



**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİSPLATİNİN MEYDANA GETİRDİĞİ TESTİS
HASARI ÜZERİNE D VİTAMİNİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Rümevza Hilal CIRIK

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Elif KARACA

MALATYA

2022

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜRLER	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi.....	5
2.3. Testis Histolojisi.....	7
2.3.1. Seminifer Tübül Histolojisi	8
2.3.2. İnterstisyel Doku Histolojisi.....	10
2.3.3. İntratestiküler Kanalların Histolojisi	10
2.3.4. Spermatogenez	11
2.3.5. Matür Sperm Yapısı	13
2.4. Testis Fizyolojisi	14
2.4.1. Spermatogenez	14
2.4.2. Erkek Üreme İşlevlerinin Hormonlarla Düzenlenmesi	15
2.5. Sisplatin.....	16
2.6. D Vitamini.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Kimyasallar	21
3.2. Deney Hayvanları.....	21
3.3. Etik Beyan	21
3.4. Deneyisel Tasarım.....	21
3.5. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması	22
3.6. Histolojik Doku Takip, Boyama ve İnceleme.....	22

3.6.1. Histolojik Doku Takip İşlemleri.....	23
3.6.2. Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu	23
3.6.3. Periodic Acid Schiff Boyama Metodu	24
3.6.4. İmmünohistokimya Boyama Metodu	24
3.6.5. Histolojik Değerlendirme	25
3.6.6. Sperm Morfoloji ve Vitalite Değerlendirmesi.....	27
3.6.7. Sperm Sayımı Yapılması	28
3.7. Biyokimyasal Tahlil	28
3.8. İstatiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. Deney Hayvanlarının Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	31
4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	31
4.3. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	31
4.4. Biyokimyasal Bulgular.....	57
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR.....	71

TEŞEKKÜRLER

Tez danışmanım sayın Doç. Dr. Elif KARACA başta olmak üzere eğitim sürecime katkılarından dolayı Prof. Dr. Nigar VARDI'ya, Prof. Dr. Mehmet GÜL'e, Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Azibe YILDIZ'a

Ayrıca asistanlık sürecimde beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Semir GÜL'e, Bio. Leyla YURTSEVEN'e, Rümeysa KAYA'ya, Cemre Zeynep HARMAN'a, Eda ÖZSOY'a, Nuray TEPE'ye

Arkadaşlığı ve deney sürecimdeki özverili yardımlarından dolayı Mehmet ÇOLAK'a

Bu günlere gelmemi sağlayan ve üzerimde büyük emekleri olan kıymetli annem Nimet DATLI ve babam Hacı DATLI'ya

Hayattaki en büyük destekçim, sırdaşım, yoldaşım, eşim Salih'e

Neşe kaynağımız biricik oğlum Bilgehan'a en içten duygularıyla teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Rümeysa Hilal CIRIK

AĞUSTOS 2022 / MALATYA

ÖZET

Sıçanlarda Sisplatinin Meydana Getirdiği Testis Hasarı Üzerine D Vitamini Etkisinin Araştırılması

Amaç: Çalışmamızda sisplatinin neden olduğu testis hasarına karşı VD'nin etkilerini histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 28 adet Wistar albino sıçan kontrol ve VD grubunda 6, sisplatin ve sisplatin+VD grubunda 8 adet olarak dört gruba ayrıldı. Sıçanların deney başında ve sonunda vücut ve testis ağırlıkları ölçüldü. 10 günlük deney sonunda ketamin/ksilazin anestezisi altında sıçanlar sakrifiye edildi. Sağ testisler biyokimyasal analizlerde, sol testisler histolojik analizlerde kullanıldı. Alınan dokular, rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan seri kesitlere HE, PAS, kaspaz-3 ve VDR boyama metodları uygulandı. Epididimis kauda kısmından elde edilen semen örneklerinden sperm vitalitesi ve morfolojisi değerlendirildi. Ayrıca sperm sayımı yapıldı. Biyokimyasal olarak TOS, TAS, FSH, LH, testosteron, östrojen, VD, Ca ve P düzeyleri ELISA test kitleri aracılığıyla spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: Histopatolojik analizlerde; sisplatin grubunda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında azalma, Johnsen skorunda düşme, germinal hücrelerde dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. PAS boyamada bazal membranda ondülasyon ve artmış pozitiflik izlendi. Kaspaz-3 immün pozitiflik artarken, VDR immün boyama azalmış tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde; sisplatin grubunda TOS da anlamlı artış görülürken TAS yönünden anlamlı bir fark tespit edilmedi. FSH, LH, Testosteron, VD Ca ve P yönünden kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak bir fark izlenmedi. Östrojenin ise kontrole göre anlamlı düzeyde düştüğü görüldü. Sperm sayısı ve sperm vitalitesi kontrol grubuna göre azalmış, sperm anomalisi ise artmış tespit edildi. VD uygulamasının histolojik hasarı azalttığı ve Johnsen skorunda anlamlı yükselmeye neden olduğu görüldü. Bu grupta kaspaz-3 immün boyanma azalırken VDR immün boyanmada artış izlendi. Biyokimyasal olarak TOS düzeyinde anlamlı azalma ve VD seviyesinde anlamlı artış tespit edildi.

Sonuçlar: Sonuç olarak bu çalışma, sisplatin ile testis hasarı oluşturulan sıçanlarda VD uygulamasının testiküler hasarı hafiflettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, klinik tedavi protokollerine VD'nin eklenmesi için daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: D Vitamini, Sıçan, Sisplatin, Testis

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Vitamin D on Testicular Damage Caused by Cisplatin in Rats

Aim: In our study, we aimed to investigate the effects of VD against testicular damage caused by cisplatin by histopathological, immunohistochemical and biochemical methods.

Material and Method: 28 Wistar Albino rats were divided into four groups, 6 in the control and VD groups, and 8 in the cisplatin and cisplatin+ VD groups. Body and testicular weights of the rats were measured at the beginning and end of the experiment. At the end of the 10-day experiment, the rats were sacrificed under ketamine/xylazine anesthesia. Right testicles were used for biochemical analyzes and left testicles were used for histological analyses. Tissues were taken through routine tissue follow-up procedures and embedded in paraffin. HE, PAS, caspase-3 and VDR staining methods were applied to serial sections taken from paraffin blocks. Sperm vitality and morphology were evaluated from semen samples obtained from the cauda part of the epididymis. Number of sperms was also counted. Biochemically, TOS, TAS, FSH, LH, testosterone, estrogen, VD, Ca and P levels were measured by ELISA test kits using spectrophotometric methods.

Results: In histopathological analysis; a decrease in seminiferous tubule diameter and germinal epithelial thickness, decrease in Johnsen score, and degenerative changes in germinal cells were observed in the cisplatin group. In PAS staining, corrugation and increased positivity were observed in the basement membrane. While caspase-3 immune positivity increased, VDR immunostaining decreased. In biochemical analysis; while a significant increase was observed in TOS in the cisplatin group, no significant difference was found in terms of TAS. No statistical difference was observed in terms of FSH, LH, Testosterone, VD, Ca and P when compared with the control. It was observed that estrogen decreased significantly compared to the control. Sperm count and sperm vitality were decreased compared to the control group, and sperm anomaly was increased. It was observed that VD application reduced histological damage and caused a significant increase in Johnsen score. In this group, caspase-3 immunostaining decreased while VDR immunostaining increased. Biochemically, a significant decrease in TOS level and a significant increase in VD level were detected.

Conclusion: In conclusion, this study shows that VD administration alleviates testicular damage in rats with cisplatin-induced testicular damage. However, further studies are needed to add VD to clinical treatment protocols.

Keywords: Vitamin D, Rat, Cisplatin, Testis

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
Ca	: Kalsiyum
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GnRH	: Gonodotropin Salgılatıcı Hormon
GSH	: Glutatyon
HE	: Hematoksilen-Eozin
LH	: Lüteinizan Hormon
MDA	: Malondialdehit
MİF	: Müllerian İnhibe Edici Faktör
P	: İnorganik Fosfat
PAS	: Periyodik Asit Schiff
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TOS	: Total Oksidan Seviye
VD	: Vitamin D
VDR	: Vitamin D Reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Testiküler Gelişim Evrelerinin Şematik Diyagramı.....	4
Şekil 2.2. Testis Anatomisi.....	6
Şekil 2.3. Testis Histolojisi.....	8
Şekil 2.4. Testis Fizyolojisi.....	15
Şekil 2.5. Sisplatinin Moleküler Yapısının Şematik Gösterimi.....	17
Şekil 2.6. D Vitaminin Fizyolojisinin Şematik Gösterimi.....	19
Şekil 3.1. Seminifer Tübüllerin Johnsen Skoru 3-4-5-6'ya Karşılık Gelen Görüntüleri.....	26
Şekil 3.2. Seminifer Tübüllerin Johnsen Skoru 7-8-9-10'a Karşılık Gelen Görüntüleri.....	27
Şekil 3.3. Sperm Vitalite Değerlendirmesi.....	28
Şekil 4.1. Kontrol Grubu. HE.....	33
Şekil 4.2. Kontrol Grubu. HE.....	34
Şekil 4.3. Kontrol Grubu. HE.....	35
Şekil 4.4. Kontrol Grubu. PAS.....	36
Şekil 4.5. Kontrol Grubu. Kaspaz-3.....	37
Şekil 4.6. Kontrol Grubu. VDR.....	38
Şekil 4.7. Kontrol Grubu. VDR.....	39
Şekil 4.8. VD Grubu. HE.....	40
Şekil 4.9. VD Grubu. PAS.....	41
Şekil 4.10. VD Grubu. Kaspaz-3.....	42
Şekil 4.11. VD Grubu. VDR.....	43
Şekil 4.12. VD Grubu. VDR.....	44
Şekil 4.13. Sisplatin Grubu. HE.....	45
Şekil 4.14. Sisplatin Grubu. HE.....	46
Şekil 4.15. Sisplatin Grubu. HE.....	47
Şekil 4.16. Sisplatin Grubu. HE.....	48
Şekil 4.17. Sisplatin Grubu. HE.....	49
Şekil 4.18. Sisplatin Grubu. HE.....	50
Şekil 4.19. Sisplatin Grubu. HE.....	51
Şekil 4.20. Sisplatin Grubu. HE.....	52
Şekil 4.21. Sisplatin Grubu. HE.....	53
Şekil 4.22. Sisplatin Grubu. HE.....	54

Şekil 4.23. Sisplatin Grubu. PAS.....	55
Şekil 4.24. Sisplatin Grubu. Kaspaz-3.....	56
Şekil 4.25. Sisplatin Grubu. VDR.....	57
Şekil 4.26. Sisplatin Grubu. VDR.....	58
Şekil 4.27. Sisplatin+VD Grubu. HE.....	59
Şekil 4.28. Sisplatin+VD Grubu. HE	60
Şekil 4.29. Sisplatin+VD Grubu. PAS	61
Şekil 4.30. Sisplatin+VD Grubu. Kaspaz-3.....	62
Şekil 4.31. Sisplatin+VD Grubu. VDR.....	63
Şekil 4.32. Sisplatin+VD Grubu. VDR.....	64
Şekil 4.33. Sperm Vitalite Değerlendirmesi.....	66
Şekil 4.34. Spermilerin Morfolojik Değerlendirmesi.....	66
Şekil 4.35. Gruplar Arası TAS ve TOS Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	68
Şekil 4.36. Gruplar Arası FSH, LH, Testosteron ve Östrojen Analizleri.....	69
Şekil 4.37. Gruplar Arası VD, Ca ve P Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Histolojik Doku Takip İşlemleri.....	22
Tablo 3.2. Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu.....	23
Tablo 3.3. Periodic Acid Schiff Boyama Metodu.....	23
Tablo 3.4. İmmünohistokimya Boyama Metodu.....	24
Tablo 3.5. Johnsen Skoru.....	25
Tablo 4.1. Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Hayvan Ağırlıklarının Karşılaştırılması..	32
Tablo 4.2. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.3. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığı Karşılaştırılması.....	64
Tablo 4.4. VDR ve Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	65
Tablo 4.5. Sperm Analizlerinin Karşılaştırılması.....	67
Tablo 4.6. TAS ve TOS Analizlerinin Karşılaştırılması.....	68
Tablo 4.7. FSH, LH, Testosteron ve Östrojen Analizlerinin Karşılaştırılması.....	68
Tablo 4.8. VD, Ca ve P Analizlerinin Karşılaştırılması.....	69

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, kontrolsüz hücre proliferasyonu ile seyreden bir hastalık olup tüm dünyada en sık ikinci ölüm nedenidir (1). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı 2020 yılında 19,3 milyon kanser vakası olduğunu ve 2040 yılı için ön görülen vaka sayısının 28,4 milyon olacağını bildirmiştir (2). Kanser tedavisinde; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hormon tedavisi yer almaktadır (3).

Sisplatin, Rosenberg ve Vancamp tarafından 1972 yılında klinik kullanıma sunulan, platin bazlı bir ajandır (4). Başlangıçta bakteri üremesini engellediği gösterilmiş sonrasında kemoteröpatik etkisi tespit edilmiştir (5). Günümüzde sisplatin; baş-boyun, mesane, prostat, testis, meme, serviks, over kanserleri, osteojenik sarkom ve nöroblastoma gibi birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan, oldukça geniş spektrumlu kemoterapötik bir ajandır (6).

Sisplatinin sitotoksik etkisinin genel olarak DNA ile etkileşiminden kaynaklandığı kabul edilir. DNA-platin kovalent eklentileri, temel hücresel olaylar olan DNA replikasyonu, RNA transkripsiyonu ve protein translasyonu gibi süreçleri baskılayarak apoptozisi tetikler (7). Ancak sisplatinin sitotoksik etkisi sadece tümör dokusu üzerine olmayıp diğer organları da etkilemektedir. Bu nedenle sisplatin tedavisi nefrotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite ve gonadotoksisite gibi yan etkilere sebep olabilir. Birçok çalışma sisplatinin testis üzerine toksik etkileri olduğunu göstermiştir. Sisplatin tarafından indüklenen testis hasarının hücresel/biyokimyasal mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, dokuda artan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, biyokimyasal hasarın ilerleyici birikiminin hücresel yaşlanma ve kanser oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (4,8,9).

Günümüzde kemoterapötiklerin kullanımı sırasında oluşan doku hasarının minimize edilmesi için en yaygın kullanılan alternatif tedavi yöntemi antioksidan maddelerin kullanımudur. Bu nedenle sisplatin kaynaklı testis toksisitesinin antioksidanlar ile azaltılabileceği düşünülmektedir (8).

Vitamin D (VD), esas olarak güneş ışığının etkisi ile deride sentezlenen steroid bir prohormondur. Aktif hale gelebilmesi için karaciğer ve böbrekte hidroksile edilmesi gerekir (10). VD genel olarak kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) homeostazisini koruma ve

düzenleme işleviyle bilinir ancak bilinen mineral metabolizması etkilerine ek olarak anti-fibrotik, anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkiler gibi çeşitli sitoprotektif etkilere de sahiptir. Ayrıca hem erkek hem de dişi üreme süreçlerini modüle etmede rol oynadığı gösterilmiştir. Son on yılda hem erkek hem de dişi üreme organlarında D vitamini reseptör (VDR) varlığı gösterilmesiyle VD ve üreme sistemi arasındaki ilişki giderek daha fazla araştırılmakta ve yeni bilgiler bulunmaktadır. Son zamanlarda VD eksikliğinin erektil disfonksiyon, azalmış sperm konsantrasyonu ve düşük sperm motilitesi ile ilişkili olduğu da ortaya konulmuştur (10,11).

Çalışmamızın amacı VD'nin sık kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan sisplatine bağlı erkek üreme toksisitesi üzerine etkilerini histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirme ile ayrıntılı olarak araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Testisin embriyolojik gelişimi, gonadal kabartıların oluşumu ile başlar. Gonodal kabartıların kökeni ise intermediyer mezoderme dayanmaktadır. Mezonefronun ventromedial yüzeyinde bulunan sölomik epitelin hücre proliferasyonu, genital kabartıların oluşumunu başlatır. Mezonefroz, mezonefrik kanalı (*Wolff* kanalı) içerir. Bu yapı, erkek cinsiyet belirlendikten sonra epididim, seminal veziküller ve vas deferens oluşumuna katkıda bulunan ilkel bir ürogenital yapıdır.

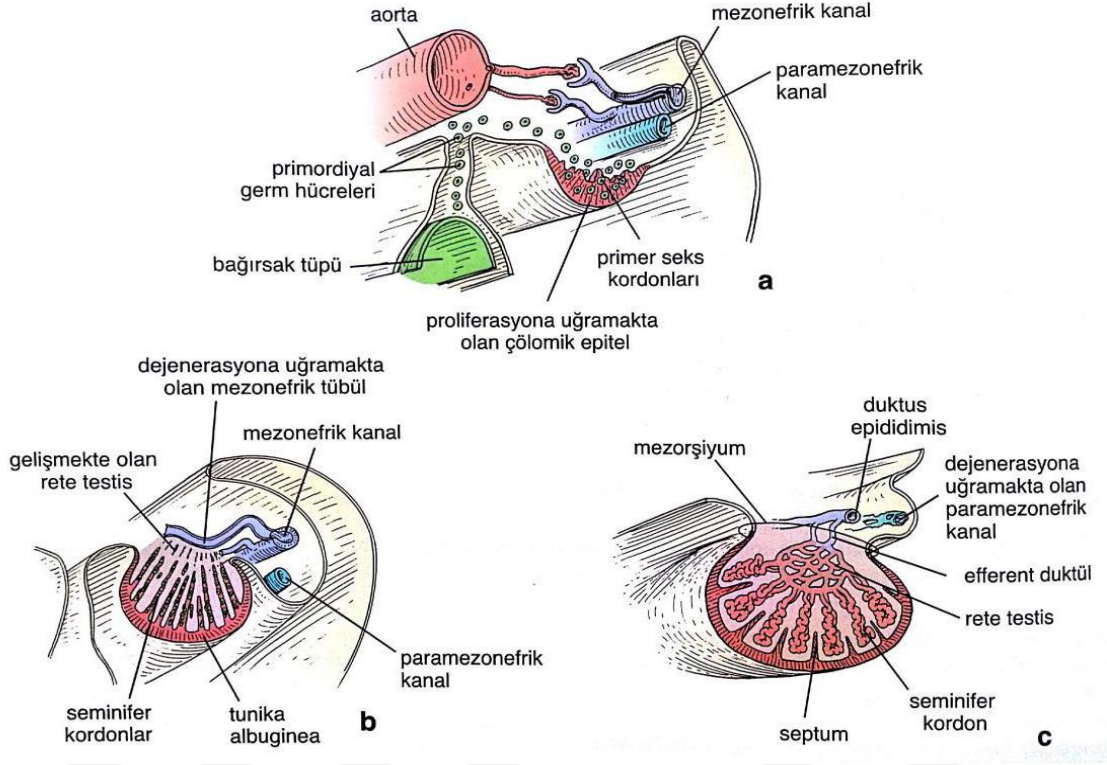
Epiblast kökenli primordial germ hücreleri 4.haftanın başında yolk kesesinin allantoise yakın duvarında görülmeye başlar. Primordial germ hücreleri son barsak duvarını geçer ve dorsal mezenter boyunca ilerleyerek 5. haftada her iki yanda bulunan gonadal kabartılara ulaşmış olur. 6. haftanın sonunda primordiyal germ hücreleri primer cinsiyet kordonlarına katılır. Testiküler gelişim evreleri diyagramı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşması, gonadların farklılaşması üzerine indükleyici etkiye sahiptir (12).

Genetik cinsiyet fertilizasyonda belirlenmiştir. Erkek embriyo XY kromozom kompleksine sahiptir. Erkeklerde, cinsiyet belirleyici proteinlerin üretimini aktive ederek cinsiyetin belirlenmesini başlatan cinsiyete özgü SRY geni vardır. Testis belirleyici faktör (TBF), Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11), testis tayini için gerekli tek gen olan SRY'nin cinsiyet belirleyici bölgesi olarak bilinir. Bu genin yokluğu embriyonun dişi yönde gelişmesine neden olur (13).

SRY geni, SOX9 olarak bilinen ilgili bir otozomal genin testise yönelik diferansiasyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. SOX9 geni, destekleyici hücre öncülerinden Sertoli hücre farklılaşmasının başlatılması için gereklidir. Bu destekleyici hücreler SOX9 gen aktivasyonu olmaması halinde folikül hücrelerine farklılaşacaktır. SRY ve SOX9 genleri Sertoli hücre farklılaşmasının yanısıra interstisyel hücrelerin miyoid hücrelere ve Leydig hücrelere farklılaşması, germ hücrelerinin mitotik arresti ve testiküler kordonların oluşumundan sorumludur (13).

İnsan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) intrauterin 8-12 haftalık dönemde pik yaparak Leydig hücrelerinden testosteron ve androstenodion üretimini uyarır. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron ve androstenodion hormonları, sekizinci

haftadan itibaren dış genitalerin ve mezonefrik kanalın erkek cinsiyet yönünde farklılaşmasını sağlar. Fetal dönemde Sertoli hücrelerinden salgılanan Anti-müllerian hormon (AMH) ise paramezonefrik kanalın (Müllerian kanal) gelişimini inhibe eder.



Şekil 2.1. Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı. **a.** 5 haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonad evresi, **b.** Primer cinsiyet kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşması, **c.** Testiküler gelişiminin son evreleri (14).

26. haftada pelvisdeki büyüme ve embriyodaki boyut artışı ile birlikte testisler inguinal kanalda ilerler ve skrotuma inmeye başlar. Bu süreç testisten skrotuma uzanan fibröz bir yapı olan gubernakulum ve androjen hormonlarının kontrolünde gelişir. Peritonun parmaksız uzantısı olan *processus vaginalis* fetal gelişim sürecinde karın ön duvarı tabakaları ile birlikte testisin iniş seyri boyunca skrotuma ulaşır. Testisler 2-3 gün içinde skrotuma inmiş olur. Term doğmuş bebeklerin %97'sinden fazlasında testisler skrotum içerisindedir. Doğumda inmemiş testis tespit edilen bebeklerin çoğunda ise testisler bir yaşına kadar skrotuma iner.

Puberteye kadar testiküler kordonlar Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşan solid yapılar şeklindedir. Puberte döneminde testiküler kordonlarda lümen oluşumu görülür ve böylece seminifer tübülleri meydana gelir. Bu dönemde

gonadotropinlerin (Lüteinizan hormon-LH, Folikül stimulan hormon-FSH) artışıyla birlikte spermatogenez başlar (13).

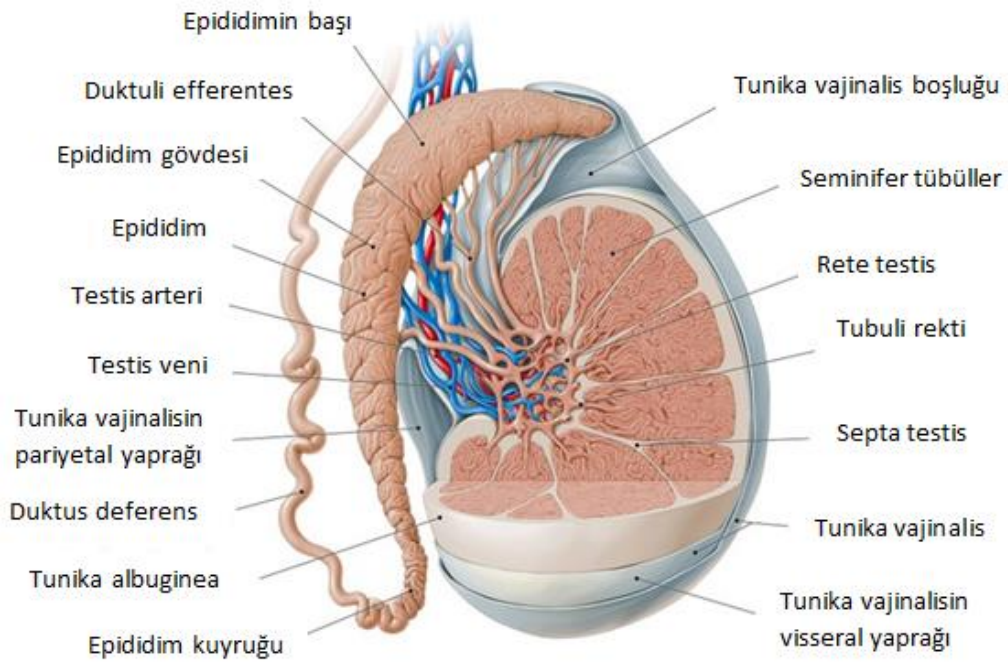
2.2. Testis Anatomisi

Erkek üreme organı testis, skrotal kese içinde bir çift olarak asılı haldedir. Testislerin yanısıra skrotumda *funiculus spermaticus*un alt ucu ve epididimis de bulunur. Testisler skrotal kese içinde *septum scroti* denen bir parça ile birbirinden ayrılır. Farklılık olabilmekle birlikte, testisler ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm kalınlığında, 2,5 cm genişliğinde ve 20-25 gr ağırlığındadır. Testis üst ucundan spermatik kord ile ilişkilidir. Alt uçta ise gubernakulumun bir kalıntısı olan *skrotal ligament* ile skrotuma bağlanır (15).

Skrotumun duvarı dıştan içe doğru; deri, tunica dartos (*m. dartos*), *fascia spermatica externa*, *fascia cremasterica* ve *m. cremaster*, *fascia spermatica interna* ve *periorchium* tabakalarından meydana gelmektedir. Aslında deri ile tunica dartos'a birlikte skrotum denilir. Ancak genelde skrotum denilince tüm tabakaları ile birlikte testisin kılıfı anlaşılmaktadır.

Deri skrotal bölgede biraz farklılık göstermektedir. Çok incedir, fazla pigment içeriği nedeniyle daha koyu renkte ve buruşuk görünümündedir. Ayrıca bu bölgenin derisinde kıl kökleri, ter bezleri ve yağ bezleri bulunur. Tunica dartos'un içinde bol miktarda *m. dartos* denilen düz kas lifleri bulunur. Bu kas lifleri *septum scroti* içerisine de girerek, yukarıda penisin alt yüzündeki *raphe* penis'e tutunur. Tunica dartos yapısında yağ dokusu bulunmaz ancak buna karşılık damardan zengindir. *Septum scrotici*'de ise tunica dartos'un uzantısından başka, deri hariç, skrotumun tüm tabakaları bulunur. Tunica dartos ile *m. obliquus externus abdominis aponeurozu*'ndan gelişen *fascia spermatica externa* arasında fasial bir aralık bulunur. Daha içte *m. obliquus internus abdominis*'den gelişen *fascia cremasterica* ve *m. cremaster* yer alır. Uyluğun iç yüzünün üst kısmı hafif şekilde çizildiğinde *m. cremaster* kontraksiyon yapar ve testisi yukarı çekerek karın boşluğuna yaklaştırır. Bu reflekse kremaster refleksi denir. *Fascia transversalis*'in bir devamı olan *fascia spermatica interna*, dış tarafındaki *fascia cremasterica*'ya sıkıca, iç tarafındaki *periorchium*'a ise gevşek olarak tutunur. Peritoneum'un lamina parietalisi olan *periorchium* skrotumun en iç tabakasıdır. Bu tabaka *cavum scroti*'yi dıştan sınırlar. *Cavum scroti*'yi içten sınırlayan yapı ise peritoneumun lamina visceralisi olan *epiorchium*'dur.

