilol'de bekletildi.
2. %100'lük alkolde 5 dakika bekletildi.
3. %96'lık alkolde 3 dakika bekletildi.
4. %70'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
5. %50'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
6. Distile suda 3 dakika bekletildi.
7. Kesitler sonra PBS'e alındı.
8. Taze hazırlanan Citrate Buffer (x10) solüsyonuna alınan kesitler 360°C'de 5 dakika kaynatıldı.
9. Solüsyon seviyesi kontrol edilip azaldıysa solüsyon eklenerek 5 dakika daha 360°C'de kaynatıldı.
10. Soğuduktan sonra dokuların etrafı pap-pen ile çizildi ve kurumamaları için PBS damlatıldı.
11. Hidrojen peroksit damlatılarak 15 dakika bekletildi.
12. İki kere PBS ile yıkandı.
13. Serum block damlatılarak 10 dakika bekletildi.
14. Kaspaze-3 (Thermo Fisher Scientific; cat no: PA5-16335) antikoru için 1:100 dilüsyon oranına göre hesaplama yapılarak Kaspaze-3 antikor + diluent karışımı taze olarak hazırlandı.
15. Kesitlere Kaspaze-3 antikor damlatılarak üzeri parafilm ile kapatıldı ve +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
16. Ertesi gün kesitlerin parafilmli dikkatle çıkarılarak iki kere PBS ile yıkandı.
17. Pap-pen kontrol edildi, silinenlerin tekrar etrafı çizildi.
18. Biotinylated antikor (sekonder) damlatılarak 30 dakika bekletildi.

19. PBS ile yıkandı.
20. Streptavidin damlatılarak 15 dakika bekletildi.
21. PBS ile yıkandı.
22. Taze hazırlanan DAB solüsyonu damlatılarak karanlıkta 30 saniye bekletildi.
23. Distile su ile yıkandı.
24. Taze olarak 1:3 oranında hemotoksilen:distile su hazırlandı ve kesitlere damlatılarak 15 saniye bekletildi.
25. Distile su ile yıkandı.
26. %50'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
27. %70'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
28. %96'lık alkolde 1 dakika bekletildi.
29. %100'lük alkolde 1 dakika bekletildi.
30. Ksilol I'de 1 dakika bekletildi.
31. Ksilol II'de 1 dakika bekletildi.

Ksilol'den çıkarılan kesitler entellan damlatıldıktan sonra lamel ile kapatıldı. Işık mikroskobu altında değerlendirilecek olan preparatlar, lam kutusunda muhafaza edildi.

3.4. Floresan Mikroskopik İncelemeler

3.4.1. Floresan TUNEL boyama

Çalışmada In situ cell death detection kit, fluorescein (Roche, Catalog No. 11 684 795 910, Germany) kullanıldı. Boyama öncesi taze hazırlanan preparatlar %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile tespit edildi.

3.4.2. %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu hazırlanması (100 ml)

1. Çeker ocakta 4,0 gram toz paraformaldehit tartılarak cam şişe içerisine konuldu.
2. Cam mezür ile 100 ml PBS ölçüldü ve kapaklı cam şişe içerisine konuldu.
3. Hazırlanan solüsyon içerisine 100 µl 10 M NaOH eklendi. Hazırlanan solüsyon, manyetik bir karıştırıcı ile 60°C'de çözülünceye dek karıştırıldı.
4. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. pH'sı 7,4 olarak ayarlandı. +40°C'de saklandı.

3.4.3. %0,1 Triton X-100 ile permeabilizasyon solüsyonu hazırlanması

1. Öncelikle 10 kat distile su ile seyreltilen %0,1'lik sodyum sitrat solüsyonu hazırlandı.
2. %0,1'lik Triton X-100 ve seyreltilmiş sodyum sitrat buffer ile karıştırılarak permeabilizasyon solüsyonu hazırlandı.

3.4.4. TUNEL karışım solüsyonu

Vial 1 (enzim solüsyonu) solüsyonundan 50 µl ve vial 2 (label solüsyonu) solüsyonundan ise 450 µl alınarak TUNEL karışım solüsyonu hazırlandı. Her bir örneğe ise 50 µl olacak şekilde damlatıldı.

3.4.5. Floresan boyama basamakları

1. Fiksasyon için yayma preparatları %4'lük paraformaldehit (pH: 7,4) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
2. PBS ile üç kez yıkandı. Pap-Pen kalem ile her bir preparat işaretlendi.
3. Permeabilizasyon solüsyonu (%0,1 Triton X-100) ile 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
4. PBS ile üç kez yıkandı.
5. 50 µl kadar TUNEL karışım solüsyonundan damlatıldı. Sonrasında işaretli alanların üzeri parafilm ile kapatıldı ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
6. Örnekler PBS ile üç kez yıkandı.
7. Örnekler floresan mikroskopunda 450-500 nm ve 515-565 nm yeşil dalga boyu ışığında incelenerek sayımı yapıldı.

3.4.6. TUNEL Floresan boyama yöntemi ile DNA fragmentasyonunun incelenmesi

Sperm örnekleri x20'lik objektif büyültmesinde incelendi. Normal hücre başına sahip spermier soluk yeşil floresan boyanırken apoptotik hücre başına sahip spermier parlak yeşil floresan boyama gösterdi. Yeşil floresan boyanmış spermier TUNEL pozitif (+) olarak tanımlandı. Sperm oranı hesaplanırken her bir örnekten 200 tane sperm değerlendirildi. TUNEL (+) boyanan spermier DNA fragmentasyonlu olarak tanımlandı. Boyanma sonrası değerlendirme Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi biriminde yapıldı.

3.5. Sperm analizi (Spermiyogram)

Semen analizi için, PBS içerisindeki kauda epididimden tiftikleme yöntemi ile açığa çıkarılan spermeler, Makler sperm sayma kamerası (Makler counting chamber sefi- medical instruments) ile ışık mikroskopunda x20 büyütmede sayıldı.

Semen analizinde sayı ve hareketlilik parametreleri incelendi. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kriterlerine göre;

- a) İleri Hızlı hareketli
- b) İleri Yavaş hareketli
- c) Yerinde hareketli
- d) Hareketsiz

olarak sınıflandı.

3.6. Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi için, anestezi altındaki ratların kalbinden kan örnekleri alındı. Sonrasında kalp kesilerek sakrifikasyon gerçekleştirildi. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı 5 ml'lik jelli vakumlu serum ayırıcı tüpleri içerisine konularak 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar, ependorf tüplere alınarak çalışılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi. Biyokimyasal analizlerin yapılacağı gün kan örnekleri kademeli olarak çözdürüldükten sonra serum örneklerinde; Testosteron (T) (Elabscience, Catalog no: E-EL-0072), ve oksidatif stres parametresi olan malondialdehit (MDA) (TBARS (MDA) ELISA KIT, Cayman, Catalog no: 10009055) düzeylerine bakıldı. Bu parametrelerin analizinde 'Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi' (ELISA) yöntemi ve thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) metodu kullanıldı. Analizlerde kullanılan kitler, üretici firmaların belirttiği prosedüre uygun olarak kullanıldılar.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS (IBM Statistics for Windows, Version 21.0) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Tüm gruplar arasındaki non-parametrik verilerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ kabul edilerek değerlendirildi.

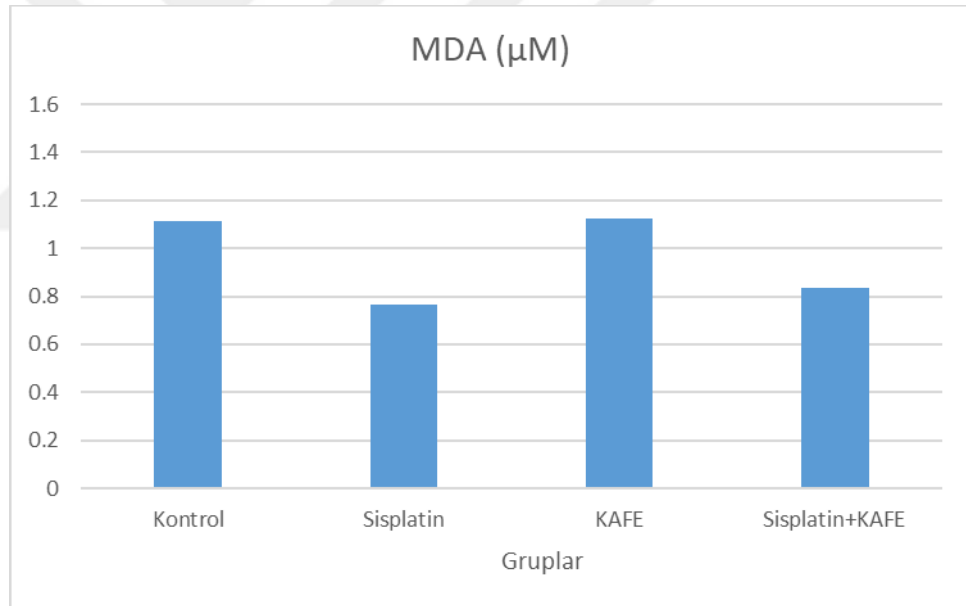
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular:

Deney gruplarında serum MDA ve testosteron düzeyleri ELİSA yöntemi ile belirlenmiş olup, elde edilen bulgular aşağıdaki Tablo 4.1, Tablo 4.2, Grafik 4.1 ve Grafik 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Grupların Serum MDA değerleri.

Gruplar	Ortalama	±SD	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	1,23262	0,713521	1,11500	0,100	2,099
Sisplatin	5,25429	11,520078	0,76500	0,631	31,371
KAFE	2,37250	3,731073	1,12500	0,631	11,593
Sisplatin+KAFE	0,88580	0,103929	0,83700	0,765	0,995



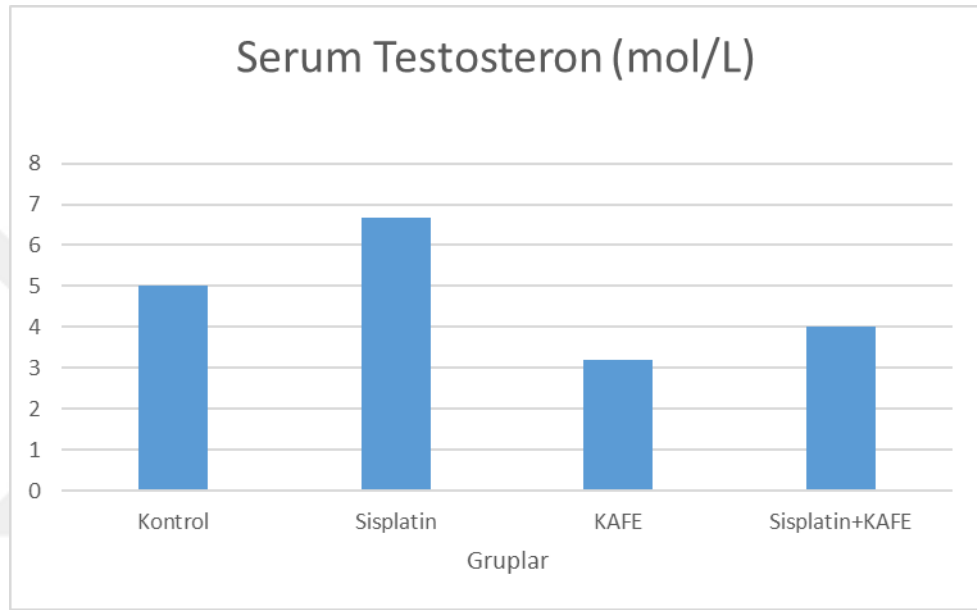
Grafik 4.1. Grupların serum MDA değerleri.