Testis dıştan içe doğru tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa ile sarılıdır. Peritoneumun lamina parietalisi olan periorchium ve peritoneumun lamina visceralis'i olan epiorchium'un her ikisine birden tunica vaginalis adı verilir. Her iki yaprak arasında kalan kılcal aralığa cavum serosum scroti denilir ve içerisinde bir miktar kaygan sıvı bulunur. Epiorchium, epididimisin büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü hariç testisi örter ve bu iki oluşumu birbirine bağlar. Tunica albuginea, testisi saran mavimsi beyaz renkli, sıkı fibröz bir tabakadır. Tunica albuginea testisin arka kısmında, içeriye doğru kalın vertikal bir uzantı gönderir. Bu yapıya mediastinum testis denir. Mediastinum testis'den damar ve kanallar girip çıkar. Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın iç yüzünde bulunan damar ağı tabakasıdır. Damarlar arasında kalan kısımları da gevşek bağ dokusu doldurmaktadır. Testis anatomisi Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Testis Anatomisi (16).

Mediastinum testis'den çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Bu yapılar testisi 200-300 kadar lobuli testise böler. Her bir lopçuk, tubuli seminiferi contorti adı verilen 1-4 kadar kör uçlu ve kıvrımlı tüplerden oluşur. Lopçukların mediastinum testis'e bakan tepe kısımlarında bu kıvrımlı tüpler düzleşir ve birbirleriyle birleşerek tubuli seminiferi recti denilen 20-30 kadar kanalı oluşturur. Bu kanallar birbiriyle

anastomozlaşarak *rete testis* adı verilen ağı oluşturur. *Rete testis*, *mediastinum testis*'in üst bölümünde 12-15 kadar kanala dönüşür. *Ductuli efferentes testis* denilen bu kanallar testisin arka üst kısmından tunica *albuginea*'yı delerek testisin dışına çıkar. *Ductuli efferentes testis*'ler *ductus epididymis*'e açılır. *Ductus epididymis* adı verilen kanalların oluşturduğu yumağa epididymis denir. Epididymis testisin arka medial kenarına bir periton plikasıyla bağlıdır.

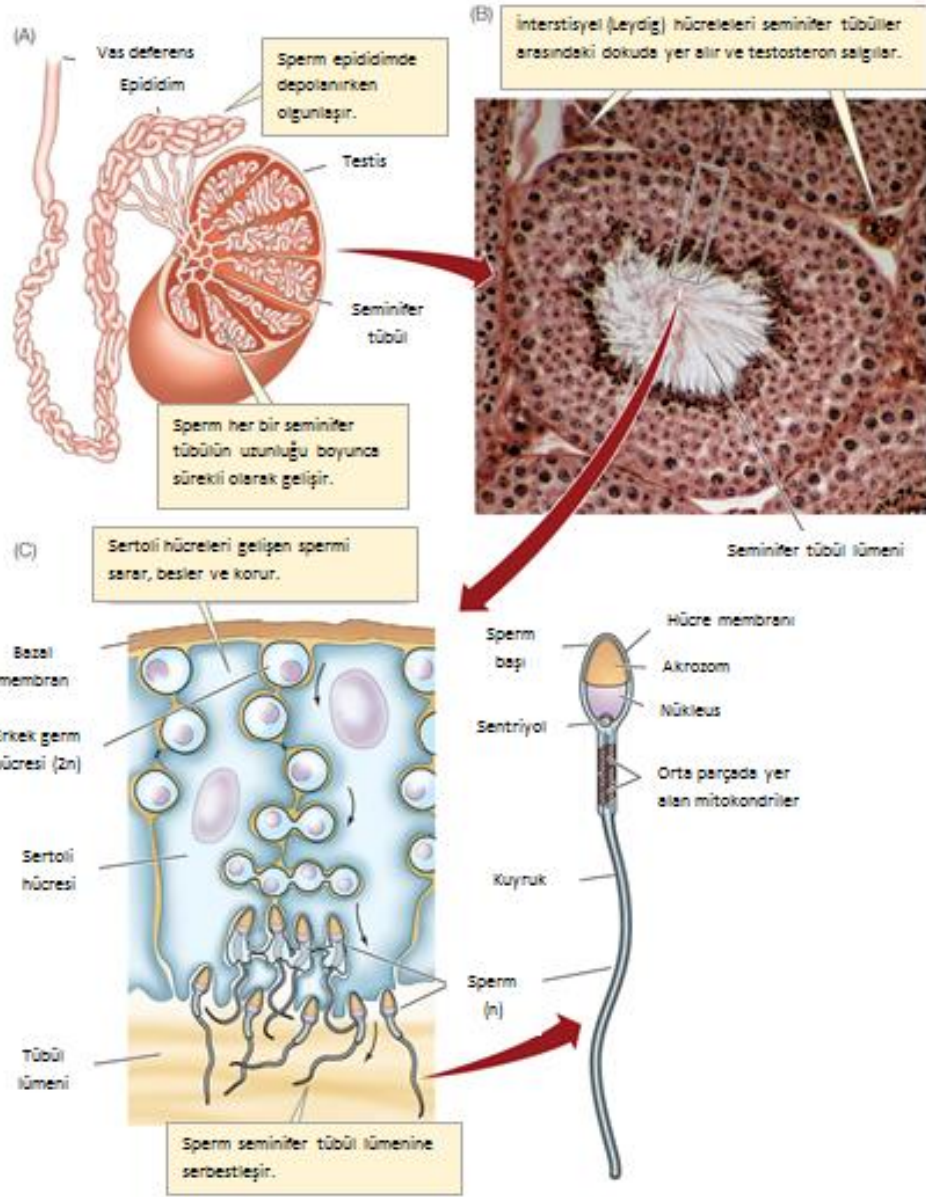
Skrotumun kanlanması, ön taraftan *a. pudenda externa*'nın dalı *aa. scrotales anteriores* ile, arka taraftan ise *a. pudenda interna*'nın dalı *aa. scrotales posteriores* ile olur. Ayrıca *a. testicularis* ve *a. cremasterica*'dan da besleyici dallar alır. Skrotumun venleri arterlerine eşlik eder. Tunica *dartos*'da bulunan çok sayıdaki ven bir damar ağı oluşturur. Bu damar ağı bölgenin ısıtılmasından sorumludur. Lenfatik drenajı ise *periorchium* da dahil olmak üzere *nodi lymphatici inguinales superficiales*'e olur. Skrotumun innervasyonu, ön kısımda *n. ilioinguinalis*'ten köken alan *nn. scrotales anteriores* ve *n. genitofemoralis*'in genital dalı ile, arka kısmı ise *n. perinealis*'in dalları olan *nn. scrotales posteriores* ve *n. cutaneus femoris posterior*'un perineal dalı ile sağlanır.

Testislerin kanlanması abdominal aortanın dalı olan *a. testicularis*'ler ile olur. Testisin venöz sirkülasyonu önce *funiculus spermaticus*'u saran venöz bir ağ olan *plexus pampiniformis*'e olur. Daha sonra *plexus pampiniformis*'ler *v. testicularis*'i oluşturur. Bunlardan sağ taraftaki *v. cava inferior*'a, sol taraftaki ise *v. renalis*'e dökülür. Testiste bulunan 4-8 adet lenfatik damar *spermatik kord* içinden geçerek ve *paraaortik* lenf nodlarına drene olur. Testisin innervasyonu ise *medulla spinalis*'in torakal 10-11 segmentlerinden gelen sempatik lifler ve *n. vagus*'tan gelen parasempatik lifler ile sağlanır (17).

2.3. Testis Histolojisi

Testis, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere başlıca iki fonksiyona sahip erkek genital organıdır. Kalın ve sıkı bağ dokusu yapısındaki tunica *albuginea* ile sarılı haldedir. Kapsülün iç kısmı olan tunica *vaskuloza* kan damarları içeren gevşek bir bağ dokusudur. Her bir testis kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar ile yaklaşık 250 lobüle bölünür. Her bir lobül yüksek düzeyde kıvrımlı birkaç seminifer tübül ve Leydig (interstisyel) hücrelerini içeren bağ dokusu stromadan oluşmaktadır.

Her bir seminifer tübül mediastinum testiste *tubulus rektus* (düz tübül) olarak adlandırılan kısa ve düz seyirli kanallar ile *rete testise* açılır (18).



Şekil 2.3. Testis Histolojisi. A. Testis çok sayıda kıvrımlı seminifer tübül içermekte, B. Testisin histolojik kesiti, C. Spermatogenezin şematik görünümü (19).

2.3.1. Seminifer Tübül Histolojisi

Seminifer tübülleri yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır. Seminifer tübülleri tunika *propria* tarafından çevrelenmiş seminifer epitelden meydana gelir. Seminifer epitel iki temel hücre popülasyonundan oluşan çok katlı bir epitelidir. Bu iki temel hücre grubu Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerdir. Testis histolojisi Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.

Sertoli hücreleri diğer isimleriyle destek hücreleri veya *sustentaküler* hücreler olarak bilinir. Sertoli hücreleri yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip, seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanan ve böylece seminifer tübüle desteklik sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler puberteden sonra çoğalmazlar. Sertoli hücreleri aktif bir hücre olduğu için ökromatik bir nükleusa sahiptir. Bazale yakın konumlanmış nükleusu oval veya üçgen şekilli olup bir veya daha fazla derin içe katlantılara sahiptir. İnsanda bazal sitoplazmada inklüzyon cisimcikleri (*Charcot-Böttcher*) bulunmaktadır. Bu inklüzyon cisimciklerinin kompozisyonları ve fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Sertoli hücreleri birbirlerine *zonula okludens* tipi sıkı bağlantı kompleksleri aracılığıyla bağlanır. Bu bağlantılar seminifer epiteli bazal epitelyal kompartman ve luminal kompartman olmak üzere iki epitelyal kompartmana ayırır. Spermatogonyumlar ve erken primer spermatositler bazal kompartmanda yer alırken, daha olgun spermatositler ve spermatidler luminal kompartmanda yer almaktadır. Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantı kompleksi bu tanımlanan fiziksel kompartman oluşumuna ek olarak bir geçirgenlik bariyeri de oluşturur. Kan-testis bariyeri olarak da bilinen bu yapı seminifer epitelde iyon, aminoasit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu bakımından kan ve lenf sıvısından farklılık oluşturulması için gereklidir. Plazma proteinleri ve antikorlar bu bariyer sayesinde seminifer tübül lümeninin dışında tutulur. Sertoli hücresinin androjen bağlayıcı protein (ABP) başta olmak üzere salgıladıkları ekzokrin salgı ürünleri, farklılaşmakta olan spermatogenik hücreler için yüksek konsantrasyonda testosteron içeren bir mikro çevrenin devamlılığını sağlar. Sertoli hücresi ekzokrin salgı fonksiyonu yanı sıra endokrin salgı fonksiyonuna da sahiptir. Sertoli hücresi üzerinde FSH ve testosteron reseptörleri bulunmaktadır. Sertoli hücresinin endokrin salgı ürünü olan inhibin, anterior hipofiz bezinden FSH salıverilmesini inhibe ederken, Sertoli hücresinin diğer bir endokrin salgı ürünü olan aktivin ise FSH salıverilmesini aktive eder. Sertoli hücresinden ayrıca plazminojen aktivatör, tranferrin, seruloplazmin, *müllerian* inhibe edici faktör (MIF), kök hücre faktörü ve nörotropik faktör gibi glikoproteinler de salgılanmaktadır. Ayrıca Sertoli hücrelerinin fagositoz yeteneği de vardır. Spermiyogenezin son aşamasında oluşan rezidüel cisimcikleri ve farklılaşmayı tamamlamayı başaramayan spermatogenik hücreler Sertoli hücresi tarafından fagosit edilir.

Spermatogenik hücreler düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme dönüşen hücre grubudur. Bu hücre grubu komşu Sertoli hücreleri arasında periferden lümene doğru

maturasyon kazanan, belirgin olmayan tabakalar halinde düzenlenmiştir. En immatür spermatogenik hücre spermatogonyum olup bazal lamina üzerinde bulunur. Lümeneye doğru sırasıyla primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid ve geç spermatid şeklinde maturasyon kazanır. En matür spermatogenik hücre geç spermatid olup Sertoli hücresi apikal bölümüne tutunmuş durumdadır. Seminifer tübül lümenine serbestleşmesiyle spermatozoan ismini alır.

Tunica (lamina) propria tipik fibroblastlardan yoksun çok tabakalı peritübüler bağ dokusudur. Tunica propria'yı oluşturan yapılar; bazal lamina, 3-5 tabaka miyoid hücre ve kollajen fibrillerdir.

2.3.2. İnterstisyel Doku Histolojisi

Seminifer tübüllerin arasında bulunan çok sayıda kan ve lenf damarlarını, sinir liflerini içeren gevşek bağ dokusu özelliğindeki alana interstisyel doku adı verilir. İnterstisyel dokuda normal bağ dokusu hücreleri olan fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar gibi hücrelerin dışında Leydig hücreleri de bulunmaktadır.

Leydig hücreleri interstisyel alanda tek tek veya gruplar halinde bulunur. Leydig hücreleri büyük, poligonal şekilli, eozinofilik hücreler olup ökromatik nükleusa sahiptir. Bu hücreler tipik olarak lipid damlacıkları içermesinin yanı sıra lipofuskin pigmenti ve sitoplazmik kristaller olan *Reinke* kristalleri bulundurur. Leydig hücreleri kolesterolden testosteron sentezlediği için, granülsüz endoplazmik retikulum ve tübüloveziküler kristal mitokondriyonlardan zengindir. Leydig hücreleri erken fetal yaşamda testosteron salgılamaya başlar ancak fetal hayatın 5.ayından başlayarak puberteye kadar inaktif hale geçer. Leydig hücreleri puberte döneminde artan LH seviyesiyle tekrar aktive olur ve androjen sentezi başlar. Testosteron embriyoda gonadların ve dış genital organların gelişimi için önemliyken, pubertede spermatogenezin başlatılması ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi açısından önemlidir. Yetişkinlik döneminde ise testosteron spermatogenez ve sekonder seks karakterlerinin devamlılığından sorumludur.

2.3.3. İntratestiküler Kanalların Histolojisi

Her seminifer tübül düz tübül veya *tubuli rekti* olarak bilinen kanallara açılır. Bu kanalların seminifer tübüllere yakın kısımları Sertoli hücreleri tarafından döşenirken, *rete testise* yakın olan kısımları ise tek katlı kübik epitelle döşelidir.

Düz tübüller mediastinum testis içinde karmaşık bir ağ şeklinde biribiriyle bağlantılı kanallardan oluşan *rete* testise boşalır. *Rete* testisin kanalları tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitelle döşelidir. Bu hücreler bir apikal silyuma ve birkaç kısa apikal mikrovillusa sahiptir.

2.3.4. Spermatogenez

Spermatogonyumdan sperm gelişim sürecine spermatogenez ismi verilir. Puberteden kısa süre önce hipofize ait gonadotropinlerin seviyesinin artması neticesi başlar ve yaşam boyu sürer. Üç farklı faza ayrılmaktadır.

Spermatogonyal faz

Spermatogonyal kök hücreler çok sayıda mitoz geçirerek, nüklear görünümleri farklı olan spermatogonyal soylar üretirler.

Tip A koyu spermatogonyum, ince granüllü kromatinli, yoğun bazofilik, oval nükleuslu hücrelerdir. Seminifer epitelin kök hücreleri olan bu hücreler düzensiz aralıklarla mitozla çoğalarak bir çift tip A koyu spermatogonyum ve bir çift tip A açık spermatogonyum oluştururlar.

Tip A açık spermatogonyum, açık renk boyanan ince granüllü kromatinli, oval nükleuslu hücrelerdir. Bu spermatogonyumlar spermi oluşturan farklılaşma sürecine y nlenmişlerdir. Ardışık birkaç mitoz geçirerek sayılarını arttıırırlar.

Tip B spermatogonyum, merkezi bir nükleolus ve onun çevresinde yoğunlaşmış kromatin bulunan yuvarlak nükleuslara sahip hücrelerdir. Spermatogonyal fazdaki son aşamadır.

Bir Tip A koyu spermatogonyum mitozla bölünerek tip A açık spermatogonyumları oluştururken, alışılmadık olan kardeş hücrelerin ince sitoplazmik bir köprüyle birbirine bağlı kalmasıdır. Bu sitoplazmik bağlantılar spermatid maturasyonun son evresine kadar görülmektedir. Böylece başlangıçtaki tip A açık spermatogonyum çiftinin tüm soyu inci dizisi gibi biribiriyle sitoplazmik olarak bağlantılıdır.

Spermatozit Fazı

Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatozitleri meydana getirir. Primer spermatozitler mayoz I'e girerler. İnsan primer spermatozitlerinin birinci mayotik profaz dönemi 22 gün kadar sürebilmektedir. Birinci mayotik bölünmenin neticesinde oluşan hücreler sekonder spermatozitlerdir. Bu hücreler DNA replikasyonu olmadan mayoz II'ye girerler bu nedenle birinci mayoz bölünmeye göre daha kısa sürede gerçekleşir. Sonuçta haploid DNA içeren spermatidler oluşur.

Spermatid Fazı

Bu dönemde spermatidler olgun spermilere farklılaşırken yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye uğrarlar. Bu farklılaşma sürecine spermiyogenez adı da verilir. Dört fazdan oluşmaktadır.

Golgi Fazı

Spermatidin çok sayıda Golgi kompleksinde kümelenen proakrozomal granüller bir araya gelerek akrozomal vezikülü oluşturur. Akrozomal vezikül nüklear zarfa komşu ve membranla sınırlandırılmış bir yapı olup pozisyonu spermin ön kutbunu belirler. Bu dönemde akrozomal vezikül içeriği artar ve genişler. Sentriyoller spermatidin arka kutbuna göç eder ve sperm kuyruğunun aksoneminin inşası başlar.

Kep Fazı

Bu dönemde akrozomal vezikül nükleusun ön yarısı üzerine yayılır. Bu yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal kep ismi verilir. Akrozomal kepin altındaki nüklear membran porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Bu dönemde nüklear içerik de yoğunlaşır.

Akrozom Fazı

Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar. Baş Sertoli hücresi içine iyice gömülürken, gelişmekte olan flajellum seminfer tübül lümenine doğru uzanır. Spermatidin kondanse nükleusu yassılaşır ve uzar. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom plazma membranının ön kısmına komşu bir pozisyona taşınır ve sitoplazma posteriora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomun arka kısmından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan manşeti oluştururlar.

Flajellum oluşumun başlatmış olan sentriyoller geriye yani nükleusun arka yüzeyine taşınırlar. Bağlantı parçası veya boyun bölgesi olarak adlandırılan yapıyı oluşturmak üzere modifiye olurlar.

Plazma membranı büyümekte olan flagellumu sarmak üzere posteriora hareket ederken manşet kaybolur. Mitokondriyonlar boyun bölgesinin hemen posterioruna sıkı, heliks tarzda bir kılıf oluşturmak üzere göç ederler. Bu bölge sperm kuyruğunun orta parçasını oluşturur. Orta parçanın distalinde esas parça uzanır. En distalde uzanan kısa segment ise son parçayı oluşturur.

Olgunlaşma Fazı

Bu son fazda flajella etrafındaki fazla sitoplazma atılır ve olgun spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik olarak adlandırılan bu yapılar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. İntersellüler köprüler rezidüel cisimciklerin içinde kaldığı için spermatidler artık birbirine bağlı değildir.

Olgunlaşma fazının sonuna doğru uzamış spermatidler, Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salıverilirler. Bu sürece spermiyasyon adı verilir.

2.3.5. Matür Sperm Yapısı

Olgun insan spermi yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Sperm başı yassı ve sivridir. Nükleusun ön üçte ikilik bölümünü saran akrozomal kep, ovumun zona pellusidasının delinmesi için gerekli enzimleri barındırır. Sperm kuyruğu boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölüme ayrılır. Kısa olan boyun segmenti kaba fiberlerin başlangıçlarını ve sentriyolleri içerir. Orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğundadır ve mitokondriyonları içerir. Esas parça yaklaşık 40 µm uzunluğunda olup aksonemal kompleks, kalın fiberler ve bunların dışındaki fibröz kılıfı içerir. Son parça flajellumun yaklaşık 5 µm'lik son kısmıdır ve yalnızca aksonemal kompleksi içerir.

Seminifer tübülde yeni salıverilen sperm hücreleri hareketsizdir. Epididimiste işlem görür ve burada hareketlilik kazanıp ileri olgunlaşmaya uğrarlar.

2.4. Testis Fizyolojisi

Erkekte üreme işlevleri üç büyük alt gruba ayrılabilir: Spermatojenez, çeşitli hormonlarla erkek üreme işlevlerinin düzenlenmesi ve erkek cinsel davranışlarının gerçekleştirilmesi (18). Testis fizyolojik şeması Şekil 2.4.'de gösterilmiştir.

2.4.1. Spermatojenez

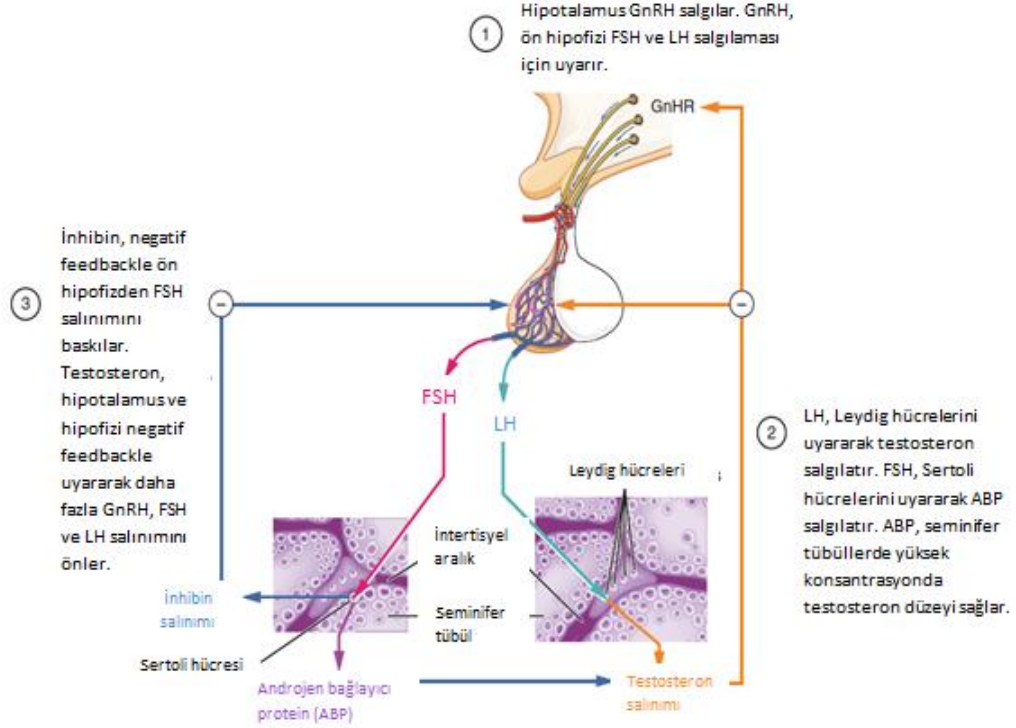
Embriyo gelişimi sırasında primordiyal germ hücreleri testise göç eder ve seminifer tübüllerin iç yüzeylerinde spermatogonyum adı verilen olgunlaşmamış germ hücrelerine dönüşürler. Spermatogonyumlar puberteden başlayarak mitoz bölünmeye uğrar ve sürekli bir proliferasyon gösterir, devamında ise sperm oluşumu için gerekli olgunlaşma basamaklarından geçer.

Spermatojenez ön hipofiz gonodotropik hormonların uyarısı ile yaklaşık 13 yaşında başlar ve yaşam boyu devam eder. Fakat ileri yaşlarda spermatojenez belirgin şekilde azalır. Spermatojenez yaklaşık 74 gün sürer. Seminifer tübül lümenine serbestleşen sperm hareketsizdir. Epididim tübüllerine doğru yolculuğu günler sürer. Epididimiste 18-24 saat kaldıktan sonra hareket yeteneği kazanırlar ama ejakülasyona kadar epididim sıvısında bulunan baskılayıcı proteinlerle hareketleri engellenir.

Genç erişkinlerin iki testisi bir günde yaklaşık 120 milyon sperm üretir. Bu spermlerin küçük bir bölümü epididimde depolanabilir ancak büyük bölümü vas deferenste depolanmaktadır. Spermler fertilizasyon özelliğini kaybetmeden en az bir ay depolanabilirler. Depolanma sürecinde kanalların sekresyon sıvılarında bulunan çeşitli maddeler spermlerin baskılanmış şekilde beklemesini sağlar, ancak ejakülasyondan sonra spermler hareketli hale gelirler.

Spermler, epididimisten ayrıldıktan sonra henüz olgun halde değildir. Ejekülasyon sonrası dişi genital kanalında ilerlerken olgunlaşma süreci gerçekleşir. Kapasitasyon adı verilen bu süreç 1-10 saat kadar sürebilir. Bu dönemin sonunda spermler ovumu fertilize edecek hale gelir.

2.4.2. Erkek Üreme İşlevlerinin Hormonlarla Düzenlenmesi



Şekil 2.4. Testis Fizyolojisi (20).

Testosteron

Testisler, testosteron, dihidrotestosteron ve androstenedion gibi androjenler olarak bilinen erkek cinsiyet hormonlarını salgılar. Testosteron diğer androjen hormonlara göre daha fazla bulunduğu için en önemli testis hormonu olarak kabul edilebilir.

Testosteron, interstisyel Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Leydig hücreleri erişkin testis kütlesinin yaklaşık %20'sini oluştururken, testosteronun salgılanmadığı çocukluk döneminde hemen hemen hiç görülmezler.

Yeni doğan erkek çocukta yaşamın ilk birkaç ayında ve puberte sonrası erişkin dönemde testosteron salgılanır. Testosteron embriyonik hayatın yaklaşık 7. haftasında testislerde görülmeye başlar. Erkek embriyoda görülen testosteron embriyonun erkek vücut özellikleri geliştirmesinden sorumludur. Gebeliğin son 2-3 ayında yeterli düzeyde testosteron salgılanması testislerin skrotuma inmesini sağlar. Puberte sonrası testosteron salgı miktarındaki artış ile birlikte penis, skrotum ve testislerde büyüme gerçekleşir. Buna ek olarak sekonder erkek cinsiyet özelliklerinin gelişmesine neden olur.

Bunların dışında testosteron vücut kıllarının dağılımına etki eder, erkek tipi kelliğe neden olur, larinks mukozasının hipertrofiye uğramasıyla erkek ses tipi kazanılmasını sağlar, deri kalınlığını artırır ve sivilce oluşumuna neden olabilir, protein sentezini ve kas gelişimini uyarır, kemik büyümesini ve Ca depolanmasını artırır, bazal metabolizmayı hızlandırır, eritropoezi artırır, sodyum ve suyun böbreklerden geri emilimini artırır.

Lüteinizan Hormon

Hipotalamustan gonadotropin serbesleştirici hormon (GnRH) sekresyonu ile hipofiz bezi ön lobundan LH veya FSH salgılanır.

Testislerde Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması yalnızca hipofiz bezinden salgılanan LH uyarısı ile gerçekleşir. Hatta salgılanan testosteron miktarı ile uyarıcı LH miktarı doğru orantılıdır. Testislerden sentezlenen testosteron hormonu negatif geri bildirim ile hipofizden LH sekresyonunu baskılar. LH miktarındaki azalma ise testislerden testosteron salgılanmasını azaltır.