MDA değerlerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. (p=0.523).

Tablo 4.2. Grupların serum testosteron değerleri

Serum Testosteron (mol/L)

Gruplar	Ortalama	±SD	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	10,9638	12,09213	5,0100	1,69	34,95
Sisplatin	5,0286	3,56128	6,6800	0,54	8,54
KAFE	3,5213	2,00293	3,1900	1,19	6,18
Sisplatin+KAFE	3,8400	3,25176	4,0000	0,48	8,43



Grafik 4.2. Grupların serum testosteron değerleri.

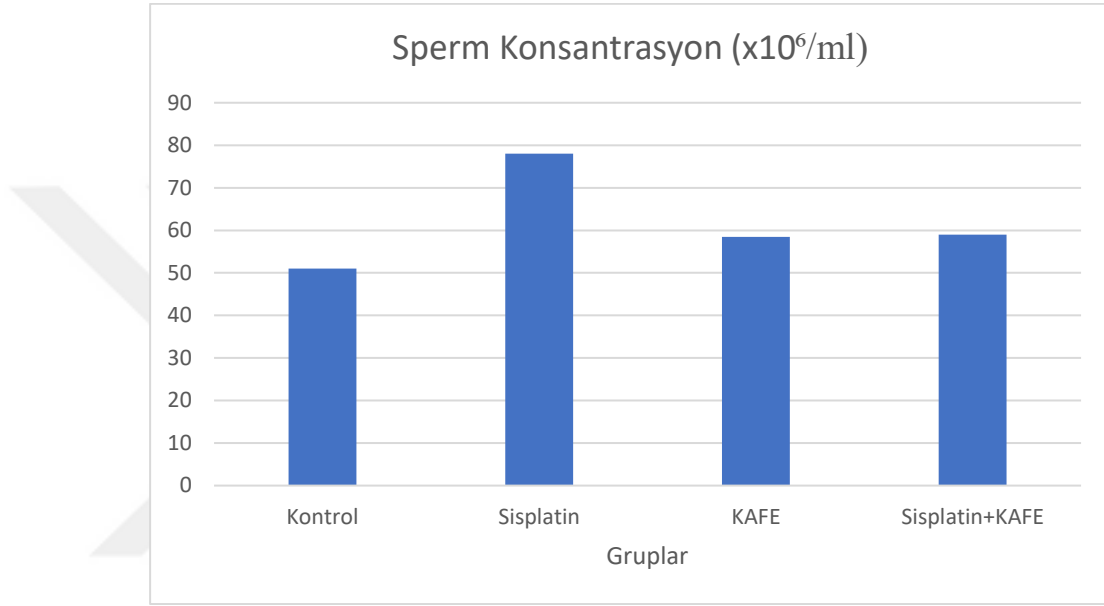
Testosteron değerlerine göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı(p=0.556).

4.2. Spermiyogram bulguları:

Kauda epididimisten elde edilen sperm örneklerinin sayımı yapılarak grupların sperm konsantrasyonları ve toplam motil sperm yüzdeleri aşağıdaki Tablo 4.3., Tablo4.4. ve Grafik 4.3., Grafik 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Grupların sperm konsantrasyon değerleri

Gruplar	Ortalama	±SD	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	52.2500	11.88937	51.0000	38.00	70.00
Sisplatin	70.0000	14.87728	78.0000	49.00	87.00
KAFE	62.3750	10.92752	58.5000	48.00	79.00
Sisplatin+KAFE	53.8000	23.46700	47.0000	31.00	82.00

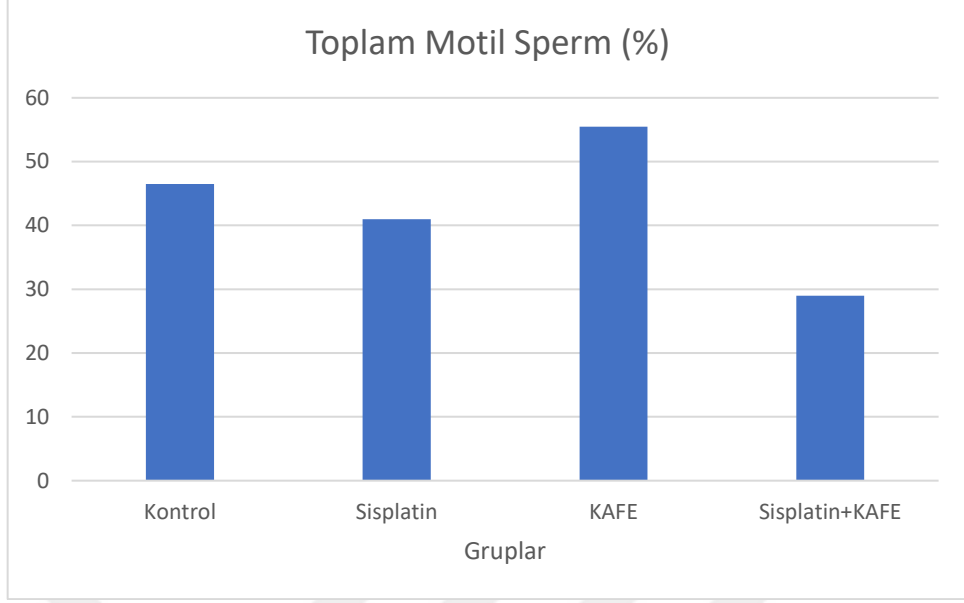


Grafik 4.3. Grupların sperm konsantrasyon değerleri.

İstatistiksel olarak gruplar arasında sperm konsantrasyon değerlerine bakıldığında anlamlı bir fark bulunamadı ($p= 0.135$).

Tablo 4.4. Grupların toplam motil sperm yüzde değerleri

Gruplar	Ortalama	±SD	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	47.1250	11.40723	46.5000	34.00	66.00
Sisplatin	35.8571	13.20894	41.0000	20.00	54.00
KAFE	54.7500	10.68711	55.5000	31.00	66.00
Sisplatin+KAFE	32.2000	28.80451	17.0000	7.00	64.00



Grafik 4.4. Grupların toplam motil sperm yüzde değerleri

Toplam hareketli sperm yüzdelere baktığımızda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.095$) ancak KAFE grubundaki toplam motil sperm yüzdesi, Sisplatin+KAFE ve Sisplatin gruplarına kıyasla minimal bir artış göstermiştir.

4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Hemotoksilen ve Eozin boyası:

Kontrol grubuna ait testis dokularında X20 büyütmede histopatolojik bir değişiklik gözlenmedi. Seminifer Tübüllerde çekirdeği açık tip A ile koyu tip A spermatogonyumlar, adluminal kompartmandaki primer spermatozoidler, luminal kompartmandaki spermatid ve bileşenleri ile bazal laminadan lümeneye kadar uzanan sertoli hücrelerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi. Ayrıca intersitisyel alanda bulunan miyoepitelyal hücreler, Leydig hücreleri ve hücreler arası bağ dokusunun da normal histolojik yapıya sahip oldukları tespit edildi Aynı şekilde KAFE grubunun testis dokularında da yapısal bir bozukluk yoktu. Sisplatin grubuna ait testis dokularında ise X20 büyütmede intertübüler alanlarda konjesyon, ödem, seminifer tübül yapılarında bozukluk, vakuolizasyon, bağ dokuda ve interstisyel alanda hiyalinizasyon, germinal epitellerde düzensizlik ve lümenlerinde hücre döküntüleri mevcuttu. Sisplatin + KAFE grubundaki yapısal bozukluklar ve konjesyon, Sisplatin grubuna göre minimal seviyelerdeydi.



Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait sağlıklı testis dokusu görüntüsü. Lümen (ok ucu). Primer spermatozoid (çizgi ok). Sertoli hücresi (çentikli ok). Spermatozoid (eğri ok). Hemotoksilen-eozin boyaması, x20.



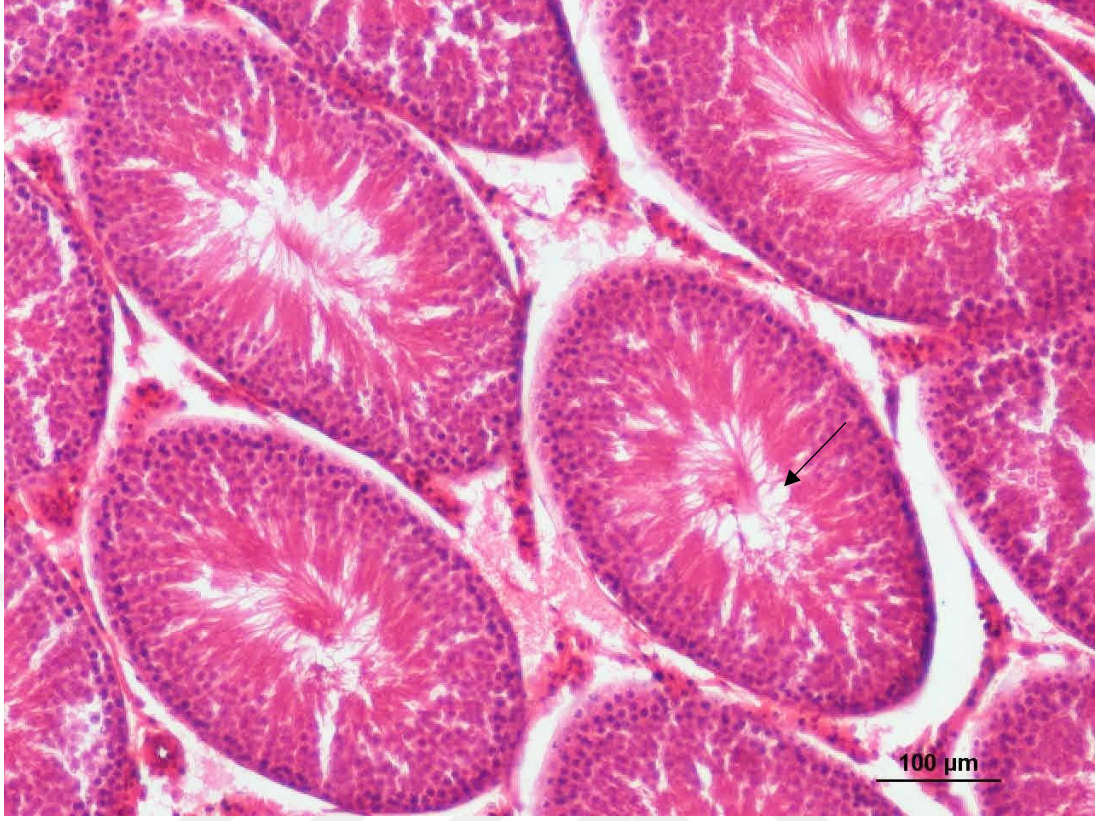
Şekil 4.2. KAFE grubuna ait sağlıklı testis dokusu görüntüsü. Lümen (ok ucu). Primer spermatosit (çizgi ok). Sertoli hücresi (çentikli ok). Spermatogonyum (eğri ok). Hemotoksilen-eozin boyaması, x20.



Şekil 4.3. Sisplatin grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, seminifer tübülde vakuolizasyon (çizgi ok), lümende hyalinizasyon oluşumu (çentikli ok), İnterstisiyal alanda hiyalizasyon oluşumu (ok ucu), Hemotoksilen-eozin boyaması, x10



Şekil 4.4. Sisplatin grubuna ait hemotoksilen-eosin boyaması, vakuolizasyon (çizgi ok), x20.



Şekil 4.5. Sisplatin+KAFE grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması. Lümen (çizgi ok), x10.



Şekil 4.6. Sisplatin+KAFE grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, x20.

4.3.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyası:

Sisplatinin testis, bazal membranı gibi yapılarda oluşturduğu hasarı ve koruyucu ajanların bu yapıları ne kadar koruyabildiğini tesbit etmek amacıyla Periyodik Asit Schiff boyası kullanıldı. Dokularda PAS boyaması gözlenmesine rağmen, boyamalarda gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmedi

4.3.3. Asidik Anilin Mavisi Boyası:

Sperm kromatin kondensasyonu hasarını gözlemleyebilmek için ışık mikroskopik olarak asidik anilin mavisi kullanıldı. Asidik Anilin Mavisi ile yapılan boyama, prosedüre uygun olarak uygulandı fakat herhangi bir sonuç alınamadı.

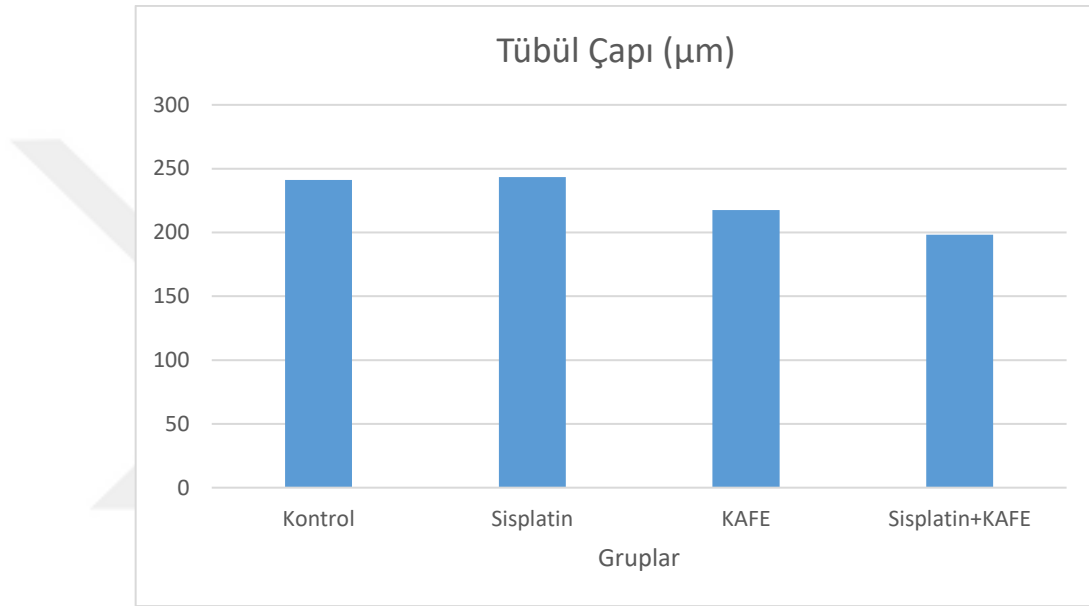
4.4. Seminifer Tübül Çapı ve Johnsen Skoruması Bulguları:

Her grup için tübül çapı ölçümü ve Johnsen skorlaması yapılmıştır. Elde edilen veriler aşağıdaki Tablo 4.5 Tablo 4.6 Grafik 4.5 ve Grafik 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Grupların tübül çapı değerleri

Tübül Çapı (μm)

Gruplar	Ortalama	$\pm\text{SD}$	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	238.5312	98.87547	241.4100	103.57	380.93
Sisplatin	236.1600	85.15778	243.5000	110.39	358.72
KAFE	233.9325	97.13664	217.4950	124.48	378.76
Sisplatin+KAFE	197.4760	66.38693	198.1300	112.84	280.51



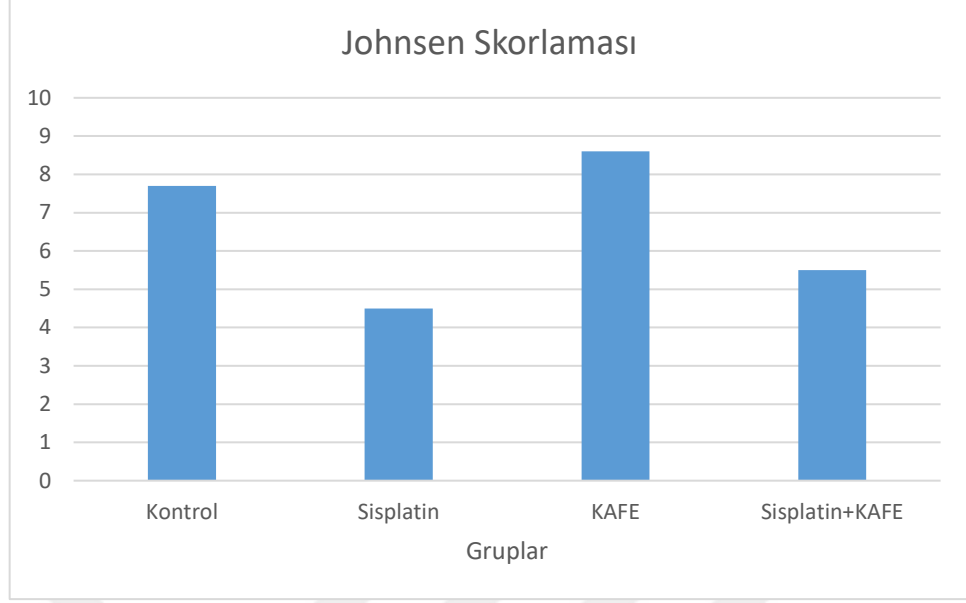
Grafik 4.5 Grupların tübül çapı değerleri

Tübül çapı değerlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamadı ($p=0.872$).

Tablo 4.6. Grupların Johnsen Skoru değerleri

Johnsen Skorlaması

Gruplar	Ortalama	$\pm\text{SD}$	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	7.7375	0.58294	7.7000	7.00	8.50
Sisplatin	4.3714	0.73647	4.5000	3.50	5.70
KAFE	8.5125	0.59387	8.6000	7.70	9.50
Sisplatin+KAFE	5.5800	0.79812	5.5000	4.70	6.70



Grafik 4.6. Grupların Johnsen Skoru değerleri

Johnsen skoruması yapılarak elde edilen verilere göre, Sisplatin ve Kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.011$). Sisplatin ve KAFE grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.000$). Ayrıca Sisplatin ile Sisplatin+KAFE grupları arasında da anlamlı fark olduğu sonucuna ulaşıldı ($p=0.017$). Kontrol ve KAFE gruplarına kıyasla Sisplatin grubunun Johnsen skorlarındaki azalma, kemoterapi sırasında seminifer tübüllerin yapısını bozduğunugstermiştir. Aynı zamanda Sisplatin+KAFE grubuna kıyasla Sisplatin grubunun Johnsen skorundaki azalma, tedavinin seminifer tübüllerdeki hasarı engelleyebildiğini göstermiştir.

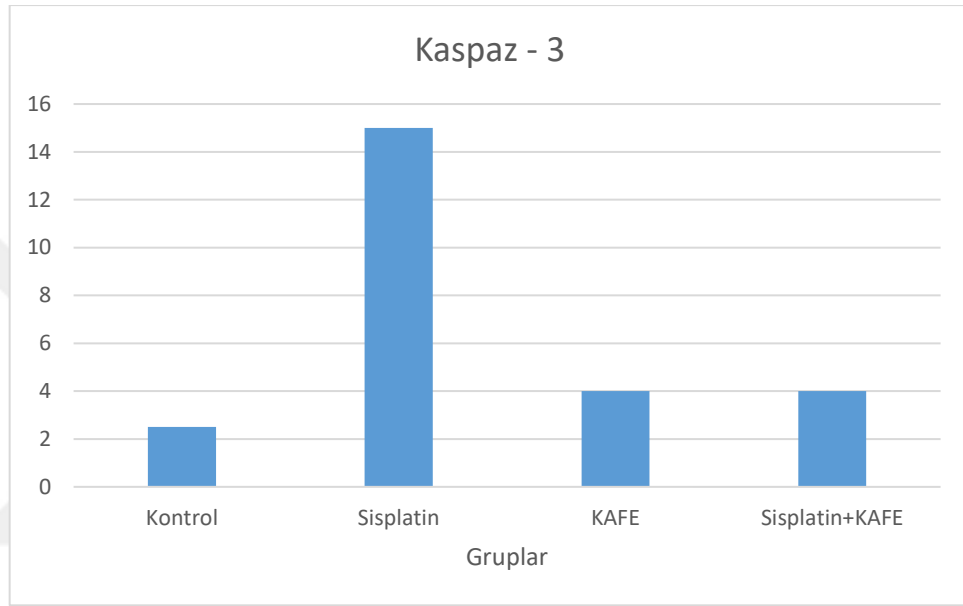
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Kaspaz 3 immün işaretleme:

Testis dokusunda apoptoza uğrayan hücreleri gözlemlemek için Kaspaz-9 immün işaretleme yapılmıştır. İşaretlenen apoptotik hücrelerin sayımı yapılarak, el edilen veriler aşağıdaki Tablo 4.7. ve Grafik 4.7. de gösterilmiştir.