Folikül Stimulan Hormon

Hipofiz bezinden salgılanan FSH, seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinde bulunan reseptörüne bağlanır. Bu olay hücrelerin büyümesine ve çeşitli spermatojenik maddelerin salgılanmasına neden olur. Aynı anda Leydig hücrelerinden sentezlenen testosteron hormonu da spermatojenez üzerine güçlü trofik etki gösterir. Bu nedenle spermatojenez süreci için FSH ve testosteron hormonlarının her ikisi de gereklidir.

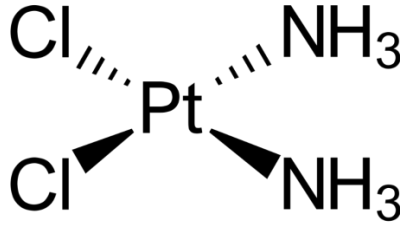
Seminifer tübüllerde sperm üretimi azaldığında ön hipofiz bezinden FSH salgısı belirgin şekilde artar. Aksine artan spermatojenez sürecinde Sertoli hücrelerinden inhibin hormonu salgılanır ve ön hipofiz bezi üzerine baskılayıcı etkisiyle FSH salgısını azaltır.

2.5. Sisplatin

Sisplatin kare düzlemsel geometriye sahip, platin içeren bir bileşiktir. Sisplatinin moleküler yapısının şematik diyagramı Şekil 2.5.'de gösterilmiştir. Oda sıcaklığında beyaz, koyu sarı veya sarı-turuncu kristal toz yapıdadır. Normal sıcaklık ve basınçlar altında stabildir.

Sisplatin ilk olarak 1844 yılında Peyrone tarafından sentezlenmiş ve kimyasal yapısı ilk olarak 1893 yılında Alfred Werner tarafından aydınlatılmıştır. 1965'te Rosenberg ve arkadaşları *Escherichia coli*'de hücre bölünmesini engelleyebildiğine dikkat çekmiştir. Sonrasında sisplatinin kanser kemoterapisinde olası kullanımına büyük ilgi duyulmuştur. 1970'lerin sonunda germ hücreli kanserlerin sistemik tedavisinde anahtar rol oynamıştır. 1978'de ise kanser tedavisi için FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı ilk platin bileşiği olmuştur (6).

Sisplatin sitoplazmaya girdiğinde, klorür atomları su molekülleri ile yer değiştirir ve aktive olur. Sonuçta proteinlerdeki sülfidril gruplarına ve nükleik asitlerdeki nitrojen atomlarına afinitesi olan bir elektrofil meydana gelir (21).



Şekil 2.5. Sisplatinin Moleküler Yapısının Şematik Gösterimi (22).

Sisplatinin hücre nükleusundaki genomik DNA'ya bağlanmasının, antitümör özelliklerinden büyük ölçüde sorumlu olduğu kabul edilir. Sisplatinin genomik DNA'ya bağlanması üzerine indüklenen hasar, normal transkripsiyon ve/veya DNA replikasyon mekanizmalarını etkiler. DNA mekanizmasındaki bu bozulmalar ise kanser hücresinin ölümüne yol açan sitotoksik süreci tetikler (23).

Sisplatinin, mitokondri yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği gösterilmiştir. Malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon yan ürünlerinin salınımı, proteinlerin karboksilasyonunu artırır, hücre zarlarının oksidatif hasarını indükler ve sonunda apoptozu tetikler. Ayrıca artan MDA üretimi, azalmış glutatyon (GSH) aktivitesi sonucu sisplatinin oksidatif stresi indükleyerek de DNA hasarına yol açtığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

Sisplatin ile indüklenen apoptozisin moleküler mekanizması, tümör proteini 53'ün (p53) aktivasyonunu, aktivatör protein (AP-1) bileşeninin fosforilasyonunu, p21'in uyarılması yoluyla hücre siklusunun durmasına yol açan siklin ve siklin bağımlı kinazların aşağı regülasyonunu içerir. Ayrıca mitokondriyal membran potansiyelini

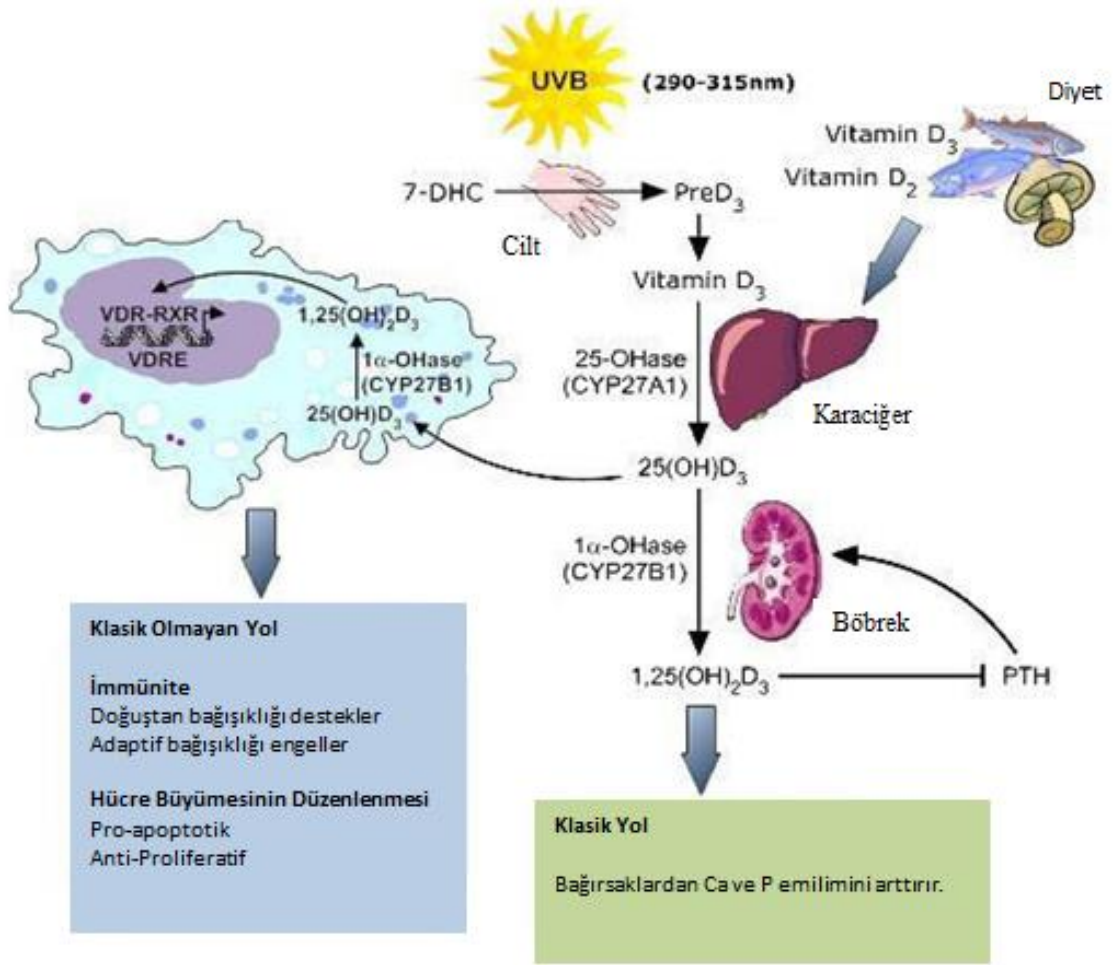
değiştirmesi neticesinde sitokrom C'nin salınması ve kaspaz 3 aktivitesinin artması sonucunda da apoptozis gerçekleşir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar, sisplatin kaynaklı hücre ölümünün sadece apoptozis yoluyla değil aynı zamanda nekroz ve otofaji yoluyla gerçekleştiğini göstermektedir (21).

Sisplatin baş-boyun, mesane, prostat, testis, meme, serviks, over kanserleri, osteojenik sarkom ve nöroblastoma gibi farklı kanser türlerine karşı kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bu tür kanserler son zamanlarda daha iyi prognoza sahip olmalarına ve bu nedenle yaşamı daha az tehdit etmelerine rağmen, tedavileriyle ilgili önemli zorluklar devam etmektedir. Bu zorluklar ilacın kullanımı neticesinde görülen hepatotoksisite, nefrotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite ve gonadotoksisite olarak sayılabilir (6).

2.6. D Vitamini

Vitamin D, yağda eriyen vitaminler arasında yer alır ancak aynı zamanda endojen olarak uygun biyolojik ortamda sentezlenebildikleri için steroid bir prohormondur (24).

Vitamin D, oral yolla alınabildiği gibi güneş ışınlarının etkisiyle deride 7-dehidrokolesterol'den de sentezlenebilir. Daha sonra iki enzimatik adımıyla VD'nin aktifleştirilmesi gerekir. nce karaciğerde 25-hidroksilaz (CYP2R1 veya CYP27A1) tarafından 25-hidroksikolekalsiferol ($25(\text{OH})\text{D}_2$ veya kasidiol)'e sonrasında ise böbreklerde 1α -hidroksilaz (CYP27B1) tarafından aktif form olan $1,25$ -dihidroksikolekalsiferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ veya kasitiriol)'e dönüştürülür. Kalsitriol biyolojik etkilerini hedef hücre nükleuslarında bulunan VDR'lerine bağlanarak gösterir. VD ve metabolitleri birçok dokuda bulunan 24 -hidroksilaz enzimiyle inaktive edilir ve safra yoluyla atılır (24,25). VD fizyolojisi şematik diyagramı şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. D Vitaminin Fizyolojisinin Şematik Gösterimi (26).

Vitamin D'nin en bilinen etkisi Ca-P metabolizması ve kemik mineralizasyonu üzerinedir. Ancak son yıllarda sitoprotektif etkileri olduğu da gösterilmiştir (27). Ayrıca VDR, Ca homeostazında etkin görev alan bağırsak, böbrek, paratiroid bezi ve kemik gibi organlarda yüksek düzeyde görülmesinin yanı sıra akciğer, pankreas, hipofiz, timus, meme bezi, testis ve prostat gibi organlarda da gösterilmesi VD'nin Ca metabolizması dışında görevleri olduğuna işaret etmektedir (28).

Vitamin D reseptörlerinin testis, epididimis, prostat, seminal vezikülde gösterilmiş olması ve Ca iyonunun spermatogenez, sperm motilitesi ve akrozomal reaksiyon için gerekliliği ve VD'nin erkek fertilesi üzerine rol oynadığını düşündürmektedir (25). Bu nedenle son zamanlarda araştırmacılar için VD ile erkek fertilesi arasındaki ilişki ilgi çekmektedir (29). VD eksikliği olan erkek sıçanlarda yapılan çalışmalar, sperm sayılarında azalma olduğunu ve bu sıçanlardan alınan semen ile tohumlanan dişi sıçanların doğurganlık oranlarının daha düşük olduğunu göstermiştir

(30,31). Diyabetik erkek ratlarda yapılan bir çalışmada ise VD takviyesinin testis fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (32). Yakın zamanda insanlarda yapılan bir çalışmada ise düşük VD seviyesinin kötü semen kalitesiyle ilişkili olduğu grlmştir (29)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Sisplatin için Koçsel'in Cipintu 100 mg/100 ml ve VD için Deva'nın 300.000 IU/ml Devit-3 ampul kullanılmıştır.

3.2. Deney Hayvanları

Malatya İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden 230-300 gr ağırlığında 12 haftalık toplam 28 erkek *Wistar albino* Sıçan temin edildi. Sıçanlar, temiz plastik kafesleri olan iyi havalandırılmış bir odada 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde sabit oda sıcaklığında (23°C–24°C) ve bağıl nemde (%50–55) barındırıldı. Yem ve su günlük olarak değiştirildi ve *ad libitum* olarak verildi. Tüm prosedürler, Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün hayvan araştırmaları yönergeleri ile uyumlu olarak gerçekleştirildi.

3.3. Etik Beyan

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (HAYBİS NO:11409) ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2021-2533 proje koduyla finanse edilmiştir.

3.4. Deneysel Tasarım

Hayvanlar randomize olarak kontrol ve VD grubunda 6 adet, sisplatin ve sisplatin+VD grubunda 8 adet olmak üzere toplamda dört gruba ayrıldı (toksik bir madde olduğu için sisplatin verilen gruplarda biyoistatistiğin belirlediği sayıdan 2 fazla hayvan kullanıldı). Hayvanların deney başlangıcındaki ağırlıkları kaydedildi ve 1 haftalık alışma sürecinden sonra gruplara aşağıda belirtilen uygulamalar yapıldı.

Kontrol Grubu: Bu gruba çözücü ajan uygulandı.

VD Grubu: Bu gruba gün aşırı 1000 IU/kg intra peritoneal (i.p) VD uygulandı. VD dozu ve uygulama süreleri için Sepideh ve ark. çalışması (27) ile BaSalamah ve ark. çalışması (10) referans alındı.

Sisplatin Grubu: Bu gruba iki doz halinde olmak üzere toplam 14 mg/kg sisplatin i.p olarak uygulandı. Ayrıca bu gruptaki sıçanlara gūnaşırı çözücü ajan i.p olarak verildi.

Sisplatin dozu ve uygulama süreleri için Öztürk ve ark. çalışması (33), Hassan ve ark. (34) çalışması ile Ekmekçi ve ark. (35) çalışması referans alındı.

Sisplatin+VD Grubu: Bu gruba iki doz halinde olmak üzere toplam 14 mg/kg sisplatin i.p ve gün aşırı 1000 IU/kg i.p VD uygulandı.

3.5. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması

10 günlük deney süresinin ardından sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü ve sonra 5 mg/kg *xylazine* ile 50 mg/kg *ketamin* i.p uygulandı. Genel anestezi altında orta hat insizyonu ile batinları açıldı. *Vena cava inferior*dan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 3000 xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serum eppendorf tüplere alındı ve biyokimyasal değerlendirmelerde kullanılmak üzere -80 C°'de saklandı. Deneklerden alınan her iki testis dokusu tartıldıktan sonra histolojik analizler için sol testis %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı, sağ testis ise biyokimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere -80 C°'de muhafaza edildi. Sperm parametre değerlendirmeleri için epididimisin kauda kısımlarından sperm örnekleri elde edildi. Doku ve kan örneklerinin toplanması sonrasında yüksek doz anestezi ile hayvanlara ötenazi uygulandı.

3.6. Histolojik Doku Takip, Boyama ve İnceleme

Histopatolojik değerlendirme için dokular tespit ve takip işlemlerinden geçirildi. Doku %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Doku örnekleri daha sonra trimlenerek plastik doku takip kasetlerine konuldu ve formaldehit solüsyonu yenilendi. 24 saatlik bu fiksasyon işleminin ardından Tissue-Tek VIP/SAKURA marka doku takip cihazında rutin doku takip basamaklarından geçirildi. Doku takip işlemleri tamamlanan doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 4'er µm'lik kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla hematoxilen-eozin (HE) ve bazal membran değişikliklerini incelemek amacıyla periyodik acid schiff (PAS) boyama metodu uygulandı. Ayrıca kesitler kaspaz-3 ve VDR primer antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyandı. Preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q (Leica Micros Imaging solution Ltd, Cambrige, UK) görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi.

3.6.1. Histolojik Doku Takip İşlemleri

Tablo 3.1. Histolojik Doku Takip İşlemleri

Histolojik Doku Takip İşlemleri	
1.%10'luk formaldehit	40 dakika
2.%10'luk formaldehit	40 dakika
3.%80'lik alkol	1 saat
4.%96'lık alkol	1 saat
5.%96'lık alkol	1 saat
6.Absolü alkol	1 saat
7.Absolü alkol	1 saat
8.Ksilen	1 saat
9.Ksilen	1 saat
10.Ksilen	1 saat
11.Parafin	1 saat
12.Parafin	1 saat
13.Parafin	1 saat
14.Parafin	1 saat

3.6.2. Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu

Tablo 3.2. Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu

Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu	
1.İnkübasyon	60 °C, 1 saat
2.Ksilen	5 dakika x 3 kez
3. Absolü alkol	3 dakika
3.%96'lık alkol	3 dakika
4.%80'lik alkol	3 dakika
5.%70'lik alkol	3 dakika
6.Distile au	5-10 saniye
7.Mayer's hematoxylen	10 dakika
8.Çeşme suyunda yıkama	5 dakika x 3 kez
9.Eosin	2 dakika
10.%96'lık alkol	3 dakika x 2 kez
11.Absolü alkol	3 dakika x 2 kez
12.Ksilen	5 dakika x 3 kez

3.6.3. Periodic Acid Schiff Boyama Metodu

Tablo 3.3. Periodic Acid Schiff Boyama Metodu

Periodic Acid Schiff Boyama Metodu	
1.Periyodik asit (0.5 g + 100 ml distile su)	5 dakika
2.Distile su	3 dakika
3.Schiff	20 dakika
4.Çeşme suyu	15 dakika
5.Distile su	3 dakika
6.Hematoksilen	10 dakika
7.Çeşme suyu	3 dakika
8.Absolü alkol	3 dakika x 3 kez
9.Ksilen	3 dakika x 3 kez

3.6.4. İmmünohistokimya Boyama Metodu

Tablo 3.4. İmmünohistokimya Boyama Metodu

İmmünohistokimya Boyama Metodu	
1.Rutin deparafinizasyon işlemi	
2.Antijen retrieval	Sitrat tamponu içinde, 121 °C, 15 dakika
3.Distile su	1 kez yıkama
4.PBS	1 kez yıkama
5.Hidrojen peroksit blok	10 dakika
6.PBS	1 kez yıkama
7.Protein blok (UV block)	5 dakika
8.Primer antikor (VDR & Kaspaz-3)	1 saat
9.PBS	1 kez yıkama
10.Sekonder antikor	15 dakika
11.PBS	1 kez yıkama
12.Streptevadin peroksidaz (HRP)	15 dakika
13.PBS	1 kez yıkama
14.AEC kromojen	5 dakika
15.PBS	1 kez yıkama
16.Distile su	1 kez yıkama
17.Hematoksilen	3 dakika
18.Musluk suyu	3 kez yıkama
19.Distile su	1 kez yıkama

3.6.5. Histolojik Değerlendirme

Seminifer Tübüllerin Çap Ölçümü

Ölçüm X200 büyütme altında her bir preparattan yuvarlak veya yuvarlağa yakın 20 seminifer tübülde gerçekleştirildi. Her tübül için kısa ve uzun kenar uzunlukları ölçüldü ve ortalama değer kaydedildi.

Seminifer Tübüllerin Epitel Kalınlığı Ölçümü

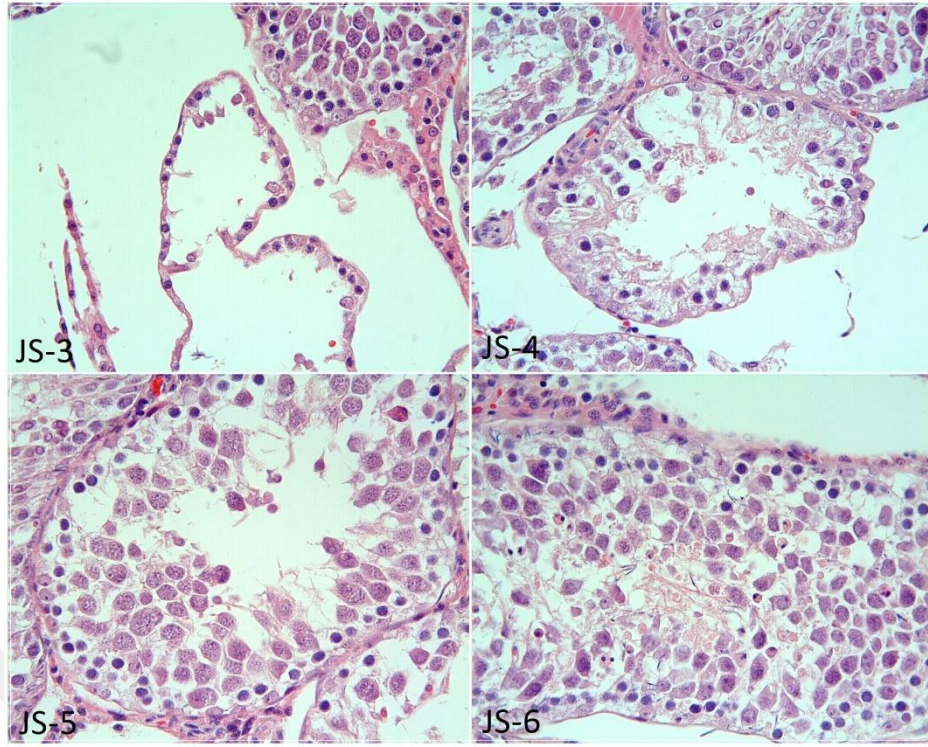
Ölçüm X200 büyütme altında her preparat için 7-8.evrelerde olan 20 seminifer tübülün en ince ve en kalın yerleri dâhil olacak şekilde 4 farklı yerden gerçekleştirildi. Her bir seminifer tübül için bu 4 ölçümün ortalaması kaydedildi.

Johnsen Skoru

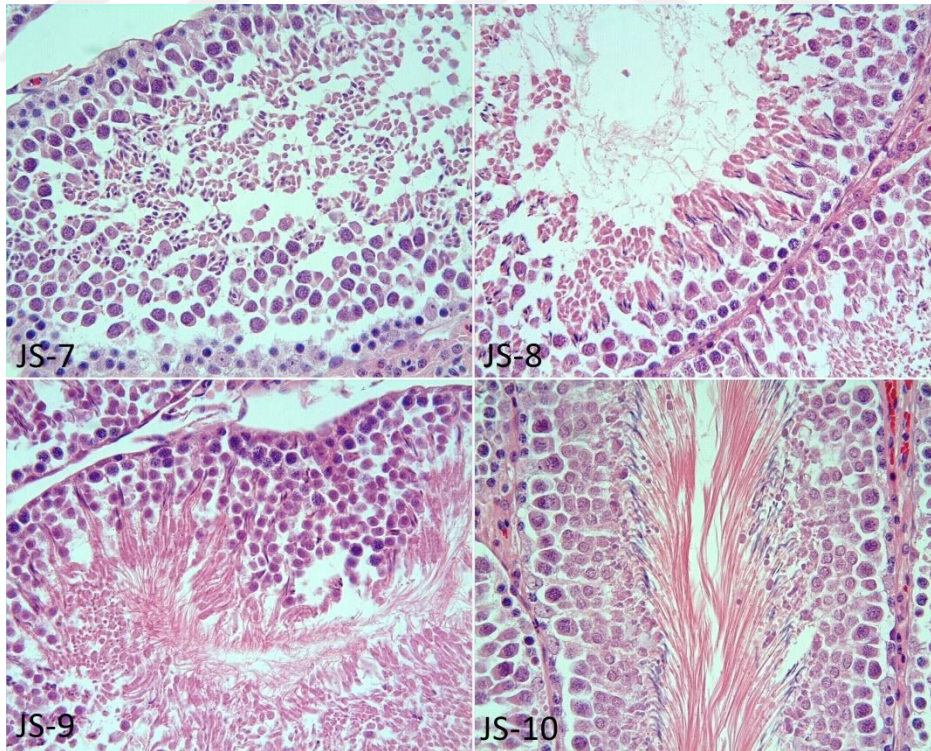
HE boyama yapılarak incelenen dokuların değerlendirilmesinde, Johnsen testiküler histolojik hasar skor metodu kullanıldı (36). Çalışmamızda skorlara denk gelen seminifer tübül ışık mikroskopik görüntüleri Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Johnsen Skoru

Skor	Histolojik Bulgular
1	Seminifer tübülde hiç hücre yok
2	Germinal hücreler yok sadece Sertoli hücresi var
3	Germinal hücrelerden sadece spermatogonia var
4	Spermatozoa ve spermatid yok, az sayıda spermatosit var
5	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
6	Spermatozoa yok, az sayıda spermatid var
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var
8	Seminifer tübülde az sayıda spermatozoa var
9	Çok sayıda spermatozoa var ancak spermatogenezde organizasyon bozuk
10	Komplet spermatogenez



Şekil 3.1. Seminifer tübüllerin Johnsen skoru (JS) 3-4-5-6'ya karşılık gelen mikroskopik görüntüleri. HE, X200.



Şekil 3.2. Seminifer tübüllerin Johnsen skoru (JS) 7-8-9-10'a karşılık gelen mikroskopik görüntüleri. HE, X200.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Testis dokusunda pozitif immünoreaktiviteyi değerlendirmek için her örnekten 10 farklı alan X400 büyütmede incelendi. İncelemede ortalama kaspaz-3 (SantaCruz) ve VDR (SantaCruz) immünopozitif hücre sayısı ölçüldü.

3.6.6. Sperm Morfoloji ve Vitalite Değerlendirmesi

Sperm analizi için sağ testisten ayrılan epididimisin kauda kısmı kullanıldı. 1 mililitre G-IVF solüsyonu içeren petri kabında küçük parçalara ayrıldı. Devamında pastör pipeti yardımıyla al-ver şeklinde likefaksiyon olması sağlandı. Rodajlı lamın rodajsız kısmına yakın pastör pipeti aracılığıyla bir damla alındı. Başka bir lam 30-40 ° açıyla damlanın önüne getirildi. Geriye doğru damlayla temas ettirildikten sonra damla yayıcı lamın eni boyunca yayıldı. Devamında düzgün ve hızlı bir şekilde yayıcı lam ileriye doğru sürülerek yayma işlemi tamamlandı. Bu ilk yayma kuruduktan sonra VitalScreen sperm *morphology* boyası ile prosedüre uygun şekilde boyandı. Geriye kalan semen örneği VitalScreen eozin-nigrozin vitalite boyası ile prosedüre uygun şekilde karıştırıldı. Bu karışımdan başka bir rodajlı lama pastör pipeti aracılığıyla bir damla alındı. Ve yukarıda anlatıldığı gibi bu karışım lama yayıldı. Yaymalar kuruduktan sonra ışık mikroskopik inceleme için hazır hale geldi.

Morfolojik olarak sperm, kurutulmuş semen yayması lamaların sperm *morphology* boyası ile boyanmasıyla değerlendirildi. İnceleme X400'lık büyütmede Leica DFC280 ışık mikroskopunda yapıldı. Her gruptan 6 örnek olmak üzere her örnek için 100 adet sperm incelendi. Sperm morfolojik olarak; normal, baş-boyun anomali ve kuyruk anomali olmak üzere 3 sınıfa katagorize edildi.

Vitalite olarak sperm, eozin-nigrozin ile karıştırılmış yaymaların kuruması sonrası X400'lık büyütmede Leica DFC280 ışık mikroskopunda değerlendirildi. Boyanmış sperm ölü kabul edilirken, boyanmamış sperm canlı kabul edildi. Sperm vitalite değerlendirilmesi Şekil 3.3.'de gösterilmiştir. Her gruptan 6 örnek olmak üzere her örnek için 100 adet sperm incelendi. Her örnek için yüzde canlılık kaydedildi.



Şekil 3.3. Sperm vitalite değerlendirmesi. Canlı sperm (ok), ölü sperm (ok başı). Eozin-nigrozin, X1000.

3.6.7. Sperm Sayımı Yapılması

Sperm sayımı için sol testisten ayrılan epididimisin kauda kısmı kullanıldı. 1 mililitre G-IVF solüsyonu içeren petri kabında doku küçük parçalara ayrıldı ve inkübasyona bırakıldı. Sonrasında parçalara ayrılan doku, G-IVF solüsyonuyla birlikte eppendorf tüplere alındı. 5000 xg de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmından mikropipet yardımıyla Thoma lamına örnek alındı. Sperm sayımı X400'lık büyütmede Leica DFC280 ışık mikroskopunda yapıldı. Her gruptan 6 örnek değerlendirildi ve sperm sayısı kaydedildi.

3.7. Biyokimyasal Tahlil

FSH, LH, Testosteron, Östrojen, Ca, VD

Sıçanlardan anestezi altında alınan kanlar jelli biyokimya tüpüne alınarak 3000 rpm 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen serum, eppendorf tüplere alınarak -80 °C'de saklandı. Çalışmada numunelerdeki sıçan FSH, LH, testosteron, östrojen, VD ve Ca seviyelerini test etmek için çift-antikorlu sandviç

teknigine dayanan SunRed marka rat spesifik ELISA kitleri kullanıldı. FSH için SunRed marka rat spesifik 201-11-0183 katalog no'lu, LOT numarası 202201 FSH ELISA kiti kullanıldı. LH için SunRed marka rat spesifik 201-11-0180 katalog no'lu, LOT numarası 202201 LH ELISA kiti kullanıldı. Testosteron için SunRed marka rat spesifik 201-11-0735 katalog no'lu, LOT numarası 202201 testosteron ELISA kiti kullanıldı. Östrojen için SunRed marka rat spesifik 201-11-0177 katalog no'lu, LOT numarası 202203 östrojen ELISA kiti kullanıldı. VD için SunRed marka rat spesifik 201-11-0016 katalog no'lu VD ELISA kiti kullanıldı. Ca için SunRed marka rat spesifik 201-11-0949 katalog no'lu, LOT numarası 202201 Ca ELISA kiti kullanıldı. Numuneler, ölçülecek molekülün monoklonal antikoruyla kaplı kuyucuklara eklendi daha sonra ölçülecek molekülün biotinle etiketli antikor (sekonder antikor) ve streptavidin-HRP kuyucuğa eklendi. İmmün kompleks oluşması için inkübe edildi. İmmün kompleks kuramayan enzimler yıkama ile uzaklaştırıldı. Kuyucuklara kromojen A ve B çözeltileri eklendi ve kısa bir inkübasyon sonrası renk maviye döndü. En son olarak kuyucuklara asit eklenerek reaksiyon durduruldu ve renk maviden sarıya döndü. Oluşan rengin şiddetinin spektrofotometrede 450 nm'de verdiği absorbans, numuneden ölçülecek molekülün konsantrasyonu ile doğru orantılı kabul edildi ve her numune için sonuçlar kaydedildi.

İnorganik Fosfat

İnorganik fosfat ölçümünde LOT numarası EK2101P olan Rel Assay markalı kit kullanıldı. P tayini için doğrudan bir yöntem tercih edildi. P, asit ortamında amonyum molibdat ile reaksiyona girerek sarı renkli bir fosfomolibdat kompleksi oluşturur. Oluşan rengin yoğunluğu 340 nm'de, numunedeki P konsantrasyonu ile orantılıdır (37). Her numune için spektrofotometrede okunan değer kaydedildi.

Total Oksidan Seviye

Total oksidan seviye (TOS) ölçümünde LOT numarası KM21136O Rel Assay markalı kit kullanıldı. Kit çalışma prosedüründe belirtilen sıralı adımlar takip edilerek uygulama gerçekleştirildi. Kitin çalışma prensibi, numune ortamında bulunan oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla okside etmesine dayanmaktadır. Asidik bir ortamda ferrik iyonların kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirmesi sonucu oluşan rengin yoğunluğunun spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda ölçümü, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarını litre

başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri olarak vermektedir (38). Her numune için spektrofotometrede okunan değer kaydedildi.

Total Antioksidan Seviye

Total antioksidan seviye (TAS) ölçümünde LOT numarası EK21122A olan Rel Assay markalı kit kullanıldı. Kit çalışma prosedüründe belirtilen sıralı adımlar takip edilerek uygulama gerçekleştirildi. Kitin çalışma prensibi, numune ortamında bulunan antioksidanların koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüştürmesine dayanmaktadır. Spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda absorbans değişimi, numunede bulunan toplam antioksidan molekül seviyesini bir E vitamini analogu olan *Trolox* Eşdeğeri ile vermektedir (39). Her numune için spektrofotometrede okunan değer kaydedildi.

3.8. İstatiksel Analiz

Sayısal veriler ortanca, minimum ve maksimum değerler ile özetlenmiştir. Bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır. İki bağımlı ölçüm, Wilcoxon eşleştirilmiş iki örneklem testi ile karşılaştırılmıştır. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcı ve deney sonu vücut ağırlıkları bakımından sisplatin ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, sıçanların vücut ağırlıkları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p=0.046$). Sisplatin grubuna VD uygulanması sonucu vücut ağırlık kaybında değişiklik gözlenmedi ($p>0.05$). Deney başlangıcı ve deney sonu hayvan ağırlıkları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Hayvan Ağırlıklarının Karşılaştırılması

	İlk Ağırlık			Son Ağırlık			p
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	
Kontrol^a	220,00	195	230	246,50	209	254	0,075
Cis^b	281,50	275	292	201,00	148	282	0,046
Cis+D Vit^b	247,00	223	267	203,50	156	242	0,028
D Vit^a	228,50	210	239	243,50	221	271	0,116

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonu testis ağırlıkları bakımından sisplatin ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, sıçanların testis ağırlıkları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Testis ağırlıkları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması

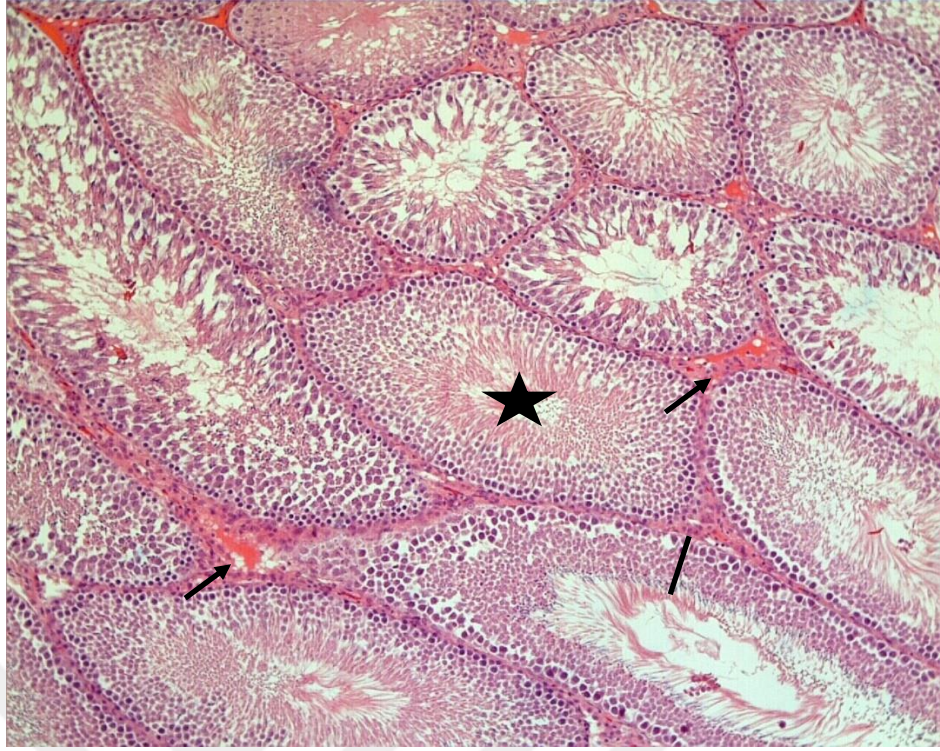
	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D Vit (n=6)	D Vit (n=6)	p
Testis Ağırlığı	1,295 (1,08-1,44)	1,225 (0,7-1,35)	1,255 (1,02-1,39)	1,245 (1,06-1,29)	0,709

Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

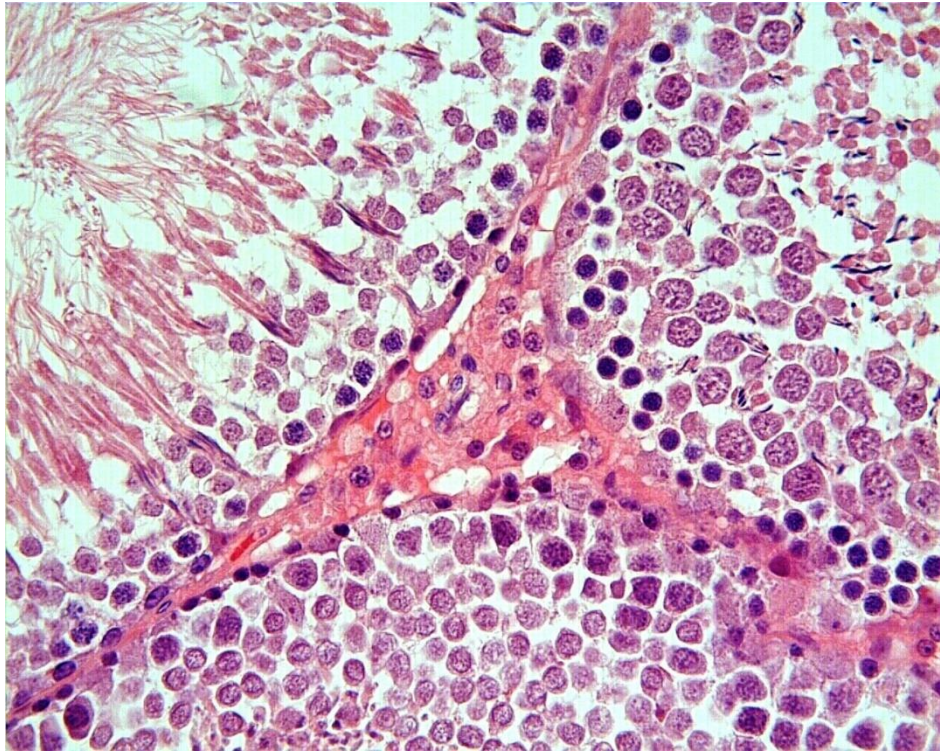
4.3. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol Grubu

HE boyama metodu uygulanmış kesitlerde testis içerisinde yer alan seminifer tübüller normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.1,2).

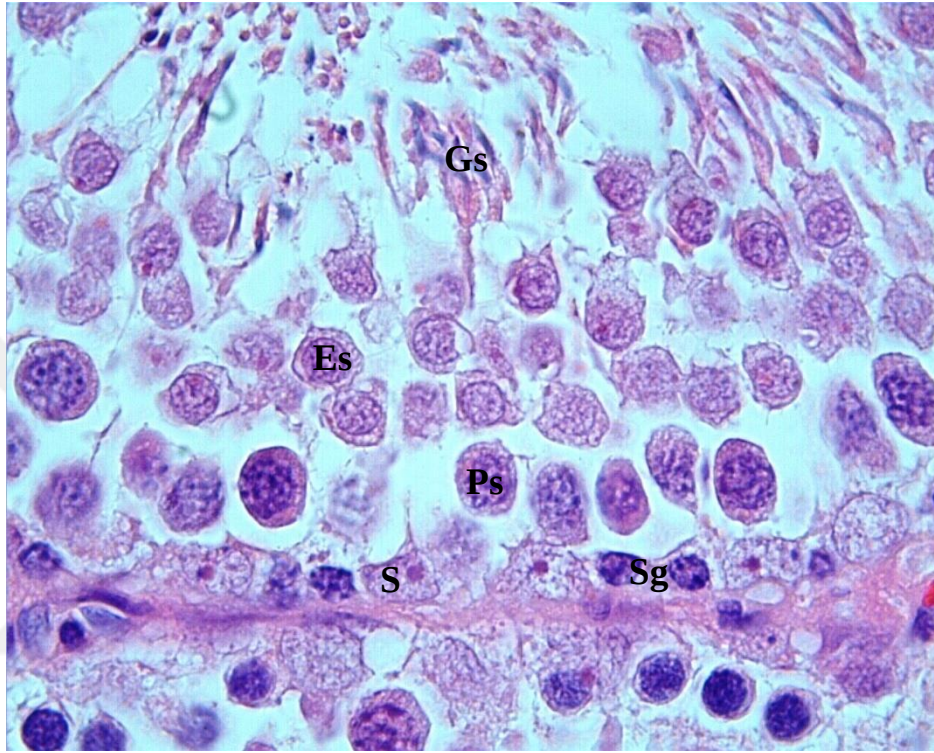


Şekil 4.1. Kontrol grubu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (yıldız), interstisyel alan (ok) ve spermatogenik hücreler (çizgi) izlenmekte. HE, X100.



Şekil 4.2. Kontrol grubu. İnterstisyel alan, Leydig hücreleri ve spermatogenik seri hücreler normal histolojik görünümde izlendi. HE, X400.

Tübüller belirgin bir bazal lamina üzerine oturmuş seminifer epitelinden oluşmaktaydı. Seminifer epitelindeki Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri belirgin olarak ayırt edilmekteydi. Seminifer tübüllerin çoğunluğunda lümende spermatozoa izlendi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Kontrol grubu. Bazal membran üzerine dizilmiş Sertoli (S) ve spermatogonyum hücreleri (Sg) ile lümene yakın yerleşmiş primer spermatosit (Ps), erken (Es) ve geç spermatidler (Gs) izlenmekte. HE, X1000.

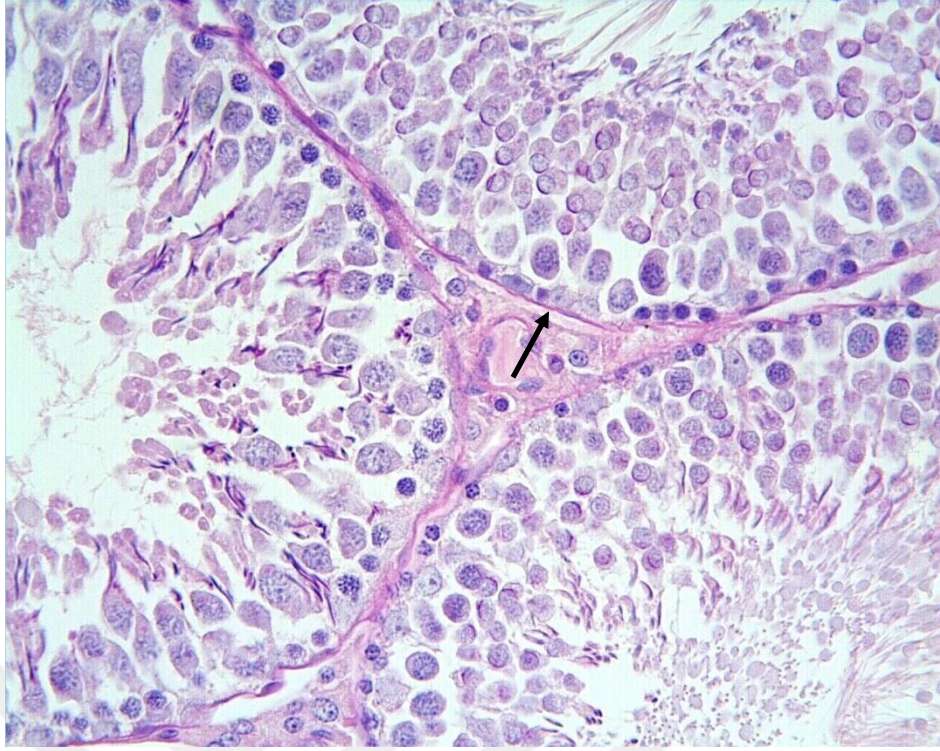
Bu grupta ortalama seminifer tübül çapları 169,588 μm ve ortalama germinal epitel yüksekliği ise 85,814 μm olarak ölçüldü. Ayrıca Johnsen skoru ortalaması 8,75 olarak tespit edildi. Grupların seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve Johnsen skoru karşılaştırılması Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

PAS boyanan kesitlerde, tübüllerin arasındaki interstisyel bağ doku içerisinde Leydig hücreleri bulunmaktaydı. Seminifer tübüllerin bazal membranları PAS pozitif boyanmış, ince ve düzgün olarak izlendi ve normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.4.).

Seminifer tübüllerde özellikle spermatidlerin sitoplazmik artıklarının kaspaz-3 ile pozitif boyandığı görüldü ( ekil 4.5.). Bu grupta pozitif boyanan spermatogenik hücrelere rastlanmadı. Grupların kaspaz-3 pozitifliğinin karşılaştırılması Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

VDR boyama metodu uygulanmış kesitlerde pozitif boyanmış seminifer tübüller izlendi ( ekil 4.6,7.). Grupların VDR pozitifliğinin karşılaştırılması Tablo 4.4’te gösterilmiştir.

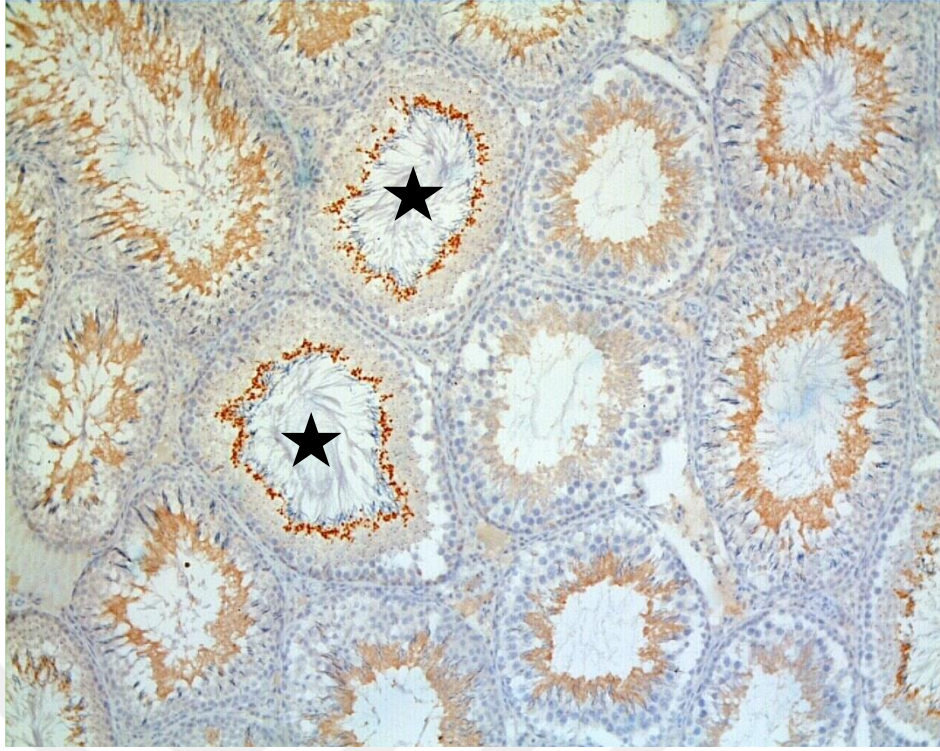




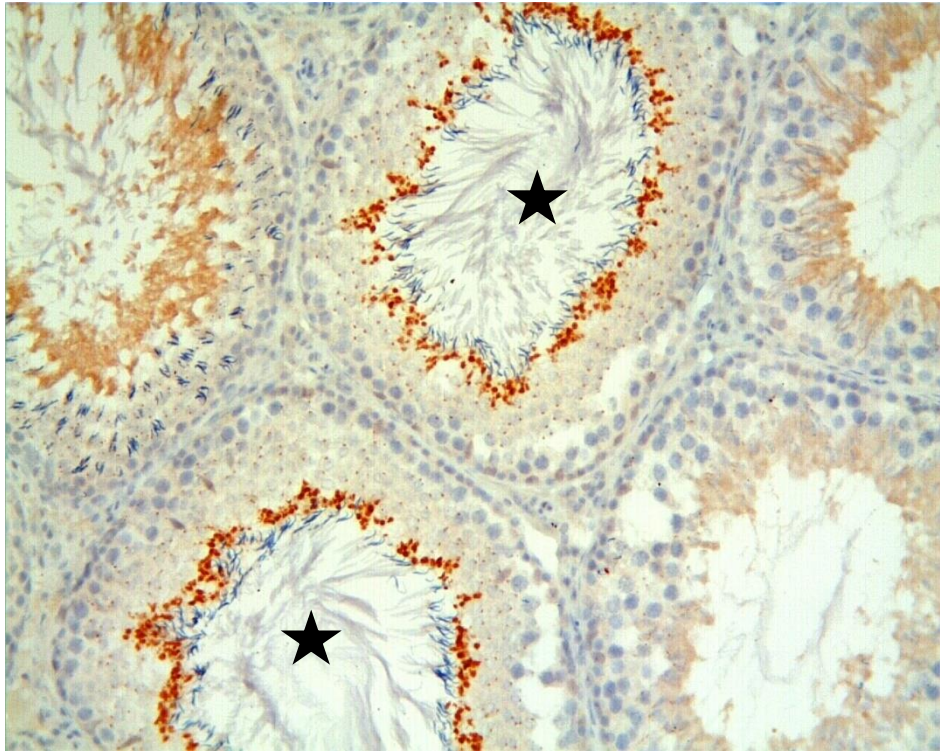
Şekil 4.4. Kontrol grubu. Seminifer tübüllerin bazal membranları PAS pozitif boyanmış, ince ve düzgün olarak izlendi (ok). PAS, X400.



Şekil 4.5. Kontrol grubu. Kaspaz-3 pozitif spermatogenik hücrelere rastlanmadı. IHC, X400.



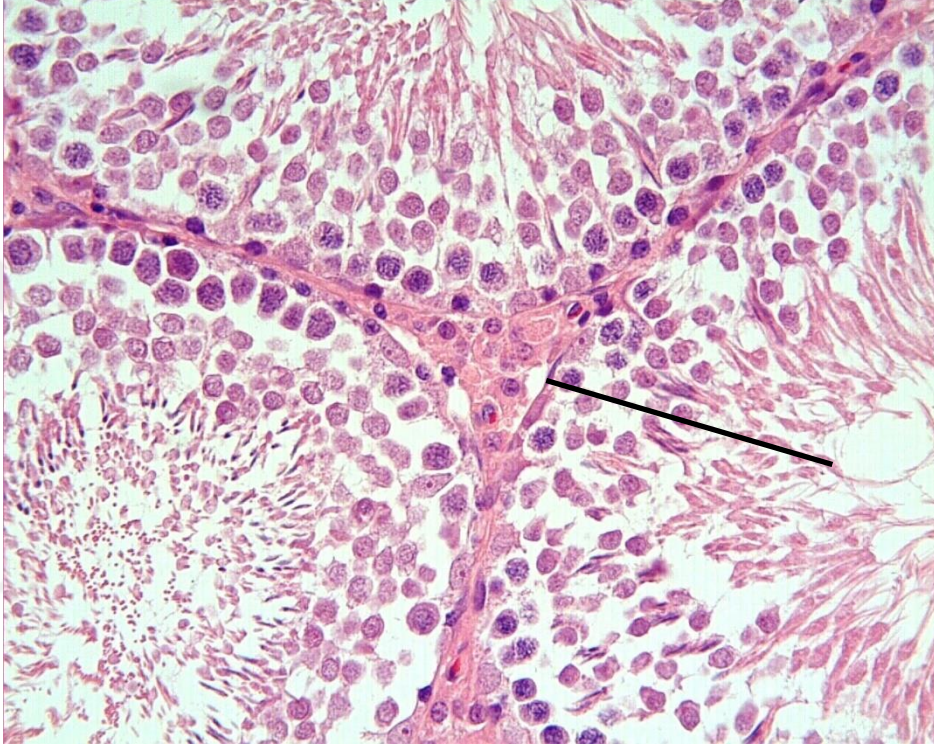
Şekil 4.6. Kontrol grubu. VDR boyama metodu uygulanmış kesitlerde pozitif boyanmış seminifer tübüller izlenmekte (yıldız). IHC, X100.



Şekil 4.7. Kontrol grubu. VDR boyama metodu uygulanmış kesitlerde pozitif boyanmış seminifer tübüller izlenmekte (yıldız). IHC, X200.

VD Grubu

Bu grupta testis genel olarak normal histolojik görünümüne sahipti. Kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübüllerin çoğunun sınırlarının düzgün olduğu ve spermatogenik germ hücrelerinin düzenli olarak dizildikleri görüldü. Tübüllerde, spermatogonyumlardan spermatide kadar spermatogenezin tüm evrelerindeki germ hücreleri yer alıyordu



Şekil 4.8. VD grubu. Kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübül sınırlarının düzgün olduğu ve spermatogenik germ hücrelerinin (çizgi) düzenli olarak dizildikleri izlenmekte. HE, X400.

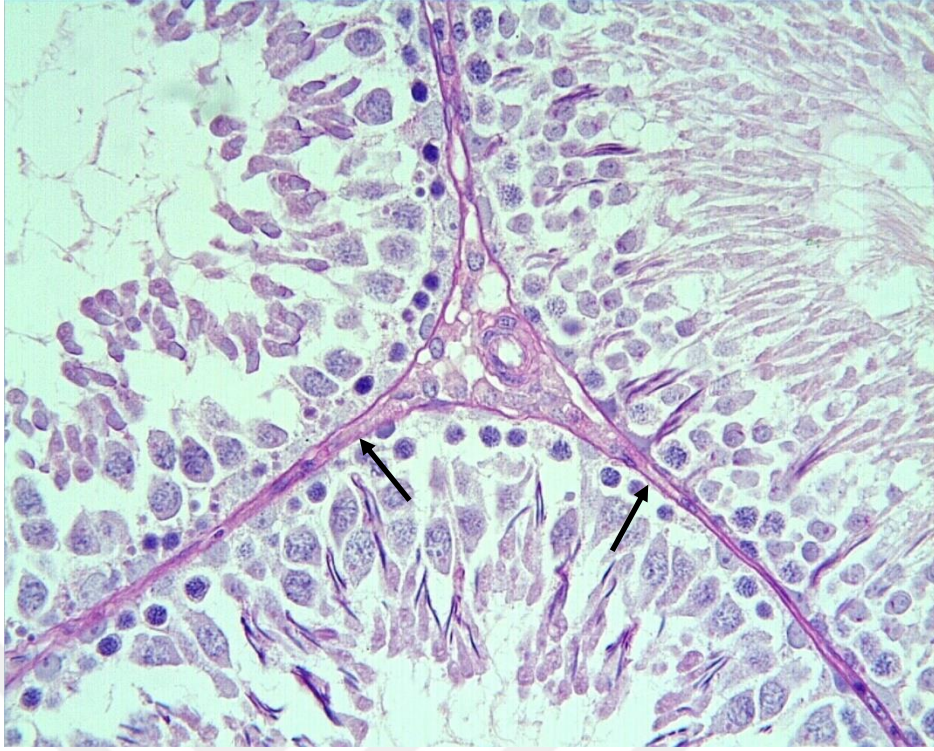
Ortalama seminifer tübül çapları $173,539 \mu\text{m}$ ve ortalama germinal epitel yüksekliği $85,508 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Ayrıca Johnsen skoru ortalaması 7,55 olarak tespit edildi. Seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) fakat Johnsen skorunun bu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi ($p<0,001$).

PAS boyanan kesitlerde, kontrol grubuna benzer şekilde interstisyel bağ doku içerisinde Leydig hücreleri bulunmaktaydı. Seminifer tübüllerin bazal membranları PAS pozitif boyanmış, ince ve düzgün olarak izlendi (Şekil 4.9.).