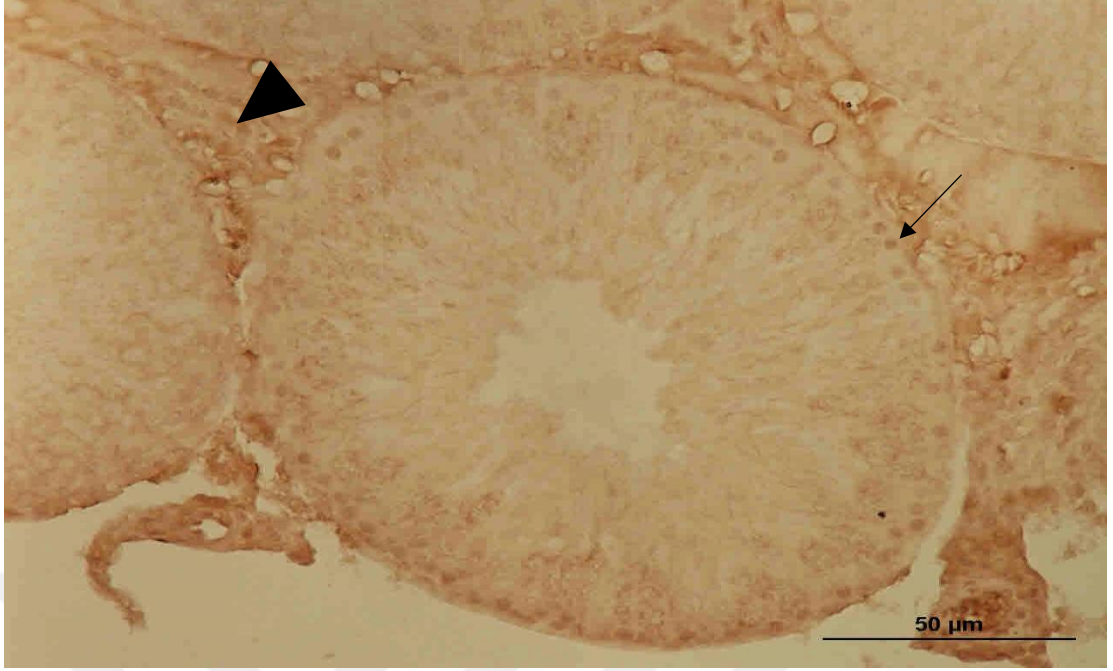
Tablo 4.7. Grupların Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Kaspaz-3					
Gruplar	Ortalama	±SD	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	3.6250	2.97309	2.5000	.00	8.00
Sisplatin	15.2857	1.79947	15.000	13.00	18.00
KAFE	3.7500	1.83225	4.0000	1.00	7.00
Sisplatin+KAFE	3.8000	1.30384	4.0000	2.00	5.00

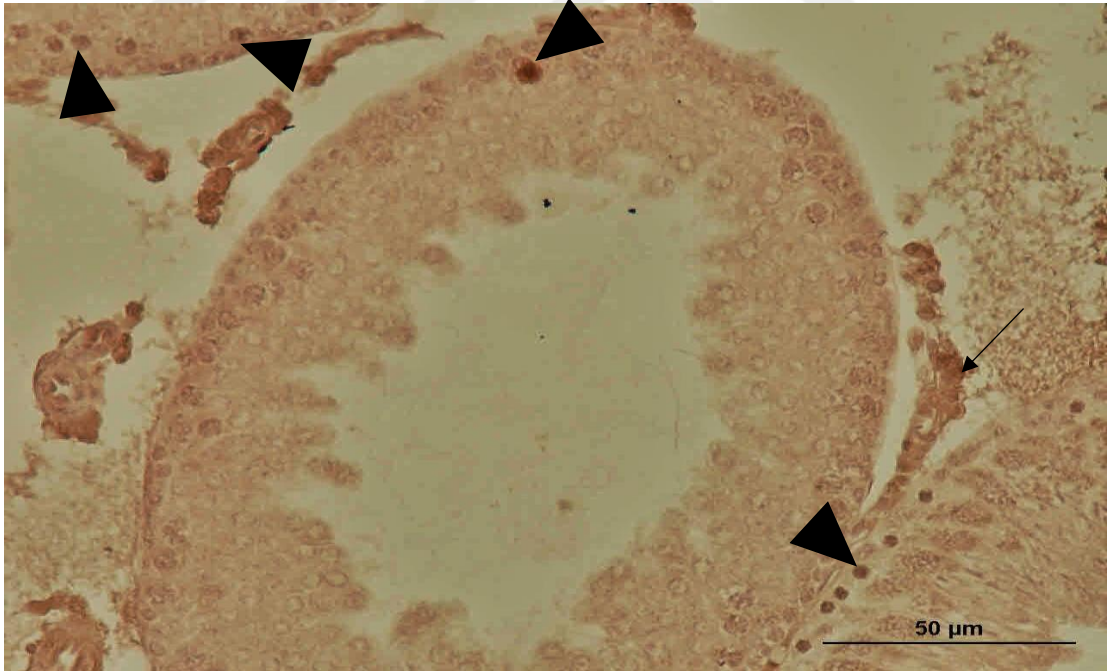


Grafik 4.7. Grupların Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

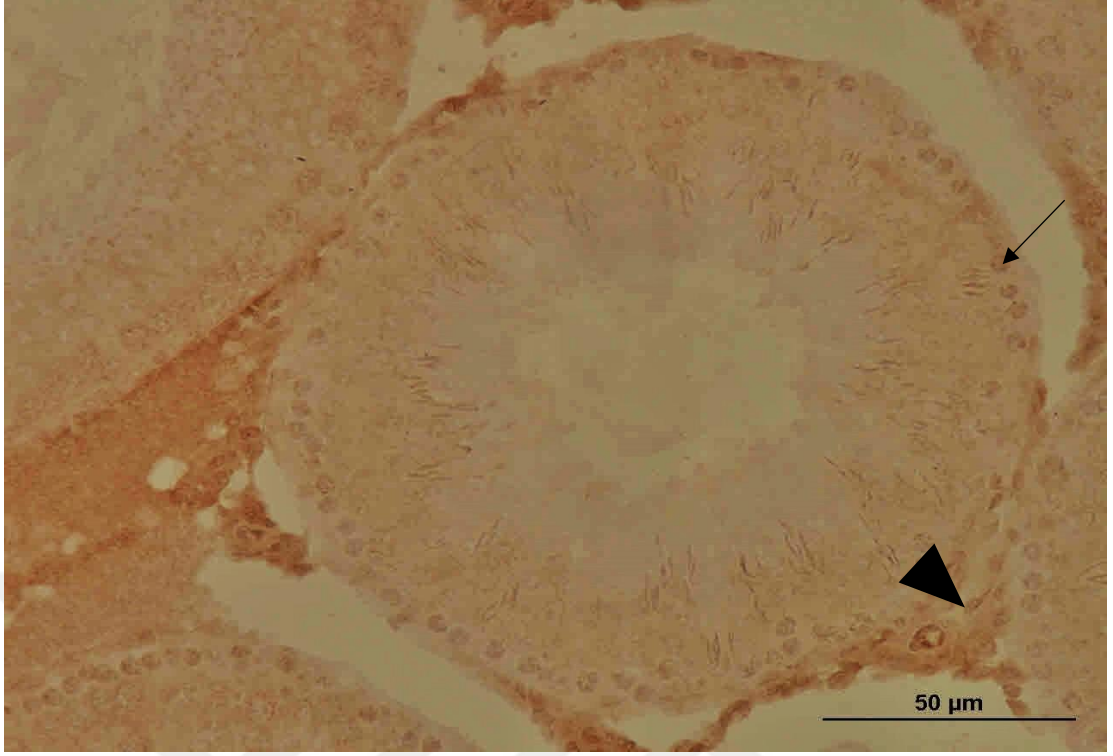
Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları değerlerine göre Kontrol ile Sisplatin grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.003$). Sisplatin grubunda, boyanan hücre sayısının artış göstermesi, Sisplatin ile oluşturulan toksisitesinin apoptozu indüklediği anlaşılmıştır. Aynı zamanda Sisplatin grubu ile KAFE grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.007$). KAFE grubunda Sisplatin grubuna kıyasla apoptoza daha az rastlandığı görülmüştür. Sisplatin grubu ile Sisplatin+KAFE grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.036$) Sisplatin+KAFE grubunda boyanan hücre sayısındaki azalma, KAFE'in, Sisplatin alımı sırasında apoptozu engellediği anlaşılmıştır.



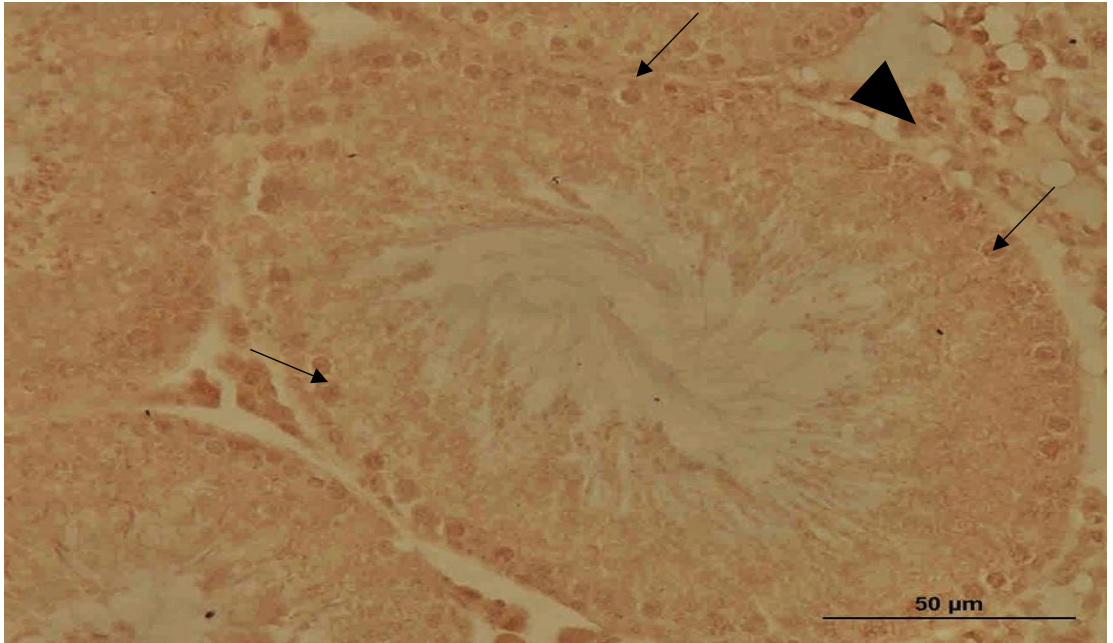
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait sağlıklı testis dokusu görüntüsü. Germinal epitel hücrelerinin (çizgi ok) ve Leydig hücrelerinin (ok ucu) immün negatif olduğu izlenmekte, Kaspaz-3 immün işaretleme, x20.