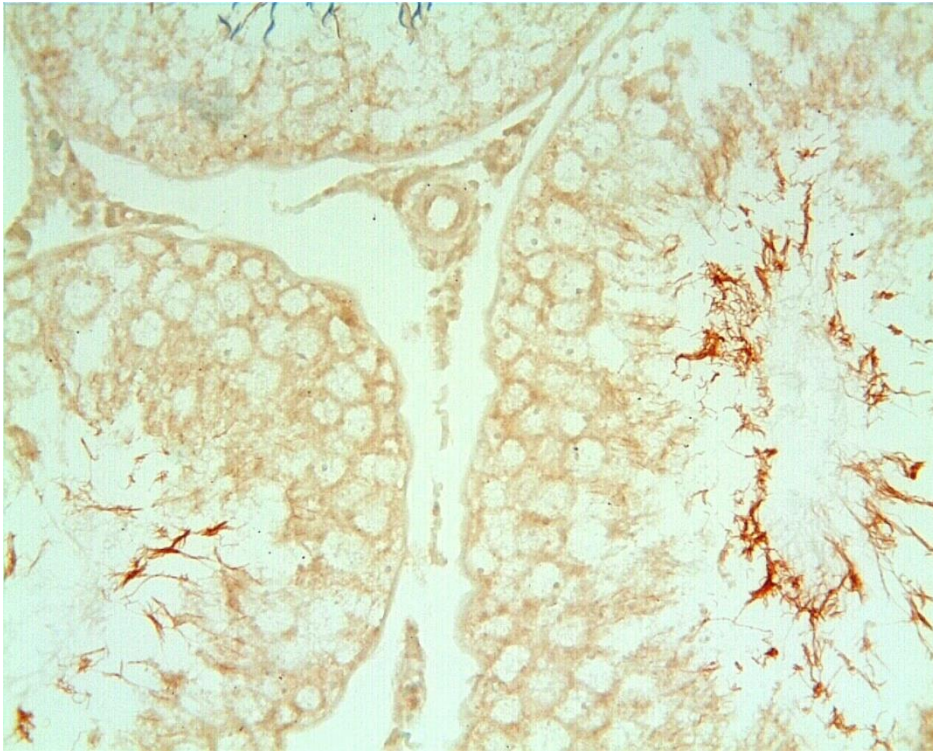
Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile kontrollere benzer olarak, seminifer tübüllerin lümeni içerisinde küçük sitoplazmik parçacıklar pozitif boyanmış olarak izlendi (Şekil 4.10.). Bu grupta da kontrol grubuna benzer şekilde pozitif boyanan spermatogenik hücrelere rastlanmadı.

VDR boyama metodu uygulanmış kesitlerde pozitif boyanmış seminifer tübüller izlendi (Şekil 4.11,12). Bu grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pozitif boyanan tübüllerin sayısındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

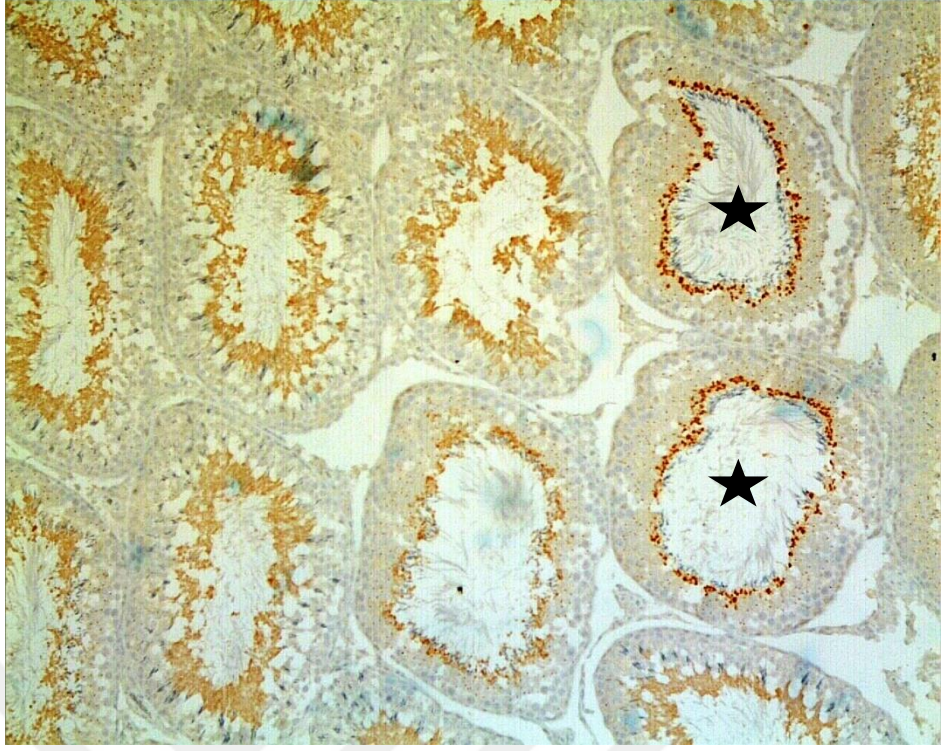




Şekil 4.9. VD grubu. Kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübüllerin bazal membranları PAS pozitif boyanmış, ince ve düzgün olarak izlenmekte (ok). PAS, X400.



Şekil 4.10. VD grubu. Kaspaz-3 pozitif spermatogenik hücelere rastlanmadı. IHC, X400.



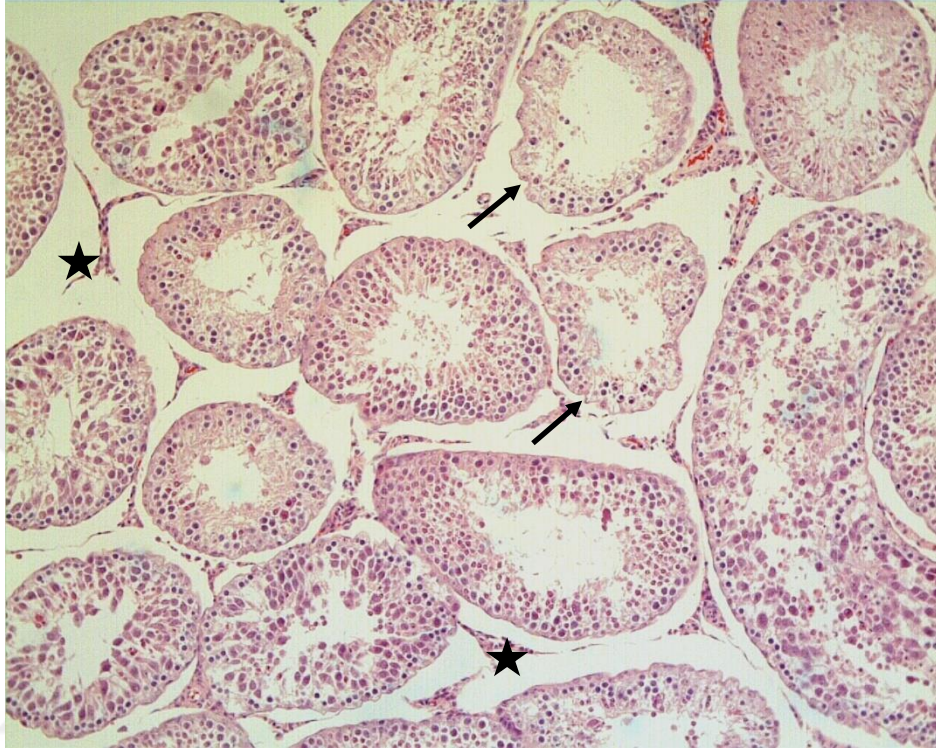
Şekil 4.11. VD grubu. VDR boyama metodu uygulanmış kesitlerde pozitif boyanmış seminifer tübüller izlenmekte (yıldız). IHC, X100.



Şekil 4.12. VD grubu. VDR boyama metodu uygulanmış kesitlerde pozitif boyanmış seminifer tübüller izlenmekte (yıldız). IHC, X200.

Sisplatin Grubu

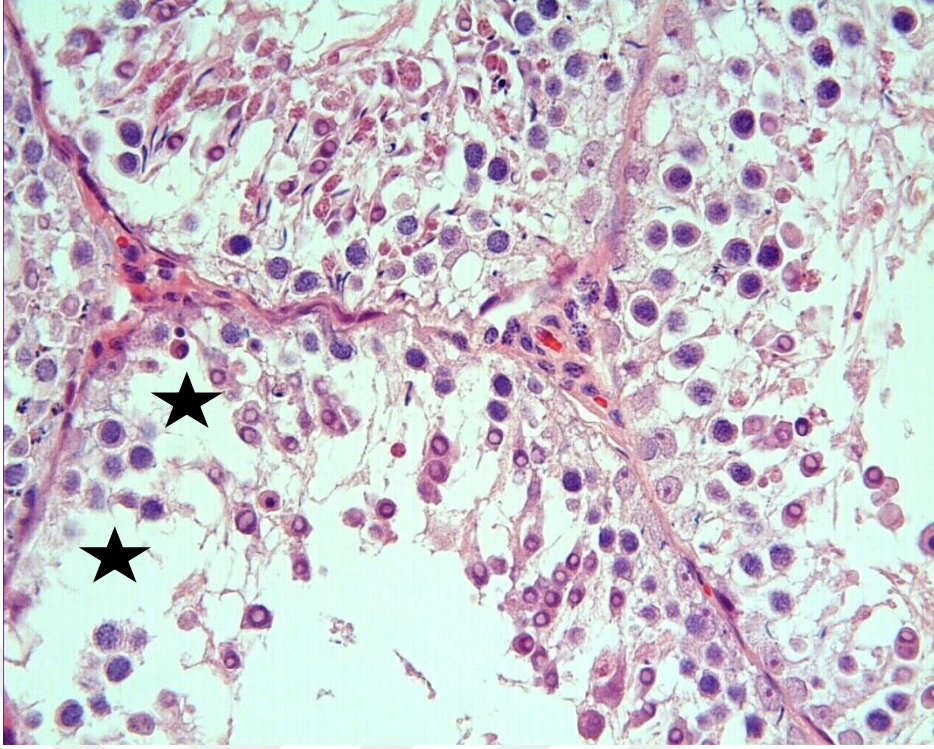
Bu grupta bazı seminifer tübül yapısının düzensizleştiği ve seminifer tübüller arasındaki interstisyel alanda geniş boşluklar oluştuğu gözlendi (şekil 4.13.).



şekil 4.13. Sisplatin grubu. Düzensiz yapıda seminifer tübüller (ok) ve interstisyel alanda geniş boşluklar (yıldız) izlenmekte. HE, X100.

Ortalama seminifer tübül çapı 147,195 μm ve ortalama germinal epitel yüksekliği 69,519 μm olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta tübül çapının ve epitel yüksekliğinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlendi ($p<0.01$). Bu gruba ait Johnsen skoru ortalaması 7,07 olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta Johnsen skorunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$).

Bazı seminifer tübüllerde spermatogenetik seriyi oluşturan hücrelerin azaldığı ve düzensiz yerleşim gösterdiği izlendi (şekil 4.14).



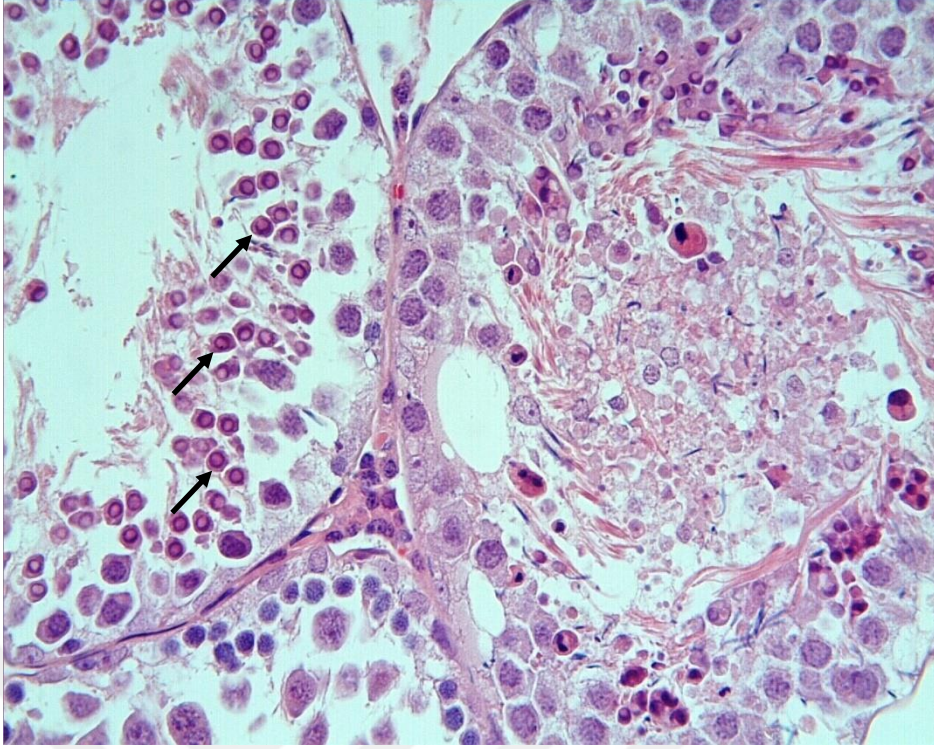
Şekil 4.14. Sisplatin grubu. Seminifer tübüllerde spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerin azaldığı (yıldız) ve düzensiz yerleşim gösterdiği izlemekte. HE, X400.

Ayrıca bazı seminifer tübüllerde çok sayıda annuler kromatinli spermatidlere rastlandı (Şekil 4.15,16).

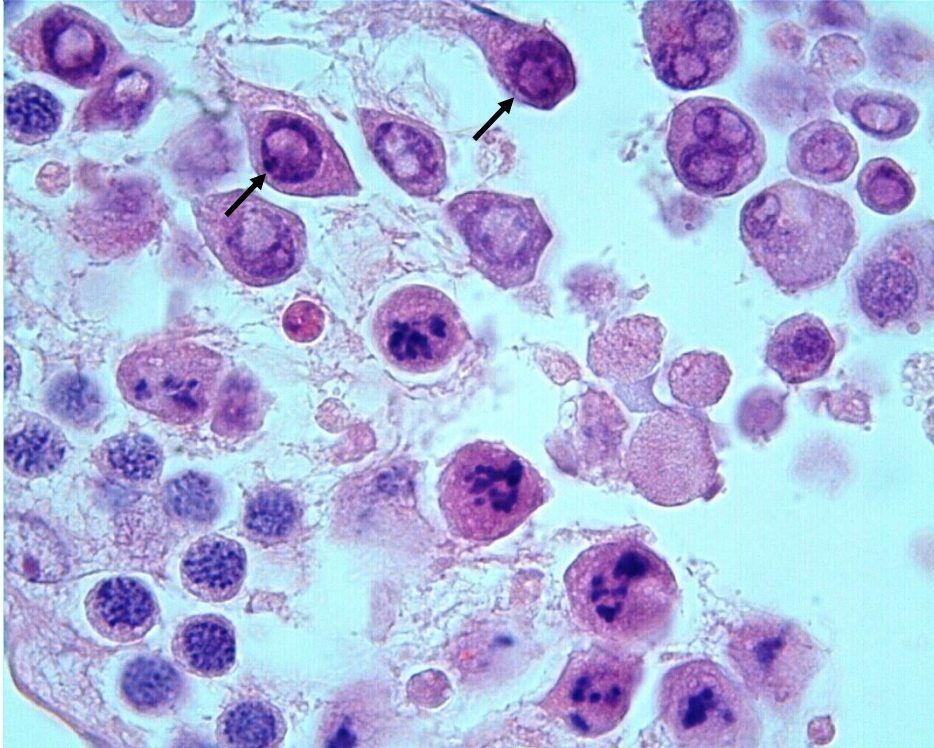
Bazı tübüllerde ise eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde izlenen dejenere hücreler gözlendi (Şekil 4.17,18).

Dikkat çeken diğer bir bulgu, tübüllerde birden fazla sayıda nükleus içeren dev hücrelerin görülmesiydi (Şekil 4.19,20).

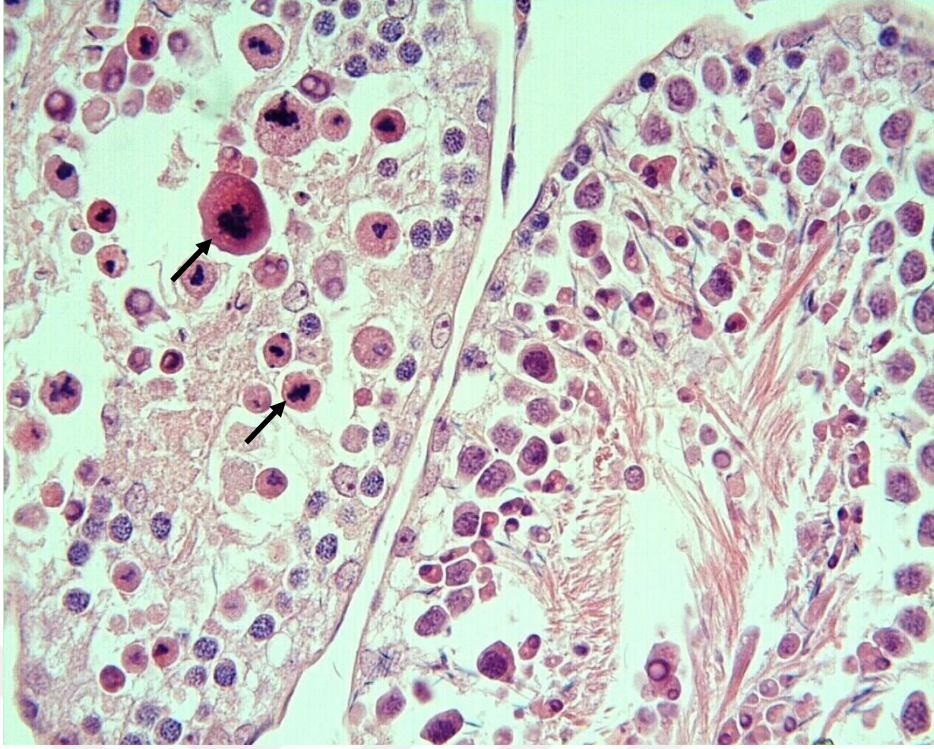
Ayrıca bazı tübüllerde germinatif epitelden ayrılan ve gelişimini tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücrelerin lümen içerisinde biriktiği tespit edildi (Şekil 4.21,22).



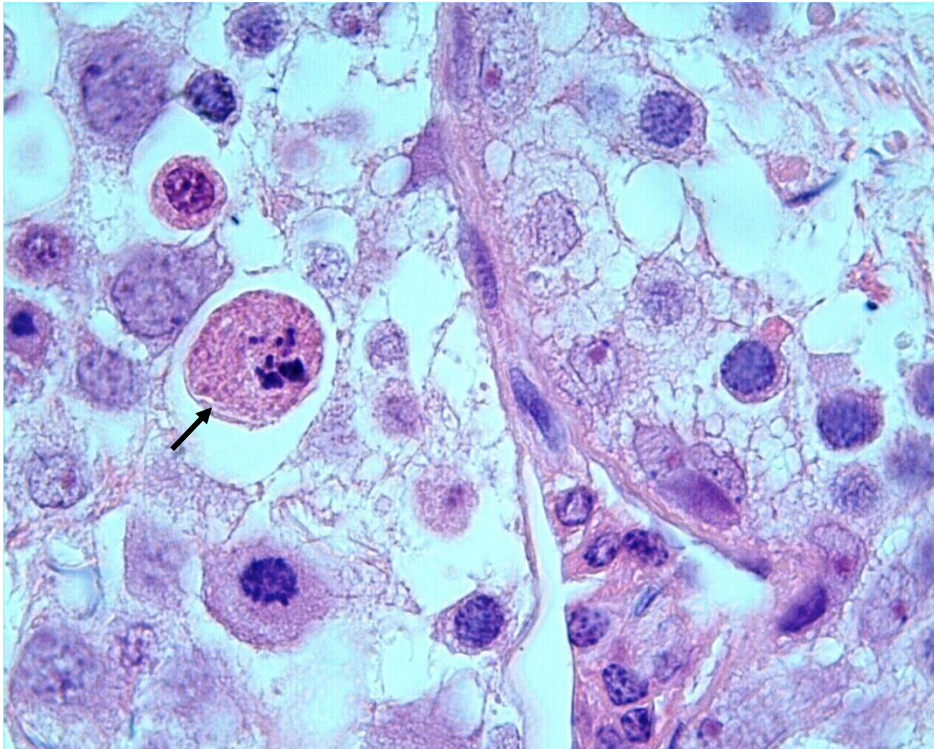
Şekil 4.15. Sisplatin grubu. Annuler kromatinli spermatidler izlenmekte (ok). HE, X400.



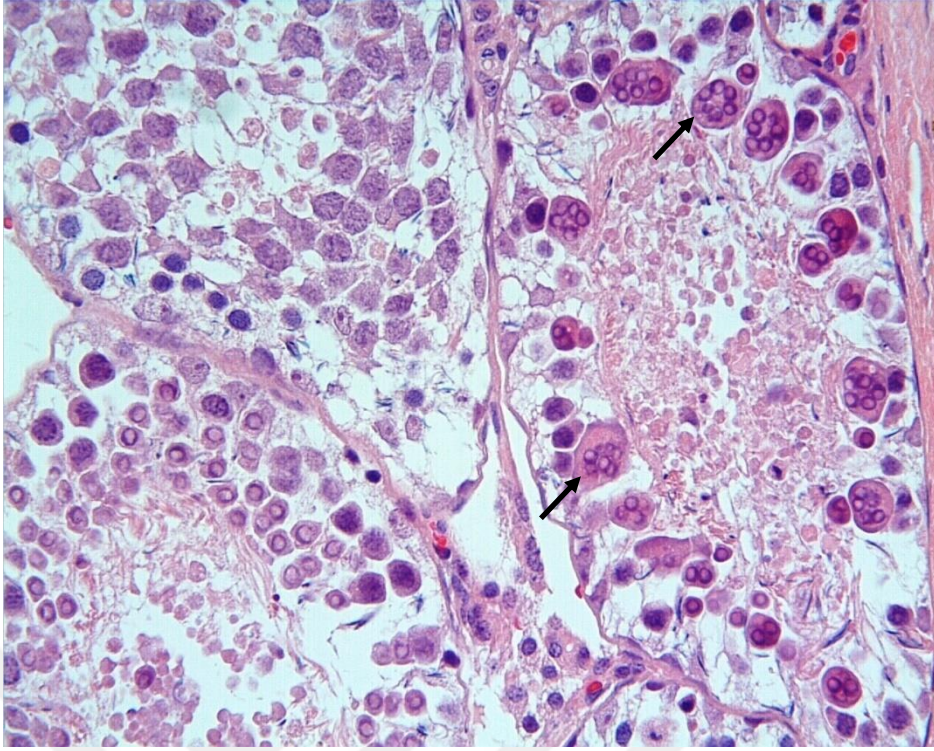
Şekil 4.16. Sisplatin grubu. Annuler kromatinli spermatidler izlenmekte (ok). HE, X1000.



Şekil 4.17. Sisplatin grubu. Eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde dejenere hücreler izlenmekte (ok). HE, X400.



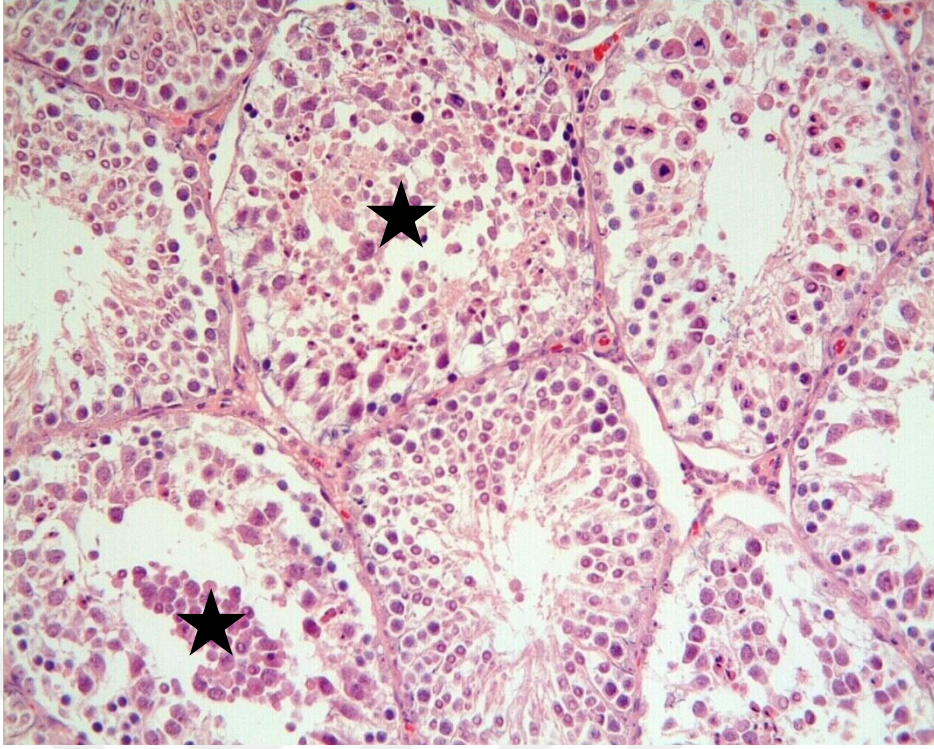
Şekil 4.18. Sisplatin grubu. Eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde dejenere hücre izlenmekte (ok). HE, X1000.



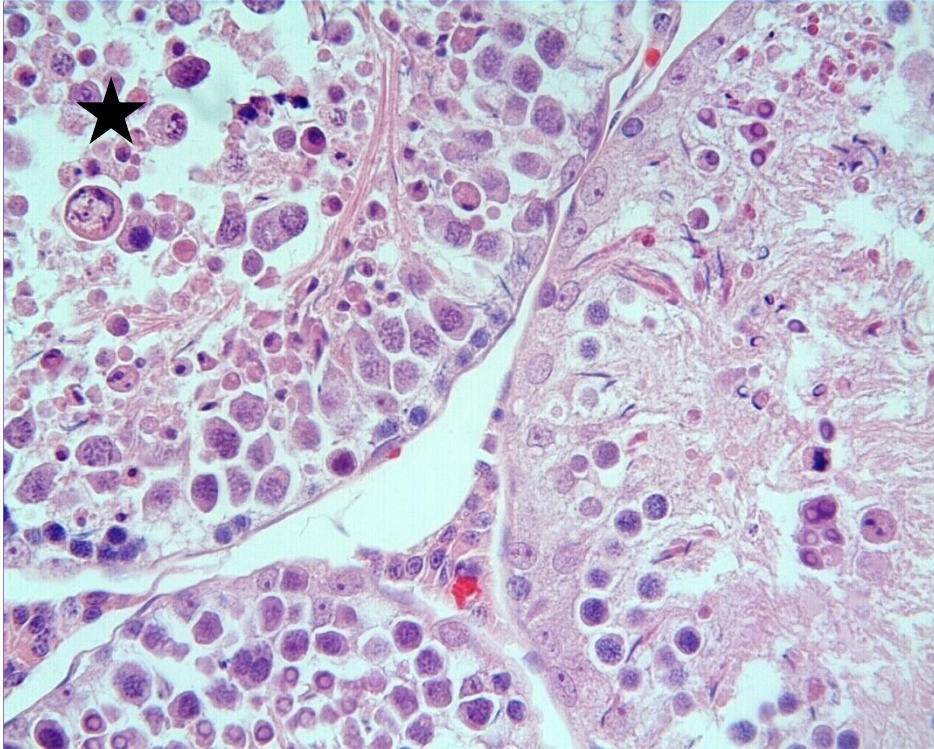
Şekil 4.19. Sisplatin grubu. Birden fazla sayıda nükleus içeren dev hücreler izlenmekte (ok) . HE, X400.