Şekil 4.8. Sisplatin grubuna ait testis dokusunda, germinal epitel hücrelerinin (ok ucu) ve Leydig hücrelerinin (çizgi ok) immün pozitif olduğu gözlenmekte, Kaspaz-3 immün işaretleme, x20.



Şekil 4.9. KAFE grubuna ait testis dokusu görüntüsü. Germinal epitel hücrelerinin (çizgi ok) ve Leydig hücrelerinin (ok ucu) immün negatif olduğu izlenmekte, Kaspaz-3 immün işaretleme, x20.



Şekil 4.10. Sisplatin+KAFE grubuna ait testis dokusu görüntüsü. Spermatogonyumlarda az miktarda Kaspaz-3 ekspresyonu gözlenmekte (çizgi ok). Leydig hücrelerinin (ok ucu) immün negatif olduğu gözlenmekte, x20.

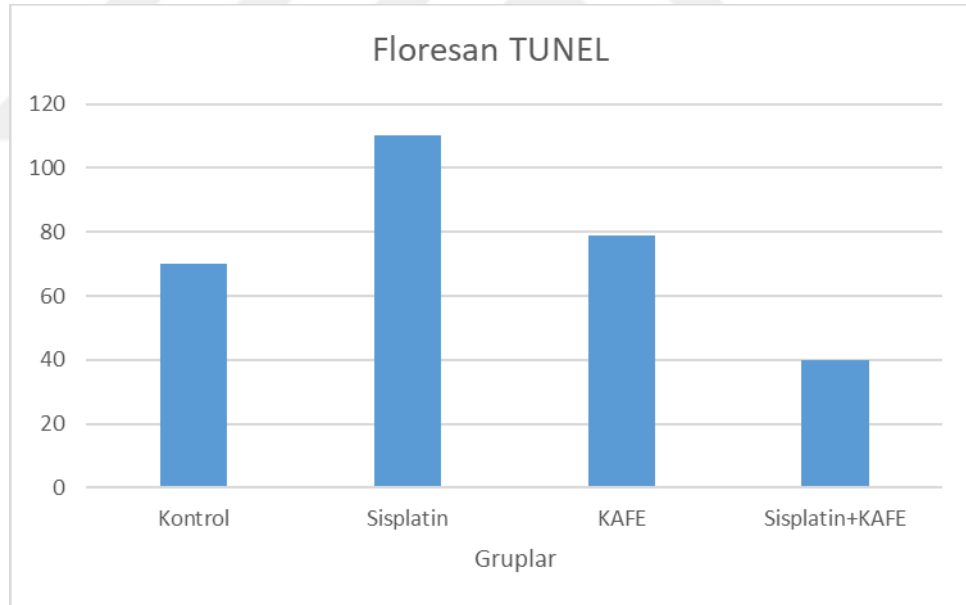
4.6. Floresan Mikroskopik Bulgular

4.6.1. Floresan TUNEL boyaması ile sperm DNA fragmentasyonu

Apoptozu değerlendirmek için TUNEL boyaması ile yüksek yeşil floresan ışığa gösteren sperm başları pozitif (+) olarak değerlendirildi (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18). Kontrol, Sisplatin, KAFE ve Sisplatin+KAFE grupları için ayrı ayrı pozitif apoptotik hücre boyanma yüzdeleri hesaplandı (Tablo 4.10).

Tablo 4.8. Grupların Floresan TUNEL ile pozitif boyanan hücre sayıları

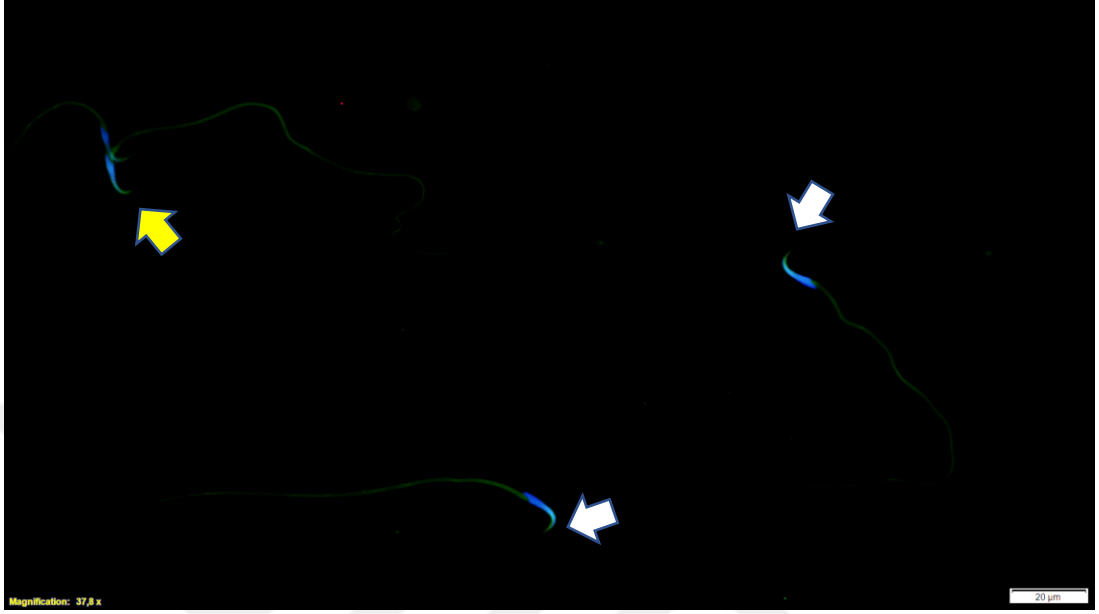
Floresan TUNEL					
Gruplar	Ortalama	±SD	Medyan	Minimum	Maximum
Kontrol	71.000	11.747	70.000	54.00	88.000
Sisplatin	112.85	20.161	110.00	88.00	150.00
KAFE	75.750	20.380	79.000	40.00	102.00
Sisplatin+KAFE	54.800	37.272	40.000	18.00	108.00



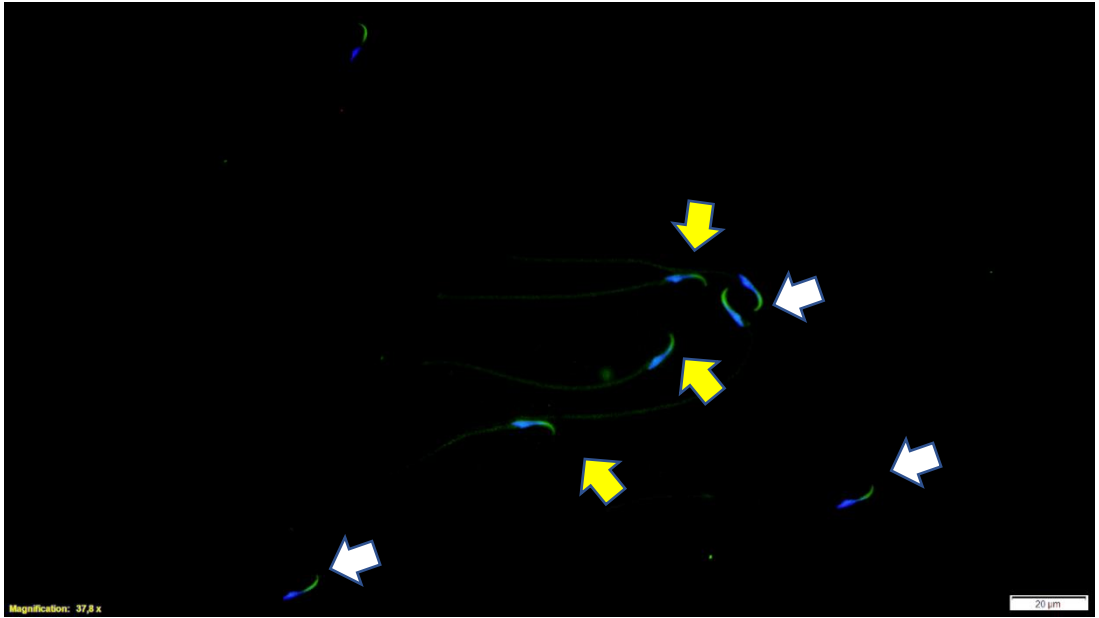
Grafik4.8. Grupların Floresan TUNEL ile pozitif boyanan hücre sayıları

Kontrol, Sisplatin, KAFE ve Sisplatin+KAFE grubu apoptotik sperm yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında, Sisplatin grubu ile Sisplatin+KAFE grubu arasında anlamlı fark olduğu ($p=0.010$), aynı zamanda Kontrol grubu ile Sisplatin grubu arasında da anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.012$). Bununla beraber en yüksek

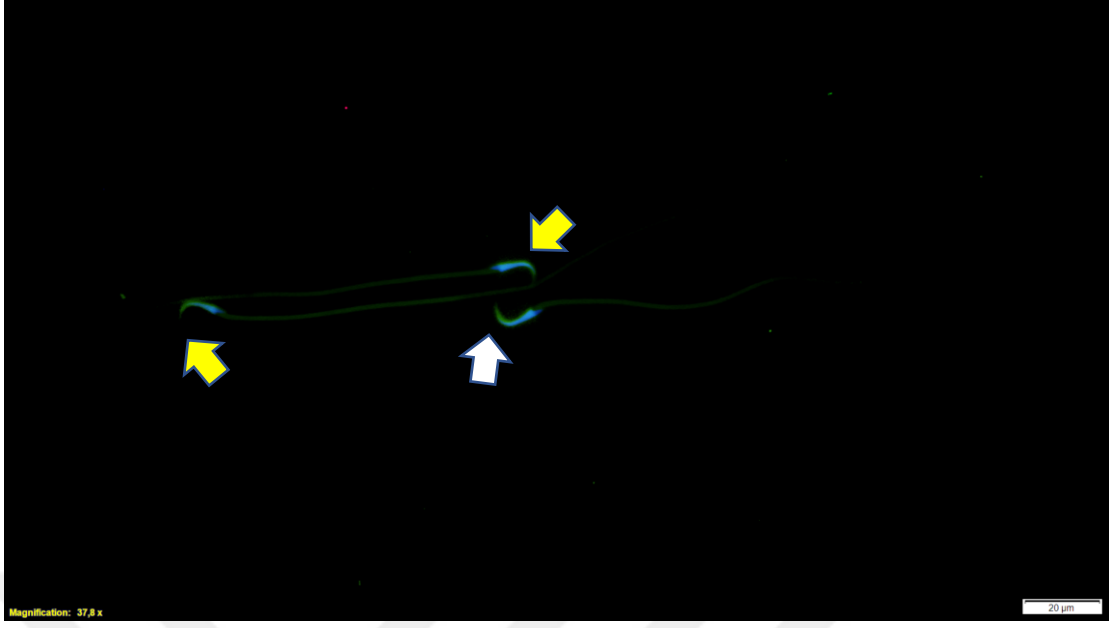
apoptotik sperm ortalamasının %112,85 ile Sisplatin grubunda, en düşük ise %54,80 ile Sisplatin+KAFE grubunda olduğu bulunmuştur.



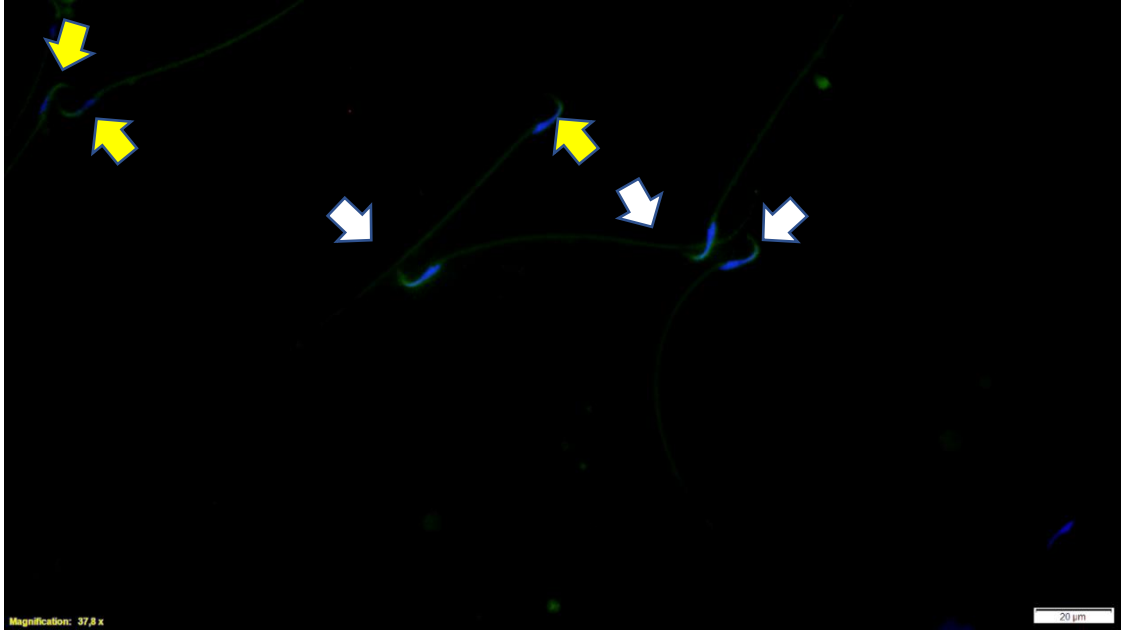
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermeler (beyaz ok) ve negatif (-) boyanan spermeler (sarı ok) görülmektedir, x60.



Şekil 4.12. Sisplatin grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermeler (beyaz ok) ve negatif (-) boyanan spermeler (sarı ok) görülmektedir, x60.



Şekil 4.13. KAFE grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermeler (beyaz ok) ve negatif (-) boyanan spermeler (sarı ok) görülmektedir, x60.



Şekil 4.14. Sisplatin+KAFE grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermeler (beyaz ok) ve negatif (-) boyanan spermeler (sarı ok) görülmektedir, x60.

5. TARTIŞMA

Günümüzde kanserin erken teşhisi ve kanser tedavisi ile ilgili çalışmalar önemli ölçüde artmıştır. Kanser vakalarında erken tanı ve kanser tedavi protokolleri geliştirilmesi ile genç kanser hastalarının %75'inden daha fazlası günümüzde uzun yaşam süresine sahip olmaktadır. Bununla birlikte kemoterapi ve radyoterapi sonrası, bu ajanların özellikle çoğalmakta olan hücreleri etkilemesinden dolayı infertilite sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle üreme sağlığının korunması kanser hastalarında çözülmesi gereken önemli bir problem haline gelmiştir. Bu sebeple, pek çok araştırmacı klinik kullanımı yaygın olan kemoterapötik ajanları infertilite oluşturma riskine göre yüksek riskli, orta riskli ve düşük riskli olarak sınıflara ayırmışlardır. Çeşitli kanserlerin tedavisinde yer alan Sisplatin bazı çalışmalarda yüksek riskli kemoterapötik ajan olarak belirtilmiştir (68-70).

Sisplatin solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan, hücrenin biyokimyasal sürecini değiştiren, doğrudan veya dolaylı olarak hücrenin proliferasyonunu bloke eden, genellikle normal hücrelere zarar vermeden anormal hücreleri yok etmek, tümör gelişimini inhibe etmek ya da ağrı/obstrüksiyon gibi belirtileri kontrol altına almak amacıyla kanserin tedavisinde kullanılan önemli bir antineoplastik ajandır. Sisplatin'in, DNA çapraz bağlarına etki ederek tümör hücrelerinde ve mitotik aktivitesi yüksek olan hücrelerde sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (42,51,53,71). Testislerde mitotik aktivite yüksektir. Bu yüzden Sisplatin'in neden olduğu sitotoksik etkinin yüksek olması beklenmektedir.

KAFE'in anti-inflamatuar, anti-oksidatif stres, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikleri Murtaza G. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bildirilmiştir (72). Çalışmamızda Sisplatin'in testis dokusu üzerindeki sitotoksik etkilerinin gösterilmesi, etki mekanizmalarının açıklanması ve KAFE'in koruyucu etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm gruplara ait testis kesitleri ilk olarak H&E ile boyanmış ve histopatolojik olarak gözlemlenmiştir. Hemotoksilen & Eozin boyamasından elde ettiğimiz bulgular Sisplatin grubunda hasarın kontrole oranla en fazla olduğu şekildeydi. Kontrol grubuna ait testis dokularında histopatolojik bir değişiklik gözlenmezken, Sisplatin grubuna ait testis dokularında ise intertübüler alanlarda konjesyon, kalınlaşma, ödem, seminifer tübül yapılarında bozukluk, vakuolizasyon,

bağ dokuda ve interstisyel alanda hiyalinizasyon, germinal epitellerde düzensizlik ve lümenlerinde hücre döküntüleri mevcuttu. Diğer yandan KAFE grubunun testis dokularında da kontrol grubuna benzer olarak yapısal bir bozukluk yoktu. Tedavi (Sisplatin + KAFE) grubundaki yapısal bozukluklar ve konjesyon, Sisplatin grubuna göre minimal seviyelerdeydi. Bu bağlamda Peltola ve arkadaşları Sisplatin'in; hipoksiye yol açarak, serbestradikal üretimini artırdığını, inflamasyonu ve apoptozisi tetikleyerek hücrelerde hasara neden olduğunu ileri sürmüşler (52); yine Mohammadnejad ve arkadaşları yaptığı çalışmalarda Sisplatinin testis üzerine olan toksik etkilerini; atrofik seminifer tübül, germinal epitelde hasar (apoptozis ve nekrozis), bazal lamina ile spermatogoniyumlar arasında bağlantı kayıpları, peritübüler alanda inflamasyon ve hasar olarak özetlemişlerdir (19). Bu iki literatürle eşleşmeyen bulgumuz, bazal lamina ile spermatogoniyumlar arasında bağlantı kayıplarının tespit edilmemesidir.

Diğer bir aşamada kesitlerimizi, Sisplatinin akrozom ve testis bazal membranı gibiyapılarda oluşturduğu hasarı ve KAFE'in bu yapıları ne kadar koruyabildiğinin tespiti için PAS ile boyadık. Sakr ve arkadaşları çalışmalarında Sisplatin uygulanmış sıçanların seminifer tübülerinin bazal laminalarının ve interstisyel alanlarının güçlü PAS pozitif boyandığını bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda, PAS boyamasında gruplar arasında herhangi bir fark gözlemleyemedik. Daha sonra, sperm kromatin kondensasyon hasarını gözlemleyebilmek için ışık mikroskopik olarak asidik anilin mavisi kullandık. Daha önce yapılan çalışmalarda, Anilin mavisi boyamasının sonuçlarından elde edilen bilgiler, kemoterapi sonrası aşırı histonlu sperm varlığında anlamlı bir artış olduğu yönündedir (73). Biz Asidik Anilin Mavisi ile yapılan boyamada, uygulanan rutin prosedüre rağmen herhangi bir sonuca ulaşamadık.

Bir sonraki aşamada da Sisplatin'in germinal epitel ve leydig hücreleri gibi yapılarda oluşturduğu apoptozisi ve KAFE'in bu yapıları ne derece koruyabildiğinin tespiti için apoptozisin indüklenmesindeki geri dönüşümsüz basamağı olan Kaspaz-3 kaskatını boyadık. Sisplatin'in ERK yolu aracılığı ile Kaspaz-3'ü aktive ettiğini raporlayan Ravindra ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak (74) çalışmamızda Sisplatin grubunda Kaspaz-3 pozitif hücre sayısının sağlıklı gruptaki hücrelere kıyasla anlamlı olarak arttığını saptadık (Grafik 4.7, $P<0,05$). Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları değerlerine göre Kontrol ile Sisplatin grupları arasında anlamlı

bir fark saptadık ($p=0.003$). Sisplatin grubunda, boyanan hücre sayısının artış göstermesi, Sisplatin ile oluşturulan toksisitesinin apoptozu indüklediği anlaşılmıştır. Aynı zamanda Sisplatin grubu ile KAFE grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.007$). KAFE grubunda Sisplatin grubuna kıyasla apoptoza daha az rastlandığı görülmüştür. Sisplatin grubu ile Sisplatin+KAFE grubu arasında da anlamlı bir tespit ettik ($p=0.036$). Sisplatin+KAFE grubunda boyanan hücre sayısındaki azalma, KAFE'in, Sisplatin alımı sırasında apoptozu engellediğini göstermiştir. Mercantepe ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamıza benzer olarak Sisplatin+KAFE grubunda Kaspaz-3 pozitif hücre sayılarının Sisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (75). Sonuç olarak çalışmamızda, KAFE'in Kaspaz-3 aktivasyonuna engel olarak testis dokusuna ve spermatogeneze kısmi koruma sağladığını gözlemledik.