Şekil 4.20. Sisplatin grubu. Birden fazla sayıda nükleus içeren dev hücreler izlenmekte (ok). HE, X1000.



Şekil 4.21. Sisplatin grubu. Germinatif epitelden ayrılan ve gelişimini tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücreler lümen içerisinde izlenmekte (yıldız). HE, X200.



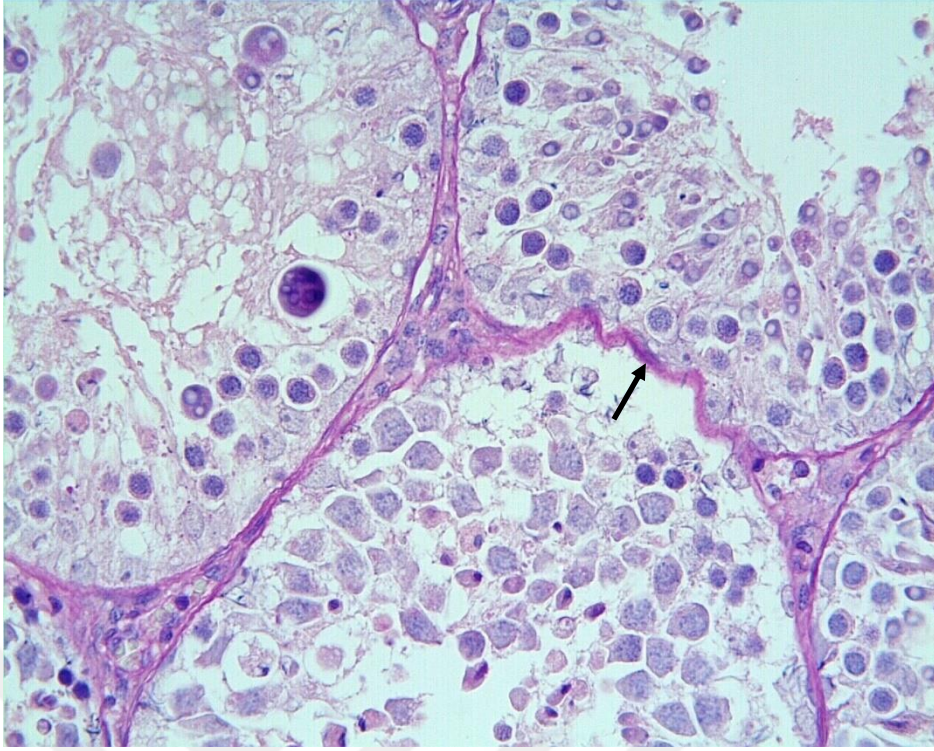
Şekil 4.22. Sisplatin grubu. Germinatif epitelden ayrılan ve gelişimini tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücreler lümen içerisinde izlenmekte (yıldız). HE, X400.

PAS ile boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranında ond lasyonun izlendiği ve PAS pozitifliğinin arttığı görüldü (Şekil 4.23.).

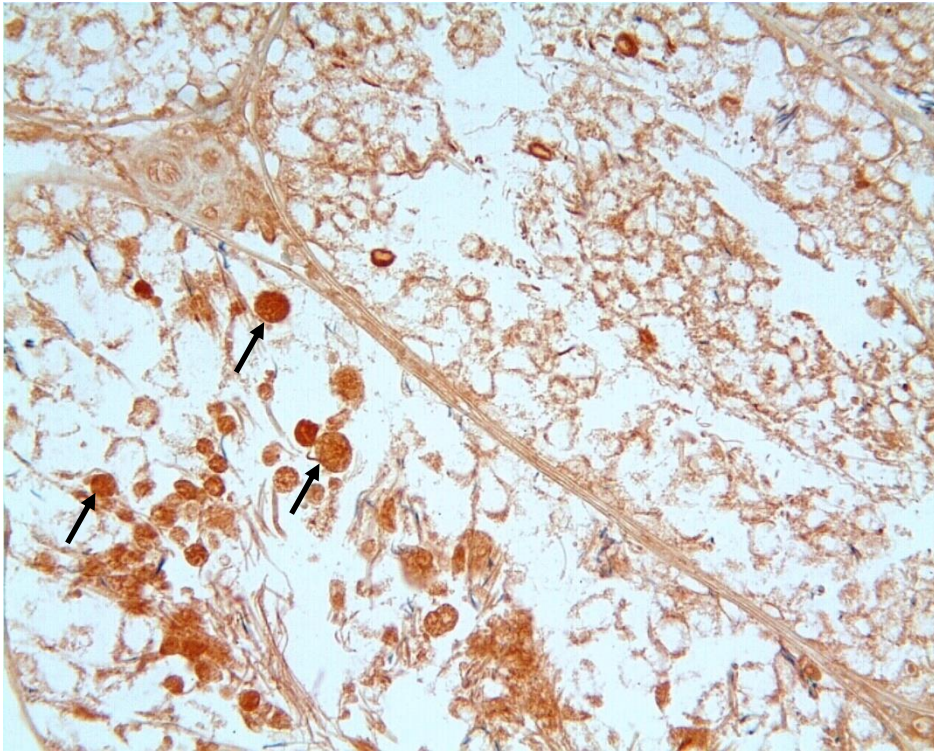
Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde pozitif boyanan spermatogenik hücrelerin yoğunluğunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlendi (Şekil 4.24.).

VDR boyama metodu uygulanan kesitlerde pozitif boyanan spermatogenik hücrelerin yoğunluğunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta azalığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlendi ($p>0.05$) (Şekil 4.25,26).

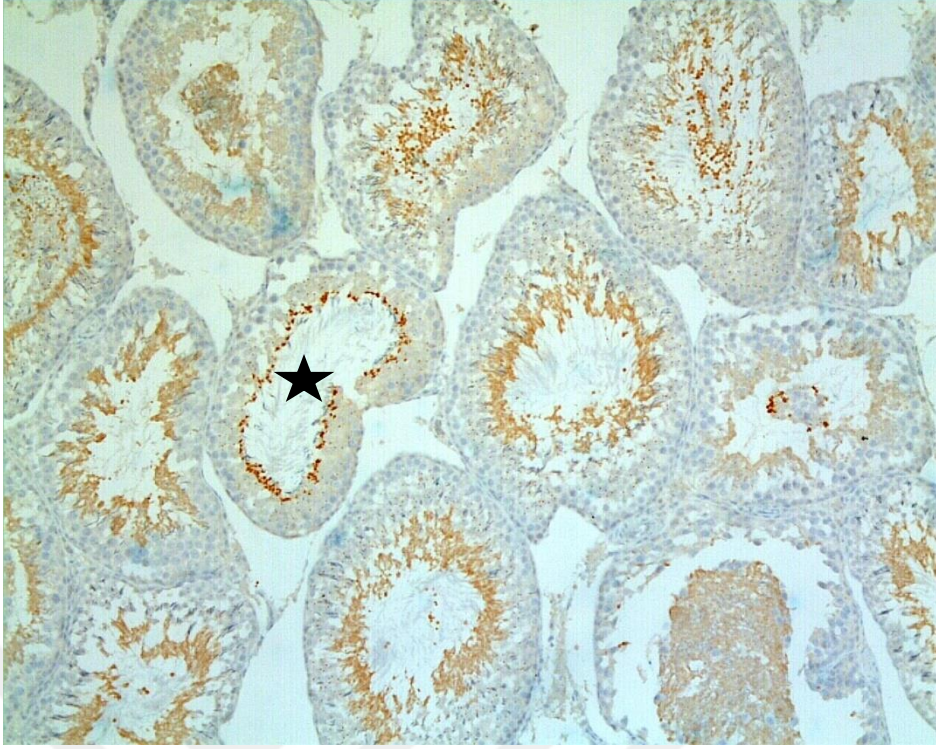




Şekil 4.23. Sisplatin grubu. Seminifer tübül bazal membranında ondülasyon ve PAS pozitifliğinin arttığı izlenmekte (ok). PAS, X400.



Şekil 4.24. Sisplatin grubu. Kaspaz-3 pozitif hücreler izlenmekte (ok). IHC, X400.



Şekil 4.25. Sisplatin grubu. VDR pozitif seminifer tübül izlenmekte (yıldız). IHC, X100.

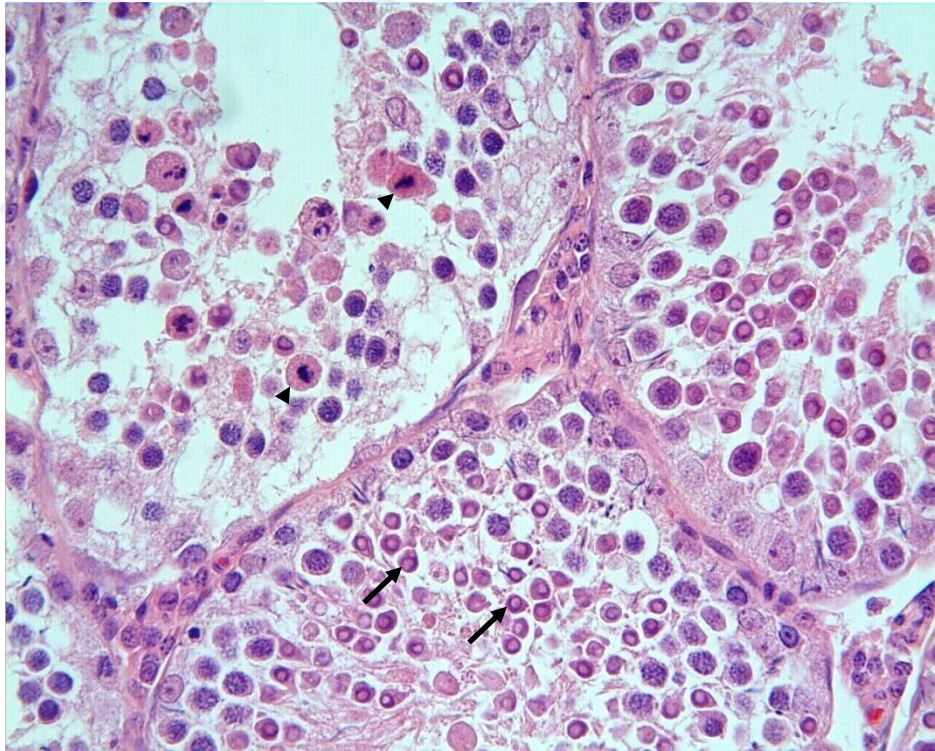


Şekil 4.26. Sisplatin grubu. VDR pozitif seminifer tübül izlenmekte (yıldız). IHC, X200.

Sisplatin+VD Grubu

Bu grupta ortalama seminifer tübül çapı 151,792  m ve ortalama germinal epitel yüksekliği 71,662  m olarak  l      . Bu değerlerdeki artış sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Diğer yandan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül çapları ve germinal epitel yüksekliği bakımından farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu g       ($p<0.01$). Bu gruba ait Johnsen skoru ortalaması 7,42 olarak tespit edildi. Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta Johnsen skorunun istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı g       ($p<0.01$).

Annuler kromatinli spermatidler ve mayozun belli aşamalarında duraksamı  spermatogenik h       bu grupta da izlendi (     4.27.).



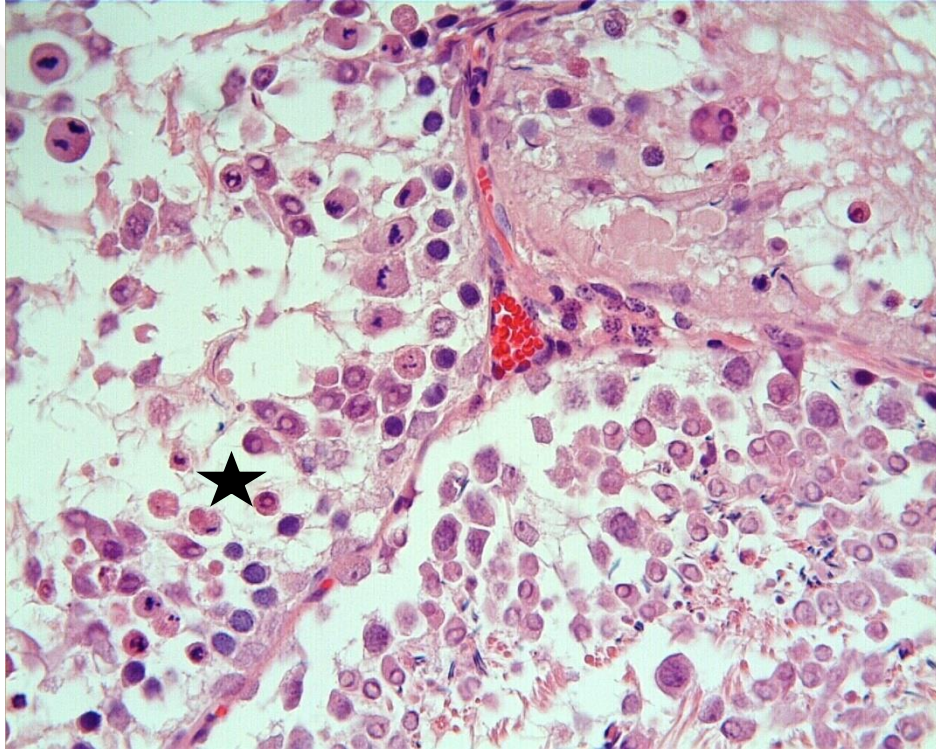
     4.27. Sisplatin+VD grubu. Annuler kromatinli spermatidler (ok) ve eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamı  ve farklı          dejenere h       (ok ba ı) izlenmekte. HE, X400.

Sisplatin grubuna benzer        bazı seminifer t b       spermatogenik seriyi olu tur       azaldığı ve d         yerleşim g         tespit edildi (     4.28.).

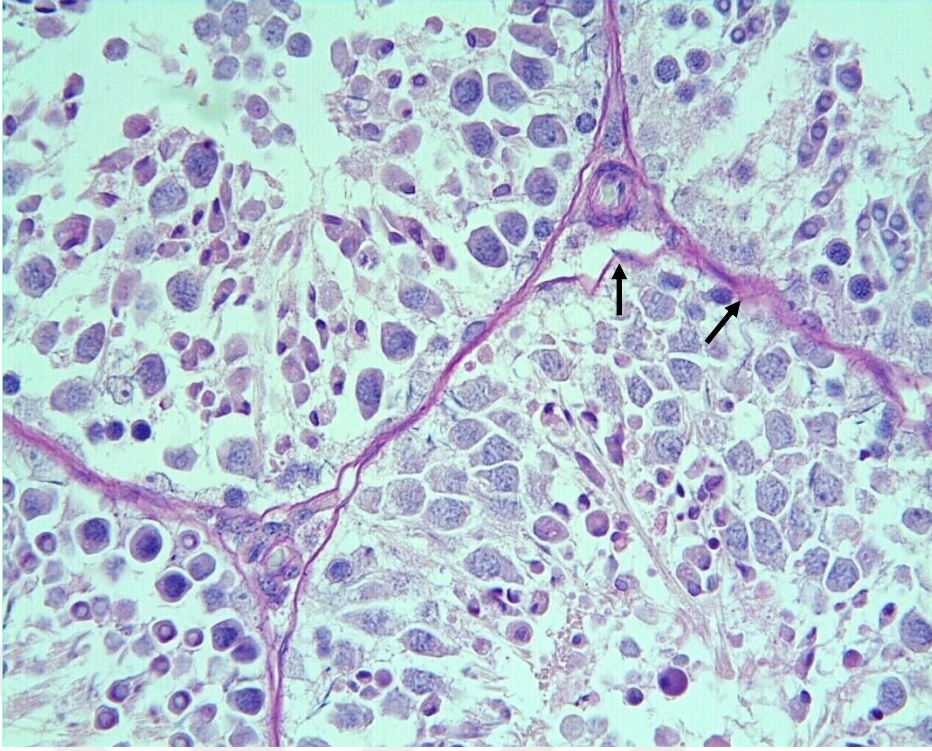
PAS boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranlarda görülen ondülasyon ve PAS pozitifliğinin sisplatin grubuna benzer olduğu izlendi ( ekil 4.29.).

Kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde pozitif boyanan spermatogenik hücrelerin yoğunluğunun sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($p<0.001$) gözlendi ( ekil 4.30.).

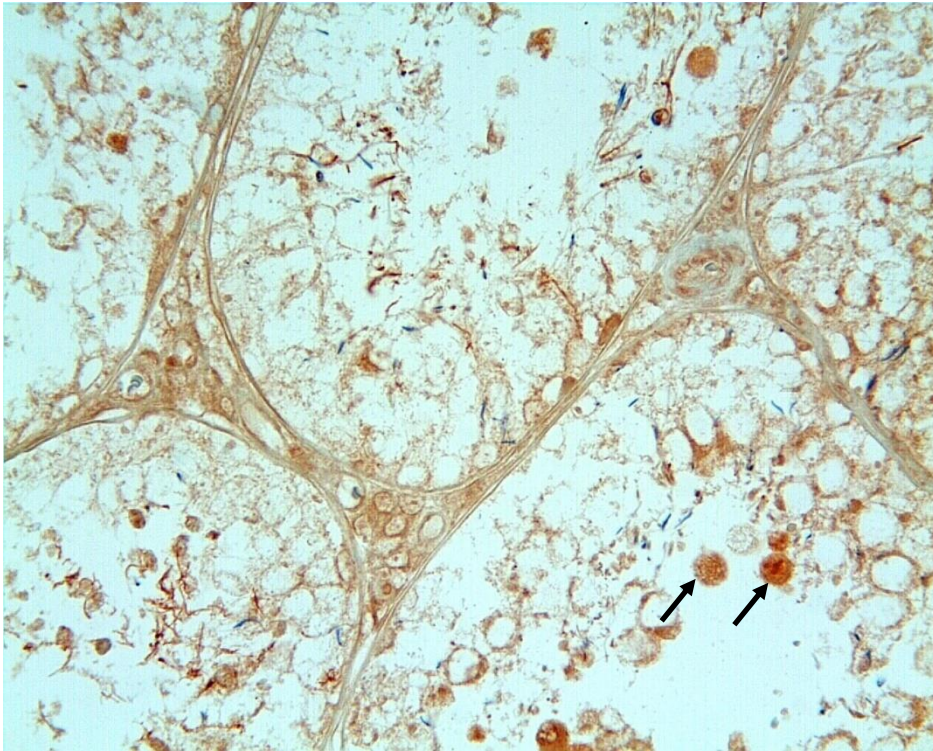
VDR boyama metodu uygulanan kesitlerde pozitif boyanan spermatogenik hücrelerin yoğunluğunun sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlendi ($p<0.01$) ( ekil 4.31, 32).



Şekil 4.28. Sisplatin+VD grubu. Spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerin azaldığı ve düzensiz yerleşim gösterdiği izlenmekte (yıldız). HE, X400.



Şekil 4.29. Sisplatin+VD grubu. Seminifer tübül bazal membranında ondülasyon ve PAS pozitifliği izlenmekte (ok). PAS, X400.



Şekil 4.30. Sisplatin+VD grubu. Kaspaz-3 pozitif hücreler izlenmekte (ok). IHC, X400.



Şekil 4.31. Sisplatin+VD grubu. VDR pozitif seminifer tübüller izlenmekte (yıldız). IHC, X100.



Şekil 4.32. Sisplatin+VD grubu. VDR pozitif seminifer tübüller izlenmekte (yıldız). IHC, X200.

Tablo 4.3. Seminifer Tübül Çapı, Germinal Epitel Kalınlığı ve Johnsen Skoru Karşılaştırılması

	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D vit (n=6)	D vit (n=6)	p
Seminifer Tübül Çapı	169,588 ^a	147,195 ^b	151,792 ^b	173,539 ^a	0,002
Germinal Epitel Kalınlığı	85,814 ^a	69,519 ^b	71,662 ^b	85,508 ^a	<0,001
Johnsen Skoru	8.75 ^a (8.4-9)	7.07 ^b (5.42-7.36)	7.42 ^c (7.28-7.56)	7.55 ^c (7.12-7.7)	<0.001

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Tablo 4.4. VDR ve Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

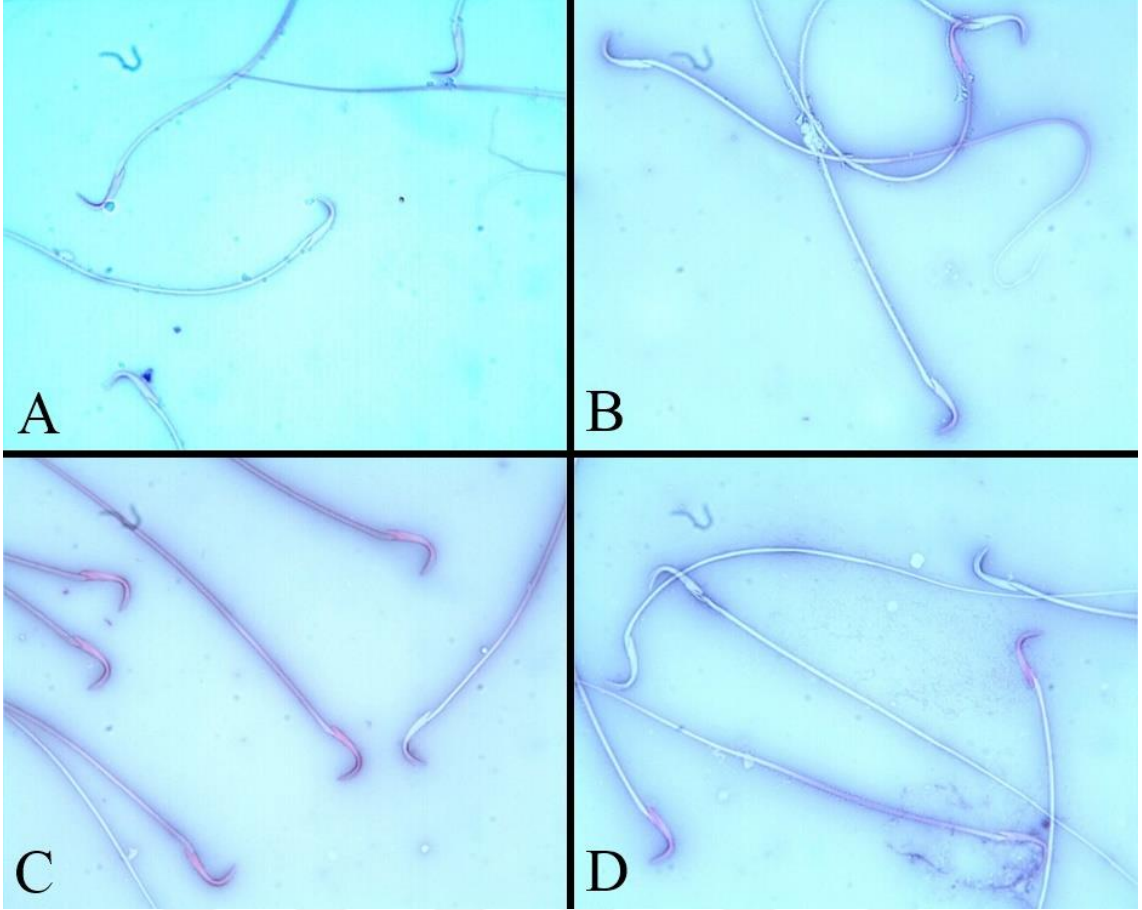
	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D vit (n=6)	D vit (n=6)	p
VDR immünohistokimya	1.05 ^{ab} (0.8-1.5)	0.925 ^a (0.55-1.05)	1.4 ^b (1.15-1.6)	1.375 ^b (1.05-1.8)	0.008
Kaspaz-3 immünohistokimya	0 ^a (0-0)	9 ^b (0-15)	6 ^c (0-9)	0 ^a (0-0)	<0.001

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Sperm Analiz Bulguları

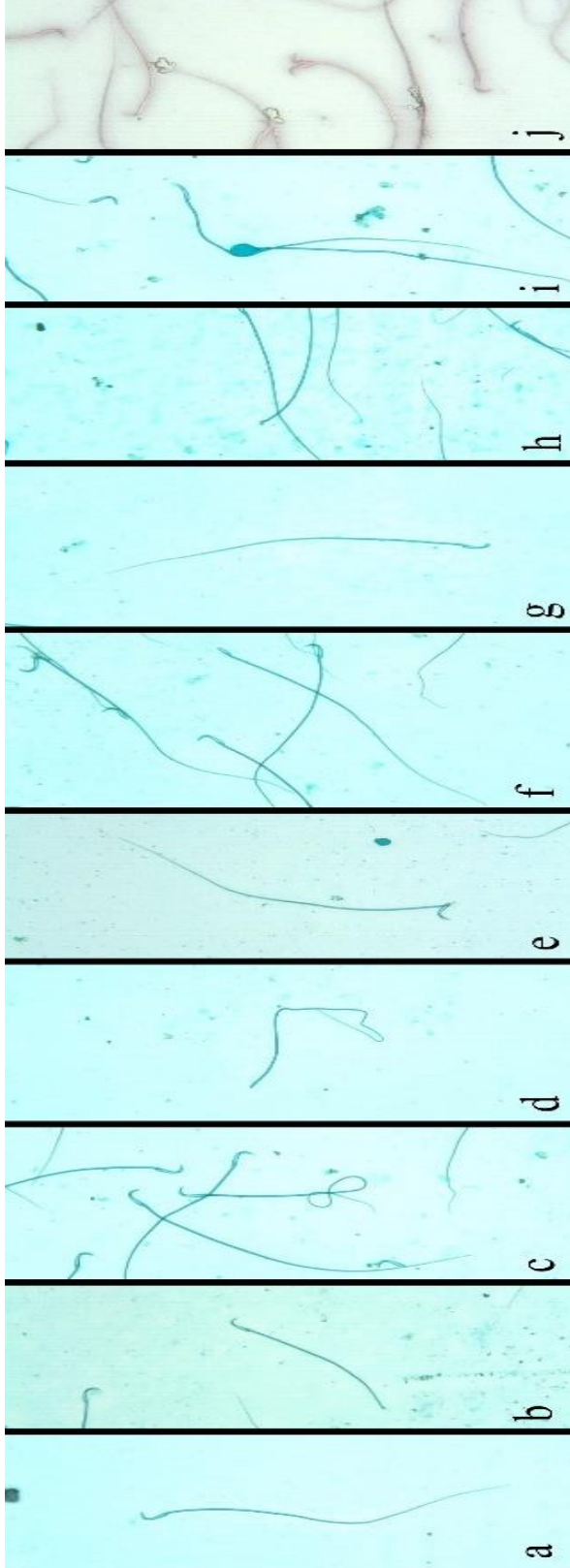
Tablo 4.5.'de grupların sperm sayısı, vitalitesi ve anormal sperm miktarı verilmiştir. Sisplatin uygulamasının sperm sayısını kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı görüldü ($p<0.001$). Sisplatin grubu, Sisplatin +VD grubu ile karşılaştırıldığında ise sperm sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sisplatin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta sperm vitalitesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). Buna karşılık, Sisplatin+VD grubu ile Sisplatin grubu karşılaştırıldığında sperm vitalitesinin bu grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.33.). Sadece VD verilen grupta ise kontrol grubuna göre sperm vitalitesinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.001$).



Şekil 4.33. Sperm vitalite değerlendirmesi. A. Kontrol grubu, B. VD grubu, C. Sisplatin grubu, D. Sisplatin+VD grubu. Eozin-nigrozin, X1000.