Diğer bir aşamada, Sperm DNA bütünlüğü ve erkek fertilité potansiyelini gösteren önemli bir parametre olan floresan TUNEL metodunu uyguladık. DNA hasarının, anormal sperm morfolojisi ve düşük hareketlilikle ilişkili olduğu bildirilmektedir (76). Düşük sperm motilitesi olan hastaların semeninde çok sayıda anormal sperm bulunmasına neden olan DNA fragmentasyonu spermin fertilizasyon yeteneğini ve embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilemekle beraber genetik defekt riskini de artırmaktadır (77,78).

Çalışmamızda floresan TUNEL yöntemi ile sperm DNA bütünlüğü değerlendirilmiş, istatistiksel anlamda elde edilen sonuçlara göre Sisplatin grubunda, DNA bütünlüğü bozuk olan spermilerin en yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir.

Sperm hareketliliği üzerine yapılan çalışmalarda; anormal sperm hücrelerinin DNA bütünlüğünün bozulmasında, kromatin kondensasyon defektlerinin, apoptozun ve yüksek ROS üretiminin etkisi olabileceği bildirilmiştir (79,80). Çalışma sonuçlarımız yapılan çalışmalarla ve floresan Tunel sonuçlarımız ile uyumlu olmayıp; örneklem sayısının azlığı gibi çeşitli nedenlere bağlı olduğunu düşündüğümüz, gruplardaki toplam motil sperm sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak KAFE grubundaki toplam motil sperm yüzdesi, Sisplatin+KAFE ve Sisplatin gruplarına kıyasla minimal bir artış göstermiştir. Yine konsantrasyon açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Johnsen testiküler biyopsi skoru (JTBS) ile seminifer tübüllerdeki germinal epitelin değerlendirildiği sonuçlara göre kontrol ve KAFE alan gruplar birbirlerine yakın sonuçlar gösterdiler. Sisplatin ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulundu. Sisplatin ve KAFE grubu arasında da anlamlı bir fark vardı. Ayrıca Sisplatin ile tedavi grupları arasında da anlamlı fark olduğu sonucuna ulaşıldı. Kontrol ve KAFE gruplarına kıyasla Sisplatin grubunun Johnsen skorlarındaki azalma, kemoterapi sırasında seminifer tübüllerin yapısını bozduğunu göstermiştir. Aynı zamanda Tedavi grubuna kıyasla Sisplatin grubunun Johnsen skorundaki azalma, tedavinin seminifer tübüllerdeki hasarı engelleyebildiğini göstermiştir. Fakat diğer bir yandan Seminifer tübül çapları (MSTD) ölçüm sonuçları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Karimi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da Sisplatinin ile indüklenmiş testis hasarında bizim çalışmamızla uyumlu olarak Johnsen skorunda Sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı fark mevcuttu (81).

Organizmada pek çok ROS oluşabilir. Ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehid (MDA) (82). Son in vivo çalışmalar, KAFE'in ROS ve MDA oluşumunu önlediğini bildirmektedir (83). Erboğa ve arkadaşları Kadmiyum kaynaklı testis toksisitesinde KAFE'in MDA seviyelerini anlamlı olarak azalttığını rapor etmişlerdir (84). Son aşamada biyokimyasal olarak MDA ve serum testosteron analiz sonuçlarına bakıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamız biyokimyasal olarak çıkardığımız sonuçlara göre, Sisplatin ile indüklenen testis hasarında antioksidan aktivitesini belirleme açısından yetersiz kalmıştır. Diğer bir yandan, interstisyel bağ dokusunda erkeklerdeki ikinci cinsiyet özelliklerinden sorumlu hormon olan testosteronu üreten Leydig hücreleri yer alır. Yine çalışmamızın biyokimyasal sonuçlarına göre gruplar arasında serum testosteron seviyeleri bakımından anlamlı bir sonuca ulaşamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda toplamda 40 wistar albino rat kullanılmış, kontrol, Sisplatin, KAFE ve Sisplatin+KAFE olarak ayrılan gruplar arasında biyokimyasal olarak MDA, serum testosteron ve sperm örnekleri ışık mikroskopik olarak Anilin Mavisi, Floresan mikroskopik olarak TUNEL boyaması kullanılarak incelenmiştir.

1. Sisplatin ile oluşturulan testis toksisite hasarında KAFE'in antioksidan rolü ile MDA seviyeleri bakımından anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Sisplatin ve KAFE'in oksidatif stres üzerine etkilerinin anlaşılabilmesi için KAFE tedavisinin uzatılması ile pozitif etkilerin görülebileceği düşünülmektedir
2. Gruplar arası serum testosteron değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. KAFE'in testosteron seviyeleri üzerinde etkisinin anlaşılabilmesi için ek çalışmalar yapılabilir. Yine KAFE tedavi süresinin uzatılarak pozitif sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir.
3. Testis toksisite hasarında Kaspaz-3 aktivasyonunda Kontrol grubu ile Sisplatin grubu kıyaslandığında anlamlı bir azalma bulundu. Sisplatin grubunda, boyanan hücre sayısının artış göstermesi, Sisplatin ile oluşturulan toksisitesinin apoptozu indüklediğini göstermiştir. Aynı zamanda Sisplatin grubu ile KAFE grubu kıyaslandığında anlamlı bir artış vardı. Bu da bize KAFE grubunda Sisplatin grubuna kıyasla apoptoza daha az rastlandığını göstermiştir. Sisplatin grubu ile Sisplatin+KAFE grubu kıyaslandığında da yine anlamlı bir artış vardı. Sisplatin+KAFE grubunda boyanan hücre sayısındaki azalma, KAFE'in, Sisplatin alımı sırasında apoptozu engellediğini göstermiştir. Bu sayede KAFE'in Sisplatin'in oluşturduğu testis toksisite hasarında anti-apoptotik etkisi anlaşmıştır.
4. Kontrol, Sisplatin, KAFE ve Sisplatin+KAFE grubu apoptotik sperm yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında, Sisplatin grubunda Sisplatin+KAFE grubuna oranla apoptotik sperm yüzdesinde artış olduğu, aynı zamanda Kontrol grubunda Sisplatin grubuna kıyasla apoptotik sperm yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber en yüksek apoptotik sperm ortalamasının %112,85 ile Sisplatin grubunda, en düşük ise %54,80 ile Sisplatin+KAFE grubunda olduğu

bulunmuştur. Bu da KAFE'in germ hücre apoptozuna karşı koruyucu özelliği olduğunu göstermiştir.

5. Toplam hareketli sperm yüzdelere baktığımızda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ancak KAFE grubundaki toplam motil sperm yüzdesi, Sisplatin+KAFE ve Sisplatin gruplarına kıyasla minimal bir artış göstermiştir.
6. Sperm konsantrasyonunda gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sperm konsantrasyonu ve motiliteye etkisinin anlaşılabilmesi için KAFE tedavisinin uzatılması ile pozitif etkilerin görülebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak çeşitli yollarla Sisplatinin neden olduğu seminifer tübül hasarının yanında aynı zamanda basal laminada bütünlüğünde bozulmalara sebep olduğunu gözlemledik. Kazpaz-3 yolağı için immunohistokimyasal boyama ile yaptığımız gözlemlerde KAFE'in serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasarlara karşı koruyucu bir etki gösterdiğini tespit ettik. Bundan sonraki çalışmalarda, KAFE'in kanserli hücreler üstündeki efektif etkinliği üzerine farklı doz ve süreler ile ileri araştırmalar yapılması düşünülebilir ve diğer yollar üzerindeki etkileri araştırılabilir. Elektron mikroskopi ile germ hücre yapılarının ayrıntılı incelenmesi de daha detaylı bilgi edinmemize yardımcı olacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. **Borch RF, Pleasants ME.** Inhibition of cis-platinum nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1979.**
2. **Hannemann J, Baumann K.** Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: Different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicol.* **1988.**
3. **Yasuyuki S, Takahiro S, Yoshio T.** Change of lipid peroxide levels in rat tissues after cisplatin administration. *Toxicol Lett.* **1991.**
4. **Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA.** Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* **2002.**
5. **Sheikh-Hamad D, Cacini W, Buckley AR, et al.** Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. *Arch Toxicol.* **2004.**
6. **Zamble DB, Lippard SJ.** Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci.* **1995.**
7. **Chirino YI, Pedraza-Chaverri J.** Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* **2009.**
8. **Goyer, R.A. et Clarkson TW.** Toxic effects of metals. In: D.C. Klassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. *McGraw-Hill, New York.* **2001.**
9. **Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A.** Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology.* **2005.**
10. **Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J.** Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* **2004.**
11. **Klaassen CD.** Casarett and Doull's Toxicology : Basic Science of Poisons - 7th Edition. **2008.**
12. **Jordan P, Carmo-Fonseca M.** Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* **2000.**
13. **Van Geelen CMM, De Vries EGE, Le TKP, Van Weeghel RP, De Jong S.** Differential

- modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer*. **2003**.
14. **Nishikawa M, Nagatomi H, Chang BJ, Sato E, Inoue M.** Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. *Arch Biochem Biophys*. **2001**.
 15. Vickers AE., Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. Kidney Slices of Human and Rat to Characterize Cisplatin-Induced Injury on Cellular Pathways and Morphology. *Toxicol Pathol*. **2004**.
 16. **Heeba GH, Hamza AA, Hassanin SO.** Induction of heme oxygenase-1 with hemin alleviates cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. *Toxicol Lett*. **2016**.
 17. **Hansen SW, Berthelsen JG, Von Der Maase H.** Long-term fertility and Leydig cell function in patients treated for germ cell cancer with cisplatin, vinblastine, and bleomycin versus surveillance. *J Clin Oncol*. **1990**.
 18. **Al-Bader M, Kilarkaje N.** Effects of bleomycin, etoposide and cisplatin treatment on Leydig cell structure and transcription of steroidogenic enzymes in rat testis. *Eur J Pharmacol*. **2015**.
 19. **Mohammadnejad D, Abedelahi A, Soleimani-rad J, Mohammadi-roshandeh A, Rashtbar M, Azami A.** Degenerative effect of cisplatin on testicular germinal epithelium. *Adv Pharm Bull*. **2012**.
 20. **Alvarez JG, Storey BT.** Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. **1995**.
 21. **Agarwal A, Prabakaran SA.** Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*. **2005**.
 22. **Badade ZG, Samant PM.** Role of Oxidative Stress in Male Infertility. *J Biomed Sci Res*. **2011**.
 23. **Agarwal A, Makker K, Sharma R.** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am J Reprod Immunol*. **2008**.
 24. **Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA.** Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. **2008**.
 25. **Cayman.** Product information: Phenethyl caffeiate. Cayman. **2012**.
 26. **Chen HC, Chen JH, Chang C, Shieh CJ.** Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of

- enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrason Sonochem.* **2011.**
27. **Göçer H, Gülçin I.** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *Int J Food Sci Nutr.* **2011;** 62(8):821-825.
 28. **Sigma-Aldrich.** Caffeic acid phenethyl ester. GENERIC EU MSDS. SIGMA-ALDRICH. **2012.**
 29. **Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, et al.** Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor- κ B inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer.* **2009.**
 30. **Lin, H.-P., Lin, C.-Y., Huo, C., Su L-C and C.** Anticancer effect of caffeic acid phenethyl ester. *Pharmacol 3.* **2012:** 26-30.
 31. **Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ, Abdel-Naim AB.** Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life.* **2013.**
 32. **Tolba MF, Omar HA, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Naim AB, Abdel-Rahman SZ.** Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant Activity, Protective Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2016.**
 33. **Ross M, Pawlina W.** Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th Edition. **2010.**
 34. **Kierszenbaum AL.** Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology 4th Edition. **2013.**
 35. **Sadler L.** Langman's Medical Embryology 13th Edition. **2010.**
 36. **Keith L. Moore, Mark G. Torchia TVNP.** The developing human: Clinical orientated Embryology. **2004.**
 37. **McGurk S.** Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas – 13th edition. **2013.**
 38. **Gartner LP, Hiatt JL, Strum JM.** Cell Biology and Histology. **2011.**
 39. **Meyer HS.** Color Textbook of Histology 3rd Edition. *JAMA J Am Med Assoc.* **2001.**
 40. **Yang Y, Liu H, Liu F, Dong Z.** Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity. *Arch Toxicol.* **2014.**

41. **Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K.** Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am J Med Sci.* **2007.**
42. **Dohle GR.** Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *Int J Urol.* **2010.**
43. **Zangar RC, Davydov DR, Verma S.** Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2004.**
44. **Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al.** Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* **2003.**
45. **Wang J, Biju MP, Wang MH, Haase VH, Dong Z.** Cytoprotective effects of hypoxia against cisplatin-induced tubular cell apoptosis: Involvement of mitochondrial inhibition and p53 suppression. *J Am Soc Nephrol.* **2006.**
46. **Hooser SB, Van Dijk-Knijnenburg WCM, Waalkens-Berendsen IDH, et al.** Cisplatin-DNA adduct formation in rat spermatozoa and its effect on fetal development. *Cancer Lett.* **2000.**
47. **Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.** Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Off J Turkish Nephrol Assoc.* **1997.**
48. **Burçak G, Andican G.** OKSİDATİF DNA HASARI VE YAŞLANMA. *Cerrahpaşa Tıp Derg.* **2014.**
49. **Kaur P, Bansal MP.** Influence of selenium induced oxidative stress on spermatogenesis and lactate dehydrogenase-X in mice testis. *Asian J Androl.* **2004.**
50. **Nelson DL, Cox MM.** Lehninger Principles Of Biochemistry 5th Edition. 2008.
51. **Zini A, Schlegel PN.** Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl.* **1996.**
52. **Peltola V., Huhtaniemi I., Ahotupa M.** Antioxidant Enzyme Activity in the Maturing Rat Testis. *J Androl.* **1992.**
53. **Aitken RJ.** Founders' lecture. Human spermatozoa: Fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev.* **2004.**
54. **Aitken RJ.** The Amoroso Lecture: The human spermatozoon - A cell in crisis? *J Reprod Fertil.* **1999.**
55. **B. Halliwell.** Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* **2007;** (35):1147–1150.

56. **Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT.** Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic Med Chem.* **2007.**
57. **Agarwal A, Gupta S, Sikka S.** The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* **2006.**
58. **Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B.** Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res.* **2010.**
59. **Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C.** Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* **2008.**
60. **Aydemir B, Sarı EK.** Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Vet Derg.* **2009;** 2(2):56-60.
61. **Sen S, Chakraborty R.** *The Role of Antioxidants in Human Health.* **2011.**
62. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **2007.**
63. **Young IS, Woodside J V.** Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* **2001.**
64. **Uz E, Sogut S, Sahin S, et al.** The protective role of caffeic acid phenethyl ester “CAPE” on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol.* **2002.**
65. **Ozyurt H, Pekmez H, Parlaktas BS, Kus I, Ozyurt B, Sarsilmaz M.** Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl.* **2006.**
66. **Ozyurt B, Parlaktas BS, Ozyurt H, Aslan H, Ekici F, Atis Ö.** A preliminary study of the levels of testis oxidative stress parameters after MK-801-induced experimental psychosis model: Protective effects of CAPE. *Toxicology.* **2007.**
67. **Kus I, Colakoglu N, Pekmez H, Seckin D, Ogeturk M, Sarsilmaz M.** Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochem.* **2004.**
68. **Boyle P, Levin B.** World CanCer report **2008.**
69. **Sabanegh ES Jr, Ragheb AM.** Male Fertility After Cancer. *Urology.* **2009.**

70. **Nudell DM, Monoski MM, Lipshultz LI.** Common medications and drugs: How they affect male fertility. *Urol Clin North Am.* **2002.**
71. **Delbès G, Chan D, Pakarinen P, Trasler JM, Hales BF, Robaire B.** Impact of the Chemotherapy Cocktail Used to Treat Testicular Cancer on the Gene Expression Profile of Germ Cells from Male Brown-Norway Rats¹. *Biol Reprod.* **2009.**
72. **Murtaza G, Karim S, Akram MR, et al.** Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *Biomed Res Int.* **2014.**
73. **Kilarkaje N, Mousa AM, Al-Bader MM, Khan KM.** Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. *Fertil Steril.* **2013.**
74. **Ravindra P, Bhiwgade DA, Kulkarni S, et al.** Cisplatin induced histological changes in renal tissue of rat. *J Cell Anim Biol.* **2010;** 4(7):108-111.
75. **Mercantepe T, Unal D, Tümkaya L, Yazici ZA.** Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med.* **2018.**
76. **Mahfouz R, Sharma R, Sharma D, Sabanegh E, Agarwal A.** Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertil Steril.* **2009;** 91(3):805-811.
77. **Gandini L.** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* **2000.**
78. **Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Sikka SC.** Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril.* **2005.**
79. **Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D.** The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* **2005.**
80. **Tesarik J.** Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online.* **2005.**
81. **Karimi S, Hosseinimehr SJ, Mohammadi HR, Khalatbary AR, Amiri FT.** Zataria multiflora ameliorates Cisplatin-induced testicular damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in a mice model. *Iran J Basic Med Sci.* **2018.**
82. **Halliwell B.** The Chemistry of Free Radicals. *Toxicol Ind Health.* **1993;**9(1-2):1-21.
83. **Ma Z, Wei X, Fontanilla C, et al.** Caffeic acid phenethyl ester blocks free radical generation

and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Life Sci.* **2006.**

84. **Erboga M, Kanter M, Aktas C, et al.** Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res.* **2016.**



8.EKLER

Ek 1: Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu Onayı

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 22

9./6./2018


Konu: Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Ratlarda Sısplatin ile Oluşturulan Testis Hasarında Kafeik Asit Fenetil Ester 'in (KAFE) Antioksidan ve Antiapoptotik Etkilerinin Biyokimyasal ve Histolojik Olarak İncelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPALINVESTIGATER)	Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT
	DİĞER ARAŐTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATERS)	Yük. Lis. Öğr. Hande CARVER, Yrd. Doç. Dr. Özgür Mehmet YİS
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Deney Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No):2018/11	Tarih (Date): 21.03.2018
	Yrd.Doç.Dr.Tülin FIRAT'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 40 adet sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Erol AYAZ (Başkan Yrd.)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŐKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŐENGÜL (İnvivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŐ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŐIT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Orçun TOPTAŐ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diő Hek. Fakültesi	
Doç. Dr. Yeőim YENER (Üye)	AİBÜ Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI (Üye)	Üroloji AD Öğretim. Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Ayhan ŐETINKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Vetr. Hek. Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama. ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİŐ AŐ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC Üyesi)	Avukat	Tabaklar mah. İzzet Baysal cad. No:6 BOLU	

Ek 2: Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinalik Raporu



T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA / YÜKSEK LISANS TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

30.07.2019

AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Öğrencinin Adı Soyadı: Hande CARVER
Numarası: 12836894180
Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Lisansüstü Eğitim Düzeyi: Yüksek Lisans
Doktora

Tez Başlığı: RATLARDA SİSPLATİN İLE OLUSTURULAN TESTİS HASARINDA, KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİNİN (KAFE) ANTİOKSİDAN VE ANTIAPOPTOTİK ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan 60 sayfalık kısmına ilişkin 29/07/2019 tarihinde tarafımdan/tez danışmanımca Turnitin intihal tespiti programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı "alıntılar hariç" yapıldığında % 13, "alıntılar dahil" yapıldığında ise % 13 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Filtrelemeler:

- 1- Kaynakça Hariç,
- 2- Alıntılar Hariç / Dahil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç.

"AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulama Esasları" nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bilgilerinize arz ederim.

Hande Carver
H. Carver
Öğrencinin Ad Soyad ve İmza

EK: 1 adet tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde raporlama işlemi bittikten sonra alınmış ekran görüntüsü eklenecektir.

TEZ DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR
29.07.2019
Dr. Öğr. Üyesi Tulin FİDAN
(Unvan, Ad Soyad, Tarih, İmza)
Tulin

9.ÖZGEÇMİŞ

Ortaöğretim eğitimimi İstanbul'da tamamladım. 2008 yılında İstanbul Bayrampaşa Tuna Lisesi'nden mezun oldum. 2009 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) bölümünde eğitim almaya başlayarak 2015 yılında mezun oldum. Aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi'nde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda staj yaptım. 2016 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.