Sisplatin uygulamasının anormal sperm miktarında (Baş-boyun ve kuyruk anomalisi) istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa sebep olduğu ve bu artışın VD tedavisi ile azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Bu azalmanın total sperm anomalisi ve baş-boyun anomalisi açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu fakat kuyruk anomalisi yönünden farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Sadece VD verilen grupta ise kontrol grubuna göre sperm anomalisinde anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.34. Spermilerin morfolojik değerdendirme. a. normal sperm, b. kısa kuyruk, c. kıvrık kuyruk, d. başsız sperm, e. bükük boyun, f. yumru baş, g. çengelsiz baş, h. iğne baş, i. amorf baş, j. çift başlı sperm. Sperm morphology stain, X400.

Tablo 4.5. Sperm Analizlerinin Karşılaştırılması

	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D vit (n=6)	D vit (n=6)	p
Sperm Sayımı	20 ^a (16-150)	6 ^b (4-10)	10 ^b (5-12)	18.5 ^a (13-200)	<0.001
Sperm Vitalitesi	0.965 ^a (0.95-0.99)	0.13 ^b (0.11-0.24)	0.32 ^c (0.24-0.57)	0.79 ^d (0.63-0.82)	<0.001
Sperm Total Anomalisi	0.085 ^a (0.05-0.15)	0.23 ^b (0.18-0.5)	0.16 ^c (0.11-0.25)	0.21 ^{bc} (0.15-0.24)	0.003
Baş-Boyun Anomalisi	0.01 ^a (0-0.02)	0.095 ^b (0.03-0.15)	0.015 ^a (0-0.02)	0.005 ^a (0-0.02)	0.002
Kuyruk Anomalisi	0.07 ^a (0.05-0.14)	0.175 ^b (0.08-0.4)	0.145 ^b (0.1-0.23)	0.2 ^b (0.14-0.24)	0.011

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

TOS, TAS, FSH, LH, testosteron, östrojen, VD, Ca ve P düzeylerine ait değerler Tablo 4.6. / Şekil 4.35., Tablo 4.7. / Şekil 4.36. ve Tablo 4.8. / Şekil 4.37.'de verilmiştir.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda sisplatin verilen sıçanlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TOS kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0.01$). Bununla birlikte VD uygulamasının sisplatinin neden olduğu TOS artışını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi ($p<0.01$). Sadece VD verilen grupta ise kontrol grubuna göre TOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p<0.01$). TAS yönünden gruplar arasında fark gözlenmedi ($p>0.05$).

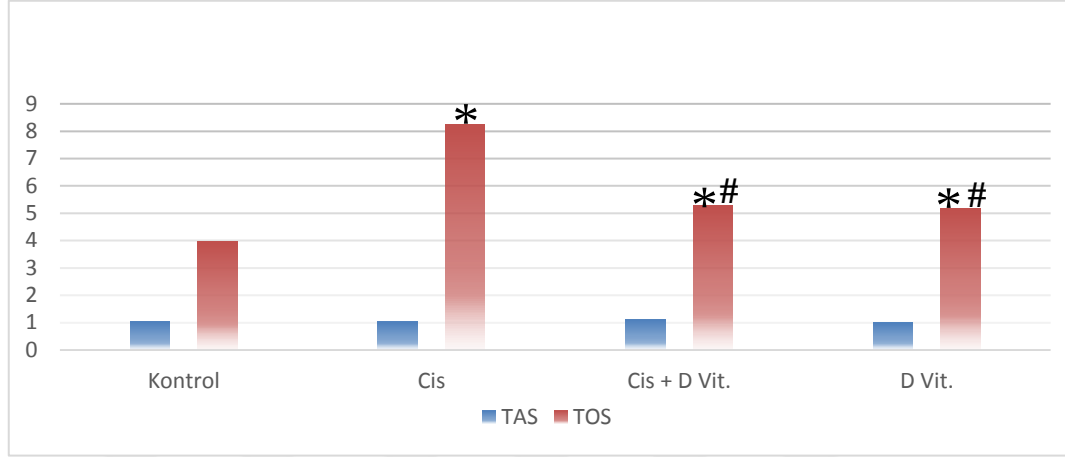
Serum FSH, LH, testosteron seviyesi yönünden gruplar arasında fark gözlenmezken ($p>0.05$), serum östrojen seviyesinin sisplatin verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0.01$). Bununla birlikte VD uygulamasının sisplatinin neden olduğu östrojen düşüşünü etkilemediği tespit edildi ($p>0.05$).

Serum VD seviyesinin sisplatin verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) görüldü. VD uygulanan gruplar sisplatin ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ise VD seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Serum Ca seviyesi yönünden sisplatin ve kontrol grubu arasında fark gözlenmezken, VD uygulanan gruplar sisplatin ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında Ca seviyesinin arttığı gözlemlendi ($p<0.05$). Serum P seviyesi yönünden gruplar arasında fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 4.6. TAS ve TOS analizlerinin karşılaştırılması

	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D vit (n=6)	D vit (n=6)	p
TAS	1.034	1.025	1.119	1.004	0.637
TOS	3.963 ^a	8.243 ^b	5.296 ^c	5.185 ^c	0.001

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.



Şekil 4.35. Gruplar arası TAS ve TOS analizlerinin değerlendirilmesi.

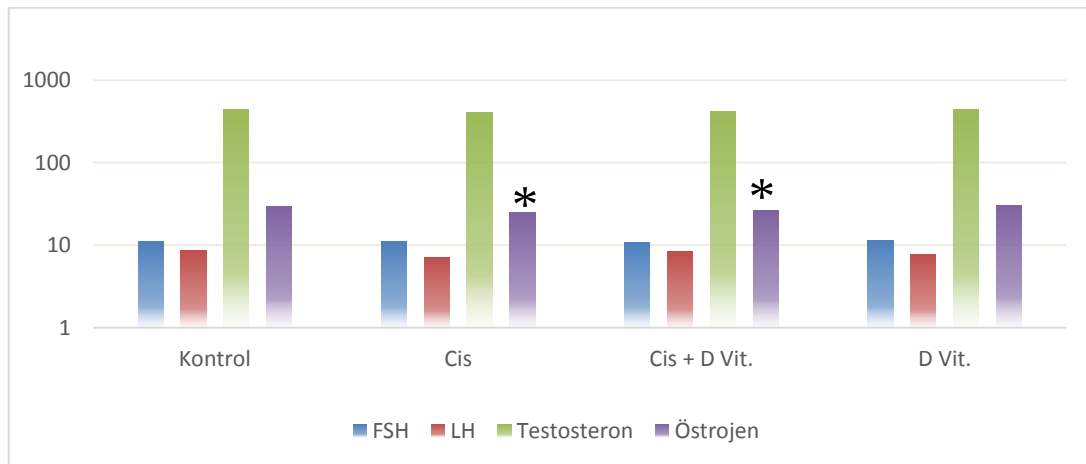
* Kontrol grubuna göre farkın istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Sisplatin grubuna göre farkın istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Tablo 4.7. FSH, LH, testosteron ve östrojen analizlerinin karşılaştırılması

	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D vit (n=6)	D vit (n=6)	p
FSH	11,008	11,01	10,922	11,591	0,398
LH	8,624	7,197	8,439	7,796	0,198
Testosteron	439,297	410,33	421,423	442,011	0,307
Östrojen	29,938 ^a	24,669 ^b	26,77 ^b	30,794 ^a	0,001

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.



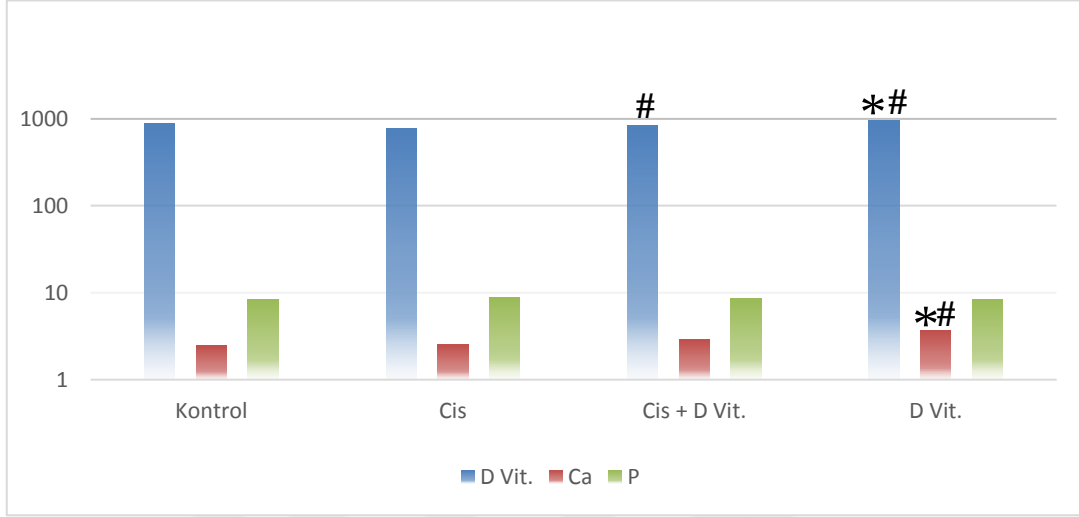
Şekil 4.36. Gruplar arası FSH, LH, testosteron ve östrojen analizlerinin değerlendirilmesi.

* Kontrol grubuna göre farkın istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Tablo 4.8. VD, Ca ve P analizlerinin karşılaştırılması

	Kontrol (n=6)	Cis (n=6)	Cis+D vit (n=6)	D vit (n=6)	p
VD	879.865 ^{ab}	768.263 ^b	845.244 ^{ac}	967.212 ^c	0.015
Ca	2,458 ^a	2,528 ^a	2,884 ^{ab}	3,683 ^b	0,016
P	8,304	8,904	8,475	8,412	0,765

*Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.



Şekil 4.37. Gruplar arası VD, Ca ve P analizlerinin değerlendirilmesi.

* Kontrol grubuna göre farkın istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Sisplatin grubuna göre farkın istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

5. TARTIŞMA

Kronik hastalıklardan biri olan kanser, günümüzde çok fazla görülmesi ve ölümle sonuçlanabilen bir hastalık olması nedeniyle önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Antikanserojenik ilaçların bulunması, yaşam süresinin uzaması ve hayat kalitesinin artması açısından çok büyük önem taşımaktadır. Fakat üretilen ilaçların yan etkileri ve erkek fertilitesi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde gelecekte önemli bir infertilite sıkıntısı yaşanacağı muhtemeldir (40).

Sisplatin güçlü bir antineoplastik ajandır ve başlıca baş-boyun, akciğer, testis, over ve meme olmak üzere birçok solid organ kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. DNA-alkilleyici bir molekül olan sisplatin, DNA çift zincirlerini kırar ve DNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu engelleyerek anti-tümoral etki gösterir (41). Ancak sisplatinin anti-tümöral etkilerinin yanısıra ototoksisite, nörotoksisite, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve testis toksisitesi gibi yan etkileri bulunur (42). Kısa ve uzun süreli sisplatin tedavisinin testis fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir (43). Sisplatin kemoterapisinin gonadotoksik etkisi neticesinde uzun süreli azospermi ve kalıcı infertilite görülebildiği rapor edilmiştir (44). Özellikle spermatogenez sürecinde aşırı hücre proliferasyonunun olması testisleri bu ajana karşı daha duyarlı hale getirmektedir (45).

Sisplatinin doğrudan DNA hasarı oluşturmasının yanısıra aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (46). Bu nedenle toksik maddelere karşı dokuların korunmasında anti-oksidan kapasiteye sahip maddeler denenmiştir (47–49). VD'nin Ca ve P homeostazisini düzenlemesinin yanısıra anti-oksidatif ve anti-inflamatuar etkileri bulunmaktadır (50). Fakat VD'nin sisplatin ile indüklenen testis ve epididimis hasarı üzerine etkileri hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmamızda, VD 'nin sisplatine bağlı erkek üreme toksisitesi üzerine etkilerini histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirme ile ayrıntılı olarak araştırmayı amaçladık.

Sisplatinin ROS üretimini arttırdığı, lipid peroksidasyonunu ve yapısal proteinlerin denatürasyonuna neden olduğu, antioksidan sistemin aktivitesini azalttığı ve p53 'ü aktive ederek apoptozu desteklediği bildirilmiştir (51). Oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidan enzim seviyeleri arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar (52). Azalan antioksidan enzimler sisplatinin toksik etkilerine karşı testisin

savunmasız kalmasına sebebiyet verir. Oksidatif stres, testis hasarına, apoptozise, DNA hasarına ve infertiliteye yol açarak erkek üreme işlev bozukluğuna neden olur (53).

Sisplatinin testiste neden olduğu oksidatif hasarın ve VD'nin koruyucu özelliklerinin belirlenmesi için çalışmamızda serumdan alınan örneklerde oksidatif hasar ve antioksidan etkinliğin göstergesi olan TOS ve TAS parametreleri değerlendirilmiştir. Önceki çalışmalarda sisplatin uygulamasının lipid peroksidasyon düzeyinde artışa ve genellikle antioksidan parametrelerde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (54,55). Bizim çalışmamızda, sisplatin grubunda TOS seviyesinin kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı, TAS seviyesinin ise diğer gruplarla benzer olduğu gözlenmiştir. Sisplatin testis toksisitesinin hücresel mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ancak oksidatif strese artışa neden olduğu açıktır. Sisplatin uygulamasının TAS düzeyinde azalmaya neden olduğunu gösteren çalışmalar olmasının yanı sıra TAS düzeyinde anlamlı bir azalma yapmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Yücel ve ark. tek doz 7 mg/kg i.p sisplatin uyguladıkları 10 günlük çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde TAS düzeyinde gruplar arası anlamlı bir fark bulmazken, TOS ve OSI düzeyinin sisplatin uygulanan grupta artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Yücel ve ark. TAS düzeyinde fark görülmemesinin nedeninin hasarlı testis dokusunda yüksek seviyelerdeki prooksidan molekülleri dengelemek için artan antioksidan moleküller olabileceğini düşünmüşlerdir (56). Mokhatari-Zaer ve ark. üç farklı VD dozu (100 IU/kg, 1000 IU/kg, 10.000 IU/kg) ile yapmış oldukları 21 günlük çalışmada, VD takviyesinin hasar grubunda artan MDA düzeyini düşürdüğünü, antioksidatif parametrelerden CAT ve SOD düzeylerini hasar grubuna göre arttırdığını belirtilmişlerdir (57). Bizim çalışmamızda da benzer olarak sisplatin+VD grubunda sisplatin grubuna göre TOS seviyesinin anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Bunun yanı sıra yapılan bazı çalışmalarda VD, herhangi bir toksik madde uygulanmamış gruplara takviye olarak verildiğinde lipid peroksidasyonunu arttırabildiği gösterilmiştir. Bu bulgu erkek fertilitésinin düzenlenmesinde optimal VD dozunun önemini göstermektedir. Jeremy ve ark. çalışmalarında D-galaktoz verdikleri sıçanlarda farklı VD dozlarının (40 IU/kg ve 400 IU/kg) lipid peroksidasyon göstergesi MDA düzeyini azalttığını ancak VD uygulanan gruplar ile kontrol grubu kıyaslandığında ise MDA seviyesinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (58). Santos ve ark. 3000 IU/kg ve 10.000 IU/kg VD takviyeli yemler ile besledikleri sıçanlarda 2 ay sonunda yapılan değerlendirmede oksidatif stres parametrelerinden lipid hidroperoksit düzeyinin yüksek

doz VD alan grupta anlamlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir (59). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde sadece VD uyguladığımız grupta kontrol grubuna göre TOS düzeyinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Yüksek doz VD takviyesinin hücrel etki gösterdiği ve bu etkiye mitokondriyal düzeyde sitoplazmik aktiviteyi etkileyen hiperkalseminin aracılık ettiği bildirilmiştir (60). Bizim çalışmamızda da sadece VD uygulanan grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında bu grubun anlamlı olarak en yüksek VD ve Ca değerine sahip olduğu tespit edildi. Bu bulgular sonucunda, VD grubunda artan TOS düzeyinin hiperkalsemiye bağlı olabileceği düşüncesindeyiz. Sisplatin+VD grubunda ise TOS düzeyindeki azalmanın sisplatin uygulaması sonucu bozulmuş VDR ve enzim ekspresyonları nedeniyle olabileceği kanısındayız. Bu sonuçlara bakıldığında VD'nin sisplatin ile indüklenen testis hasarına karşı koruyucu bir etki sağladığı ancak uygun VD dozunun ayarlanması gerektiği söylenebilir.

Çalışmamızda HE ile boyanmış histolojik kesitlerde seminifer tübül çapları ve seminifer tübül epitel kalınlığı ölçülerek gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Sıçanlara sisplatin verilmesinin ardından seminifer tübüllerde hasar geliştiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Sisplatinin seminifer tübül çapında azalma, germinatif epitelde organizasyon bozukluğu ve mayozun farklı basamaklarındaki germ hücrelerinin lümene dökülmesine neden olduğu rapor edilmiştir (61,62). Beytur ve arkadaşları tek doz 7 mg/kg i.p sisplatin uyguladıkları 10 günlük çalışmada sisplatin uygulanan gruplarda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (63). Jourabi ve ark. yapmış olduğu 7 günlük bir çalışmada tek doz 5 mg/kg i.p sisplatin uygulanmış ve sisplatin verilen grup kontrol ile karşılaştırıldığında seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında anlamlı bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir (64). Biz de çalışmamızda benzer şekilde sisplatin uygulanan gruplarda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında anlamlı bir azalma olduğunu gözlemledik. Bu azalmanın, hücre çaplarının azalmasıyla ve/veya sisplatinin direkt yaptığı DNA hasarı nedeniyle olgunlaşmadan lümene atılan seminifer epitel hücrelerinin yokluğundan kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Ancak sisplatin+VD grubunda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı yönünden artış olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak Yalçın ve ark. metotreksat hasarına VD etkisini araştırdıkları çalışmada VD'nin hasar grubuna göre seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığını anlamlı olarak arttırdığını bildirmişlerdir (65). Mohamed ve ark. torsiyon-detorsiyon testis hasarı üzerine

yaptıkları araştırmada VD'nin hasar grubuna kıyasla seminifer tübül çapı ve germinal epitel yüksekliğinde anlamlı artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir (66). Diğer çalışma sonuçlarıyla olan bu farklılığın nedeninin, deney süremizin 10 gün ile sınırlı olması veya sıçanların ilaç duyarlılığındaki değişkenlik olduğu düşüncesindeyiz.

Mohammadnejad ve ark. sisplatinin testis üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada seminifer tübüllerde atrofi, germinal epitelde hasar, bazal lamina ile spermatogonyumlar arasında bağlantı kayıpları ve peritübüler alanda inflamasyon gözlediklerini bildirmişlerdir (67). Biz çalışmamızda seminifer tübül hasarını Johnsen skoru ile değerlendirdik ve sisplatin uygulanan grupta Johnsen skorunun anlamlı derecede düştüğünü tespit ettik. Ayrıca histolojik olarak eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde izlenen dejenere hücrelere, bazı seminifer tübüllerde çok sayıda annuler kromatinli spermatidlere ve birden fazla sayıda nükleus içeren dev hücrelere rastladık. Ilbey ve ark. sıçanlara beş gün, günlük 7 mg/kg i.p sisplatin uyguladıkları çalışmalarında, sisplatin uygulanan grup kontrol grubuyla kıyaslandığında spermatogenez sürecinin olumsuz etkilendiğini ve Johnsen skorunun anlamlı olarak düştüğünü rapor etmişlerdir (68). Azarbarz ve ark. da tek doz 5 mg/kg sisplatin uyguladıkları 15 günlük çalışmada sisplatinin Johnsen skorunda anlamlı düşüşe neden olduğunu ortaya koymuşlardır (69). Bu çalışmalara benzer şekilde çalışmamızın histopatolojik bulguları, sisplatinin seminifer tübüllerde atrofiye, germinal epitel kalınlığında azalmaya ve Johnsen skorunda anlamlı bir düşüşe neden olduğunu gösterdi. Sisplatin+VD uyguladığımız grup sisplatin grubuyla kıyaslandığında Johnsen skorunun anlamlı olarak yükseldiğini tespit ettik. Bizim çalışmamıza benzer olarak Yalçın ve ark. metotreksat ile testis hasarı oluşturdukları çalışmalarında VD uygulamasının Johnsen skorunu anlamlı derecede arttırdığını rapor etmişlerdir (70).

Çalışmamızda, seminifer tübülleri çevreleyen bazal membran yapısı PAS boyama metodu ile değerlendirildi. Sisplatin grubunda PAS ile boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranında ondülasyon ve PAS pozitifliğinin arttığı görüldü. Sakr ve ark. bizim çalışmamıza benzer şekilde, sitotoksik madde uygulanmış sıçanların seminifer tübül bazal laminalarının ve interstisyel alanların güçlü PAS pozitif boyandığını raporlamışlardır (71). Yapılan literatür taramasında VD'nin testis üzerine etkisini PAS boyama ile değerlendiren çalışmalara rastlanmadı.

Yapılan birçok çalışmada sisplatin uygulamasının vücut ve testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (56,72). Hamdy AA ve ark. yapmış olduğu 4 haftalık bir çalışmada, sıçanlara haftalık 7,5 mg/kg i.p sisplatin uygulamış ve sisplatin uygulanan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları yönünden anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (73). Köroğlu ve ark. yapmış olduğu 5 günlük bir çalışmada sıçanlara tek doz 7 mg/kg i.p sisplatin uygulanmış ve deney sonunda yapılan değerlendirmede sisplatin grubunda kontrol grubuna göre vücut ağırlığının anlamlı olarak daha düşük olduğu ancak testis ağırlığı yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirilmişlerdir (74). Bizim çalışmamızda ise deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları kıyaslandığında sisplatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir kilo kaybının olduğu ancak testis ağırlıkları yönünden gruplar arası anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi. Testis ağırlıkları yönünden çalışmalar arasındaki bu farklılığın, testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı dikkate alınmadan yapılan değerlendirmelerden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Sisplatin uygulanan gruplarda vücut ağırlığındaki kaybın nedeninin ise ilacın gastrointestinal sistem üzerindeki toksik etkisi olabileceği düşünülmektedir. Sisplatin oldukça emetojenik bir ajan olup bulantı, anoreksi, diyare ve malabsorbsiyon gibi gastrointestinal değişikliklere neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (75). Çalışmamızda sisplatin+VD grubu sisplatin grubuyla kıyaslandığında vücut ağırlığı ve testis ağırlığı yönünden anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Yalçın ve ark. metotreksat ile indüklenen testis hasarına VD etkisini araştırdıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde metotreksat ile metotreksat+VD grupları arasında vücut ağırlıkları yönünden anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir (70).

Spermatozoalar sperm motilitesi ve fertilizasyon için gerekli olan plazma membran akışkanlığını sağlamak amacıyla plazmalemmada yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asitleri içermektedir. Bu nedenle spermatozoalar oksidatif radikallere duyarlıdır. Sperm hücre membranının zarar görmesi sperm vitalitesinde ve sperm sayısında azalmaya neden olabilir (73,76). Kemoterapotik ajan olan sisplatin, spermatozoonun baş kısmında anomalilere ve spermatozoon DNA'sında hasara sebep olan genotoksik bir maddedir (77) Yücel ve ark. sisplatin tedavisinin testis dokusu ve spermatogenez üzerindeki yıkıcı etkilerinin retinoik asit uygulanarak azaltıldığını gösteren çalışmalarında, 7 mg/kg dozunda verilen sisplatinin sıçanlarda sperm hareketliliği ve

sayısını belirgin şekilde azalttığını bildirmişlerdir (8). Benzer şekilde Shati ve ark. sisplatinin anormal sperm sayısını artırdığını, sperm hareketliliği ve sayısını ise azalttığını rapor etmişlerdir (53). Ciftci ve ark. 5 mg/kg ve 10 mg/kg sisplatin uyguladıkları on günlük çalışmada sisplatin uygulamasının doza bağımlı olarak sperm konsantrasyonu ve motilitesinde anlamlı azalmaya ve anormal sperm oranında ise anlamlı artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (9). Ateşşahin ve ark. 7 mg/kg i.p sisplatin uyguladıkları on günlük çalışmanın neticesinde sisplatin uygulanan grupta sperm konsantrasyonu ve motilitesinde anlamlı bir azalma olduğunu, sperm anomalisinde ise anlamlı bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Anormal sperm oranındaki artışın nedeninin ise esas olarak artan kafa anomalileri olduğunu bildirmişlerdir (78). Biz de çalışmamızda sisplatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sperm sayısının ve sperm vitalitesinin anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. Ayrıca özellikle baş-boyun anomali olmak üzere, sisplatin uygulanan grupta morfolojik anomaliye sahip sperm oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını gözlemledik. Sisplatin ile yapılan hayvan çalışmaları gösteriyor ki sisplatin uygulaması anormal sperm ve ölü sperm oranında artışa neden oluyor. Anormal sperm oranındaki artışın nedeni sisplatinin mutajenik ve genotoksik etkisi olabilir. Ölü sperm oranındaki artışın nedeni ise sisplatin enjeksiyonunun vücutta serbest oksijen radikallerini arttırması ve plazma membranında yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asitleri bulunduran spermatozaların lipid peroksidasyonuna uğraması olabilir. Çalışmamızda sisplatin+VD grubu sisplatin grubuyla karşılaştırıldığında sperm vitalitesinin arttığı, sperm baş-boyun anomalisinin ise azaldığı tespit edildi. Abbaszadeh ve ark. kurşun hasarına karşı VD etkisini araştırdıkları çalışmada ilave VD verilmesinin bizim sonuçlarımıza benzer şekilde semen parametrelerinde (sperm konsantrasyonu, motilite ve vitalite) iyileşmeye neden olduğunu ortaya koymuşlardır (27). Ding ve ark. diyabetin testis hasarına VD etkisi üzerine yaptıkları çalışmalarında VD takviyesinin diyabet grubuna göre sperm miktarını arttırdığını ve sperm anomalisini azalttığını rapor etmişlerdir (32). Bunun sebebinin sisplatin+VD grubunda azalmış TOS düzeyi, VD grubunda ise yükselmiş serum Ca ve TOS düzeyi olabileceğini düşünmekteyiz.

Spermatogenezin başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli rol oynayan testosteron, Leydig hücreleri tarafından salgılanır ve testosteron seviyesi direkt olarak Leydig hücre fonksiyonu ve sayısı ile ilişkilidir (64). Germ hücrelerinin aksine, erişkinlerde çoğalmayan Sertoli ve Leydig hücreleri sitotoksik ajanlara dirençli hücreler

olup, çoğu sitotoksik terapi sonrasında hayatta kalırlar. Ancak bu hücreler fonksiyonel hasara uğrayabilir (79). Yapılan önceki çalışmalar sisplatin uygulamasının serum testosteron seviyesini azalttığını göstermiştir (62,80). Benzer şekilde, Afsar ve ark. yaptıkları çalışmalarında sisplatinin Leydig hücrelerinde hasar oluşturup hücre sayısında azalmaya ve testosteron seviyesinde düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir (81). Normal testosteron seviyelerine rağmen kemoterapinin Leydig hücre hasarına neden olduğu da bildirilmiştir ancak tam bir Leydig hücre yetmezliğinden söz etmek için testosteron seviyesinde düşme ve LH seviyesinde yükselme beklenmektedir. Ateşşahin ve ark. tek doz 7 mg/kg i.p sisplatin uyguladıkları 10 günlük bir çalışmada testosteron hormonu yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (82). Çalışmamızda Leydig hücre hasarını belirleyebilmek amacıyla serum testosteron seviyeleri ölçüldü ve sisplatin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, testosteron seviyesinin düştüğü ancak azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Ayrıca FSH ve LH sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında fark olmadığı görüldü. Bizim sonuçlarımız önceki bazı çalışmalara benzer şekilde sisplatinin tam bir Leydig hücre yetmezliğine neden olmadığını göstermiş oldu.

Erkeklerde östradiolün esas olarak testosteronun ekstra gonadal dönüşümünden kaynaklandığı bilinmektedir. Ancak yapılan araştırmalarda Sertoli hücresinin de aromataz ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca VD'nin Sertoli hücresinde aromataz ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle VD'nin aromataz enzim ekspresyonunu düzenleyerek östrojen seviyelerini sistemik ve lokal olarak etkilediği düşünülmektedir (83). Çalışmamızda sisplatin uygulanan grupta östrojen seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. Sisplatin ve sisplatin+VD grubu kıyaslandığında ise östrojen düzeylerinde artış olduğunu ancak anlamlı bir farkın bulunmadığını gözlemledik. Sisplatinin erkek ratlarda östrojen düzeyini azaltmasının nedeninin Sertoli hücresinde hasara bağlı olarak aromataz ekspresyonunda azalma ve/veya sisplatin uygulanan hayvanlarda düşen vücut ağırlığıyla beraber azalan yağ dokusu olabileceği düşüncesindeyiz. Çünkü bilindiği üzere yağ dokusu aromataz enzim ekspresyonuna sahiptir. Yapılan literatür taramasında erkek sıçanlarda, sisplatinin östrojen seviyesi üzerine etkisine yönelik çalışmaların bulunmaması nedeniyle mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, testis germ hücresi ölümünün apoptoz yoluyla meydana geldiğini göstermiştir. Spontan apoptoz, germ hücrelerinin gelişimi esnasında oluşan ve hasarlı germ hücrelerinin eliminasyonunu sağlayan fizyolojik bir süreç olup ayrıca iyonizan radyasyon, kemoterapi ve hormonal manipülasyonlar gibi bir takım dış uyaranlar da apoptoza yol açmaktadır (84). Sisplatin tedavisinin hücre apoptozuna neden olduğu birkaç moleküler mekanizmadan bahsedilir (52,85). Bunlardan ilki sisplatin toksisitesindeki en önemli mekanizmalardan olan oksidatif strestir. Artan reaktif oksijen türleri hem intrinsek hem ekstrinsek olarak apoptozu tetikler. İkincisi ise Ca homeostazisi üzerine etkisidir. Aktif hale gelen sisplatin oksidatif fosforilasyonda ayrılmaya neden olarak mitokondriyal solunum inhibisyonu yapar. Bu durum mitokondriden Ca akışına ve sonuçta hücre içi Ca seviyelerinde geçici bir artışa neden olur. Sisplatinin Ca homeostazisini bozması, oksidasyon başına lipid ve enzim inhibisyonu gibi birincil olayları başlatır. Sonuçta apoptoz veya nekroz gerçekleşir (46,86). Apoptoz anormal sperm oluşumunu önlemek için hasarlı spermatogenik hücrelerin uzaklaştırılmasında kritik bir role sahiptir (87). Ayrıca mitotik bölünmelerini tamamlayamayan spermatositlerin apoptoz ile uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (88). Spermatogonyal hücrelerin birbirinden ve bazal laminadan ayrılması, nükleer yoğunlaşma ve annuler kromatinli spermatidlerin görülmesi gibi bulgular seminifer tübüllerde apoptozun göstergesidir (67). Biz de çalışmamızda ışık mikroskopik olarak bazı seminifer tübüller içerisinde çok sayıda apoptoza gidecek olan annuler kromatinli spermatidlere rastladık. Ayrıca çalışmamızda apoptotik hücreler, immunohistokimyasal yöntemle kaspaz-3 aktivitesi kullanılarak belirlendi. Kaspazlar, hücre intiharı olarak bilinen apoptoz olayı esnasında önemli rol oynayan sistein-proteinaz grubu enzimlerdir ve apoptoz sırasında meydana gelen bazı hücresel değişiklikler bu enzimlerin aktivitesine bağlıdır (89). Simsek ve ark. toplam 36 mg/kg sisplatin uyguladıkları 10 günlük çalışmada sisplatin verilen grupta kaspaz-3 pozitifliğinin anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir (4). Hamdy A.A ve ark. haftalık 7,5 mg/kg sisplatin uyguladıkları 4 haftalık çalışmada sisplatin uygulanan sıçanlarda kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu tespit etmişlerdir (73). Jourabi ve ark. sisplatin hasarına metilen mavisinin etkisini araştırdıkları 7 günlük çalışmada tek doz 5 mg/kg sisplatin uygulamış ve sisplatin grubunda kaspaz-3 immün boyanmada artış olduğunu rapor etmişlerdir (64). Bizim çalışmamızda da sisplatin grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında kaspaz-3 pozitif hücre sayısının anlamlı olarak arttığı tespit edildi. Çalışmamızda sisplatin ve sisplatin+VD grubu kıyaslandığında ise kaspaz-3 pozitif hücre sayısının azaldığı

gözlendi. Benzer şekilde Helal ve ark. yapmış oldukları 90 günlük çalışmada günlük 1000 IU/kg VD takviyesi verdikleri sıçanlar hasar grubuyla karşılaştırıldığında kaspaz-3 yönünden anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (90). Ding ve ark. diyabetik sıçanlarda VD takviyesi üzerine yapmış oldukları çalışmada VD takviyesi verilen grupta hasar grubuna göre kaspaz-3 yönünden anlamlı azalma olduğunu rapor etmişlerdir (32). Yine benzer şekilde Yalçın ve ark. metotreksat hasarı üzerine VD etkisini araştırdıkları çalışmada metotreksat+VD grubu metotreksat grubuyla kıyaslandığında kaspaz-3 yönünden anlamlı bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir (65).

Vitamin D, Ca ve P homeostazı üzerine fonksiyonuyla bilinir ve esas olarak deride güneş ışınlarının etkisiyle in vivo sentez edilmektedir. Ancak steroid hormon reseptörüne bağlanması nedeniyle atipik bir vitamindir ve prohormon olarak değerlendirilir. VDR ve VD metabolize eden enzimlerin (CYP2R1, CYP27B1 ve CYP24A1) testiste Sertoli hücreleri, germ hücreleri, Leydig hücreleri, spermatozoa ve erkek genital yol epitel hücrelerinde eksprese edildiğinin gösterilmesi VD'nin spermatogenez ve sperm için önemli olabileceğine işaret etmektedir. VD eksikliğinin semen kalitesini olumsuz yönde etkilediği ve yapılan VD takviyeleriyle telafi edilebileceği birçok çalışmada ortaya konmuştur (50,83,91). Jensen ve ark. VDR seviyesinin sperm kalitesi için pozitif bir işaret olduğu belirterek ve 1 α ,25-dihidroksivitamin D3' ün insan spermatozoasında hücre içi Ca konsantrasyonunun VDR aracılığı ile artışını tetikleyerek sperm hareketliliğinin artmasına neden olabileceğini rapor etmişlerdir (92). Sood ve ark. VD eksikliği olan sıçanlarda Sertoli hücre fonksiyonunda düşüş, germinal epitelde dejeneratif değişiklikler ve Leydig hücrelerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir (93). Bunun yanı sıra yüksek VD düzeyinin semen parametrelerini olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. VD üç farklı dozda intramusküler uygulandığı hayvan deneyinde düşük doz VD enjeksiyonunun yüksek doz uygulamaya göre testis fonksiyonunu iyileştirdiği gösterildi. Bu çalışma hipervitaminoz D'nin intraselüler Ca düzeyini arttırarak mitokondriyal aktiviteyi değiştirdiği ve spermatogenez süreci üzerinde olumsuz etkileri olduğu sonucunu doğurdu. Bu bulgu erkek fertilitésinin düzenlenmesinde optimal VD dozunun önemini göstermektedir (94). Çalışmamızda serum VD seviyesinin sisplatin verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre azaldığı ancak anlamlı bir fark olmadığı, fakat VD uygulanan gruplar sisplatin ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında VD seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. Serum Ca seviyesi yönünden sisplatin ve

kontrol grubu arasında fark gözlenmezken, VD uygulanan grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında Ca seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. Serum P seviyesi yönünden ise gruplar arasında fark gözlenmedi. VD'nin fizyolojik etkisine uyumlu olarak çalışmamızda VD grubunda serum Ca seviyesi en yüksek düzeyde bulundu. Santos ve ark. VD takviyeli yemler ile besledikleri sıçanlarda 2 ay sonunda yapılan değerlendirmede VD düzeyinde ve Ca iyon düzeyinde anlamlı artış olduğunu rapor etmişlerdir (59). Helal ve ark. yapmış oldukları 90 günlük çalışmada günlük 1000 IU/kg VD takviyesi verdikleri sıçanlarda VD düzeyinin anlamlı olarak arttığını tespit etmişlerdir (90). Ding ve ark. diyabetik sıçanlarda VD takviyesi üzerine yapmış oldukları çalışmada gruplar arasında Ca ve P iyonu yönünden anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (32). Ayrıca çalışmamızda VD etkinliğini göstermek amacıyla kesitlere immünohistokimyasal olarak VDR boyaması uygulandı. Sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla VDR pozitifliğinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Sisplatin+VD grubunda ise sisplatin grubuna göre VDR pozitifliğinin anlamlı derecede arttığı izlendi. Benzer şekilde jeremy ve ark. D-galaktoz ile indüklenen sıçan grubunda VDR immünboyanmasının azaldığını, VD takviyesi verilen grupta ise hasar grubuna göre VDR immünboyanmasında artış olduğunu rapor etmişlerdir (95). Liu ve ark. diyabetik sıçanlarda VD etkisini araştırdıkları çalışmada diyabet oluşturulan grupta VDR ekspresyonunda azalma olduğunu, VD takviyesinin diyabet grubuna kıyasla VDR ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdığını bildirmişlerdir (96). Sisplatin grubunda VDR azalması artan TOS düzeyi veya artan apoptoz ile ilişkilendirilebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda, histopatolojik olarak, sisplatin uyguladığımız sıçanlarda, seminifer tübüllerin çapı ve germinatif epitel yüksekliğinde azalma, spermatogenik hücrelerde dökülme, eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış dejenere hücreler, annuler kromatinli spermatidler ve çok sayıda multinükleer dev hücreler gözlemlendi. Ayrıca bu grupta Johnsen skorunun anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. İmmunohistokimyasal olarak, sisplatin grubunda kaspaz-3 pozitif hücre sayısının arttığı, VDR pozitif hücre sayısının ise azaldığı izlendi. Ayrıca sisplatin grubunda sperm sayısı ve vitalitesinin azaldığı, anormal sperm miktarında ise artışın olduğu tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde, sisplatin grubunda TOS seviyelerinde artış gözlenirken, östrojen seviyesinde azalma saptandı. TAS, testosteron, FSH, LH, VD, Ca ve P seviyelerinde ise değişiklik izlenmedi.

Sisplatin uygulanan sıçanlara VD verilmesiyle testiste meydana gelen hasarın hafiflediği gözlemlendi. Histopatolojik olarak VD verilen tedavi grubunda seminifer tübül çapı ve germinal epitel yüksekliği yönünden değişiklik gözlenmezken, Johnsen skorunun yükseldiği tespit edildi. İmmunohistokimyasal olarak, sisplatin+ VD grubunda kaspaz-3 pozitif hücre sayısının azaldığı, buna karşın VDR pozitif hücre sayısının ise arttığı gözlemlendi. Ayrıca sisplatin+VD grubunda sperm sayısı yönünden değişiklik izlenmezken, vitalitenin arttığı, anormal sperm miktarında ise azalmanın olduğu tespit edildi. Biyokimyasal olarak çalışmamızda VD uygulamasının sisplatinin neden olduğu TOS artışını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi. TAS, testosteron, östrojen, FSH, LH, Ca ve P seviyelerinde ise değişiklik izlenmedi.

Sonuç olarak bu çalışma, sisplatin ile testis hasarı oluşturulan sıçanlarda, VD uygulamasının, testiküler hasarı hafiflettiğini göstermektedir. VD'nin Ca ve P homeostazisini düzenlemesinin yanısıra anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkileri ile sisplatin tedavisi alan hastalarda sisplatin ile kombine kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, klinik tedavi protokollerine VD'nin eklenmesi için daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Kim C, Kim B. Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. *Nutrients*. 2018;10.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71:209–49.
3. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods.
4. Simsek N, Koc A, Karadeniz A, Yildirim ME, Celik HT, Sari E, Kara A. Ameliorative effect of selenium in cisplatin-induced testicular damage in rats. *Acta Histochemica*. 2016;118:263–70.
5. Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1885–95.
6. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014;740:364–78.
7. Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncology Reports*. 2004;12:955–65.
8. Yucel C, Arslan FD, Ekmekci S, Ulker V, Kisa E, Yucel EE, Ucar M, Ilbey YO, Celik O, Basok BI, Kozacioglu Z. Protective effect of all-trans retinoic acid in cisplatin-induced testicular damage in rats. *World Journal of Men's Health*. 2019;37:249–56.
9. Ciftci O, Beytur A, Cakir O, Gurbuz N, Vardi N. Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platinum-N-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2011 [cited 2022 May 24];109:328–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21624060/>
10. Basalamah MA, Abdelghany AH, El-Boshy M, Ahmad J, Idris S, Refaat B. Vitamin D alleviates lead induced renal and testicular injuries by immunomodulatory and antioxidant mechanisms in rats. *Scientific Reports* 2018 8:1. 2018;8:1–13.
11. Jeremy M, Gurusubramanian G, Roy VK. Vitamin D3 treatment regulates apoptosis, antioxidant defense system, and DNA integrity in the epididymal sperm of an aged rat model. *Molecular Reproduction and Development*. 2019;86:1951–62.
12. Özsu S ÖT. Türkiye’de Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*. 2013;1:7–11.

13. Titi-Lartey OA, Khan YS. Embryology, Testicle. *StatPearls* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 28]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557763/>
14. Aparato genital masculino. [Internet]. [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://www.slideshare.net/JesusRafaelSanchezSustaita/aparato-genital-masculino-22033265?smtNoRedir=1>
15. testis | anatomy | Britannica [Internet]. [cited 2022 May 24]. Available from: <https://www.britannica.com/science/testis>
16. Testes: Anatomy, definition and diagram | Kenhub [Internet]. [cited 2022 Jun 5]. Available from: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-testes>
17. Major AT, Estermann MA, Smith CA. Anatomy, Endocrine Regulation, and Embryonic Development of the Rete Testis. *Endocrinology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 27];162:1–13. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/162/6/bqab046/6154516>
18. Lara NLM, Costa GMJ, Avelar GF, Lacerda SMSN, Hess RA, França LR. Testis physiology-overview and histology. *Encyclopedia of Reproduction*. 2018;105–16.
19. Figure 37.5 [Internet]. [cited 2022 Jun 5]. Available from: https://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/asset/img_ch37/c37_fig05.html
20. File:Figure 28 01 07.JPG - Wikimedia Commons [Internet]. [cited 2022 Jun 5]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_28_01_07.JPG
21. Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2021;13:303.
22. TRZASKA S. Cisplatin. *Chemical & Engineering News*. 2005;83:52.
23. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*. 2003;103:645–62.
24. Fidan F, Alkan BM, Tosun A. Çanın pandemisi: D vitamini eksikliği ve yetersizliği. *Türk Osteoporoz Dergisi*. 2014;20:71–4.
25. Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jørgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A, Leffers H. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Human Reproduction*. 2010;25:1303–11.

26. Physiology of Vitamin D, reprinted from Melanoma and vitamin D,... | Download Scientific Diagram [Internet]. [cited 2022 Jun 5]. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Physiology-of-Vitamin-D-reprinted-from-Melanoma-and-vitamin-D-Molecular-Oncology-5_fig1_319259733
27. Abbaszadeh S, Yadegari P, Imani A, Taghdir M. Vitamin D3 protects against lead-induced testicular toxicity by modulating Nrf2 and NF- κ B genes expression in rat. *Reproductive Toxicology*. 2021;103:36–45.
28. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523:123–33.
29. Zhu CL, Xu QF, Li SX, Wei YC, Zhu GC, Yang C, Shi YC. Investigation of serum vitamin D levels in Chinese infertile men. *Andrologia*. 2016;48:1261–6.
30. Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr*. 1989;119:741–4.
31. Sun W, Chen L, Zhang W, Wang R, Goltzman D, Miao D. Active vitamin d deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2015;308:E51–60.
32. Ding C, Wang Q, Hao Y, Ma X, Wu L, Du M, Li W, Wu Y, Guo F, Ma S, Huang F, Qin G. Vitamin D supplement improved testicular function in diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;473:161–7.
33. Ozturk M, Ucar S, Sar F, Erdogan S, Topdag M, Iseri M. Possible protective effect of sertraline against cisplatin-induced ototoxicity: An experimental study. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
34. Hassan HM, Al-Wahaibi LH, Elmorsy MA, Mahran YF. Suppression of Cisplatin-Induced Hepatic Injury in Rats Through Alarmin High-Mobility Group Box-1 Pathway by Ganoderma lucidum: Theoretical and Experimental Study. *Drug Design, Development and Therapy* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 1];14:2335. Available from: [/pmc/articles/PMC7296982/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347296982/)
35. Ekmekci C, Ekmekci S, Yücel C, Çakır E. Cardioprotective effect of all-trans retinoic acid on cisplatin induced cardiotoxicity in rats Ratlarda cisplatin kaynaklı kardiyotoksiste üzerine all-trans retinoik asidin kardiyoprotektif etkisi. *Cukurova Medical Journal Cukurova Med J*. 2021;46:1230–6.
36. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* [Internet]. 1970 [cited 2022 Jul 26];1:2–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5527187/>

37. Kaplan, A. and Glucose, K. (1984) ClinChem. The CV Mosby Co., St Louis, Toronto, Princeton, 436 p. - References - Scientific Research Publishing [Internet]. [cited 2022 Jul 26]. Available from: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2042643](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2042643)
38. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* [Internet]. 2005 [cited 2022 Jul 26];38:1103–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16214125/>
39. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* [Internet]. 2004 [cited 2022 Jul 26];37:277–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15003729/>
40. Aslan Ö, Vural H, Kömürçü Ş, Özet A, Sağ Kd Yb D, Deniz Hastanesi G, Doç Sağ Yb Y, Hemşirelik Yüksekokulu G, Tbp Yb D, Askeri Tıp Akademisi G, Tıp Fakültesi A, onkoloji TB. KEMOTERAPİ ALAN KANSER HASTALARINA VERİLEN EĞİTİMİN KEMOTERAPİ SEMPTOMLARINA ETKİSİ *. *Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*. 2006;10.
41. Ahmed EA, Omar HM, elghaffar SKA, Ragb SMM, Nasser AY. The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 26];49:1115–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21310208/>
42. Elrashidy RA, Hasan RA. Stromal cell-derived factor-1 α predominantly mediates the ameliorative effect of linagliptin against cisplatin-induced testicular injury in adult male rats. *Cytokine* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 26];136:155260–155260. Available from: <https://europepmc.org/article/med/32892071>
43. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jul 26];21:42–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979841/>
44. Chovanec M, Abu Zaid M, Hanna N, El-Kouri N, Einhorn LH, Albany C. Long-term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors. *Annals of Oncology* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 26];28:2670. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28266726/>
45. Mercantepe F, Mercantepe T, Topcu A, Yılmaz A, Tumkaya L. Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 26];391:915–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29860655/>

46. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 26];740:364–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058905/>
47. Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jul 26];74:545–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19616287/>
48. Ciftci O, Cetin A, Aydin M, Kaya K, Oguz F. Fish oil, contained in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, attenuates testicular and spermatological damage induced by cisplatin in rats. *Andrologia* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 26];46:1161–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24350676/>
49. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yilmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jul 26];21:42–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979841/>
50. Boisen IM, Bøllehuus Hansen L, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. Possible influence of vitamin D on male reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 26];173:215–22. Available from: <https://europepmc.org/article/med/27693423>
51. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 26];740:364–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058905/>
52. Ekinci Akdemir FN, Yildirim S, Kandemir FM, Aksu EH, Guler MC, Kiziltunc Ozmen H, Kucukler S, Eser G. The antiapoptotic and antioxidant effects of eugenol against cisplatin-induced testicular damage in the experimental model. *Andrologia* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 26];51:e13353. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/and.13353>
53. Shati AA. Resveratrol improves sperm parameter and testicular apoptosis in cisplatin-treated rats: Effects on ERK1/2, JNK, and Akt pathways. <https://doi.org/10.1080/1939636820181541114> [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 26];65:236–49. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19396368.2018.1541114>
54. Reddy KP, Madhu P, Reddy PS. Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;91:65–72.
55. Azarbarz N, Shafiei Seifabadi Z, Moaiedi MZ, Mansouri E. Assessment of the effect of sodium hydrogen sulfide (hydrogen sulfide donor) on cisplatin-induced

- testicular toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 26];27:8119–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900777/>
56. Yucel C, Arslan FD, Ekmekci S, Ulker V, Kisa E, Yucel EE, Ucar M, Ilbey YO, Celik O, Basok BI, Kozacioglu Z. Protective Effect of All-Trans Retinoic Acid in Cisplatin-Induced Testicular Damage in Rats. *The World Journal of Men's Health* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 27];37:249. Available from: [/pmc/articles/PMC6479087/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900777/)
 57. Mokhtari-Zaer A, Hosseini M, Salmani H, Arab Z, Zareian P. Vitamin D 3 attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Life Sci* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 26];253. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32334010/>
 58. Jeremy M, Gurusubramanian G, Roy VK. Vitamin D3 treatment regulates apoptosis, antioxidant defense system, and DNA integrity in the epididymal sperm of an aged rat model. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 26];86:1951–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31566824/>
 59. dos Santos PP, Rafacho BPM, Gonçalves AF, Pires VCM, Roscani MG, Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Fernandes AAH, Tanni SE, Zornoff LAM, de Paiva SAR. Vitamin D Supplementation Induces Cardiac Remodeling in Rats: Association with Thioredoxin-Interacting Protein and Thioredoxin. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 26];116:970–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34008824/>
 60. Sood S, Reghunandanan R, Reghunandanan V, Mary RK, Singh PI. Effect of vitamin D repletion on testicular function in vitamin D-deficient rats. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 1995 [cited 2022 Aug 1];39:95–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7625775/>
 61. Azarbarz N, Shafiei Seifabadi Z, Moaiedi MZ, Mansouri E. Assessment of the effect of sodium hydrogen sulfide (hydrogen sulfide donor) on cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 27];27:8119–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900777/>
 62. Jahan S, Munawar A, Razak S, Anam S, Ain QU, Ullah H, Afsar T, Abulmeaty M, Almajwal A. Ameliorative effects of rutin against cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats. *BMC Urology* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 27];18. Available from: [/pmc/articles/PMC6249881/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900777/)
 63. Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguzturk H, Yilmaz F. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2011 69:1 [Internet]. 2011 [cited 2022 Jun 24];69:207–13. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-011-1692-y>

64. Gholami Jourabi F, Yari S, Amiri P, Heidarianpour A, Hashemi H. The ameliorative effects of methylene blue on testicular damage induced by cisplatin in rats. *Andrologia* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 24];53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33079430/>
65. Yalcin A, Aydin H, Turk A, Dogukan M, Eser N, Onderci M, Uckardes F, Yoldas A, Yilmaz E, Keles H. Vitamin D: An effective way to combat methotrexate-induced testis injury. *Medicine Science* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 27];9:998–1003. Available from: <https://app.trdizin.gov.tr/makale/TkRFMk9EQXhNUT09/vitamin-d-an-effective-way-to-combat-methotrexate-induced-testis-injury>
66. Mohamed DI, Abou-Bakr DA, Ezzat SF, Abd El-Kareem HF, Abo Nahas HH, Saad HA, Mehana AE, Saied EM. Vitamin d3 prevents the deleterious effects of testicular torsion on testis by targeting mirna-145 and adam17: In silico and in vivo study. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 27];14:1222. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/12/1222/htm>
67. 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* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 27];2:173–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312789/>
68. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertility and Sterility*. 2009;92:1124–32.
69. Azarbarz N, Shafiei Seifabadi Z, Moaiedi MZ, Mansouri E. Assessment of the effect of sodium hydrogen sulfide (hydrogen sulfide donor) on cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 27];27:8119–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900777/>
70. Yalcin A, Aydin H, Turk A, Dogukan M, Eser N, Onderci M, Uckardes F, Yoldas A, Yilmaz E, Keles H. Vitamin D: An effective way to combat methotrexate-induced testis injury. *Medicine Science | International Medical Journal*. 2020;9:998.
71. Sakr SA, Zoil ME said, El-shafey SS. Ameliorative effect of grapefruit juice on amiodarone-induced cytogenetic and testicular damage in albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jul 27];3:573. Available from: [/pmc/articles/PMC3695585/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312789/)
72. Gholami Jourabi F, Yari S, Amiri P, Heidarianpour A, Hashemi H. The ameliorative effects of methylene blue on testicular damage induced by cisplatin in rats. *Andrologia* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 27];53:e13850. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/and.13850>

73. Aly HAA, Eid BG. Cisplatin induced testicular damage through mitochondria mediated apoptosis, inflammation and oxidative stress in rats: impact of resveratrol. *Endocr J* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 27];67:969–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32507773/>
74. Köroğlu KM, Çevik Ö, Şener G, Ercan F. Apocynin alleviates cisplatin-induced testicular cytotoxicity by regulating oxidative stress and apoptosis in rats. *Andrologia* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 27];51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30623469/>
75. Shahid F, Farooqui Z, Khan AA, Khan F. Oral Nigella sativa oil and thymoquinone administration ameliorates the effect of long-term cisplatin treatment on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane, and antioxidant defense in rat intestine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 27];391:145–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29302711/>
76. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertility and Sterility*. 2009;92:1124–32.
77. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yilmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jul 27];21:42–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979841/>
78. Ateşşahin A, Şanna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yilmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jul 17];41:21–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16842537/>
79. Shetty G, Meistrich ML. Hormonal Approaches to Preservation and Restoration of Male Fertility After Cancer Treatment. *JNCI Monographs* [Internet]. 2005 [cited 2022 Jul 27];2005:36–9. Available from: <https://academic.oup.com/jncimono/article/2005/34/36/905247>
80. Salem EA, Salem NA, Maarouf AM, Serefoglu EC, Hellstrom WJG. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 27];79:1184.e1-1184.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546410/>
81. Afsar T, Razak S, Khan MR, Almajwal A. Acacia hydasypica ethyl acetate extract protects against cisplatin-induced DNA damage, oxidative stress and testicular injuries in adult male rats. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 27];17:1–14. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3898-9>

82. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yilmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jul 17];21:42–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979841/>
83. Lorenzen M, Boisen IM, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. Reproductive endocrinology of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 17];453:103–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28342856/>
84. Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi | TR Dizin [Internet]. [cited 2022 Jul 27]. Available from: <https://app.trdizin.gov.tr/makale/TXpBM053PT0=/sican-germ-hucrelerinde-radyasyona-bagli-apoptoz-ve-amifostin-ile-iliskisi>
85. Meligy FY, Abo Elgheed AT, Alghareeb SM. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on Cisplatin induced testicular damage in adult male albino rat. <https://doi.org/10.1080/0191312320191572256> [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 27];43:28–55. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01913123.2019.1572256>
86. de Martinis BS, Bianchi MDLP. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol Res* [Internet]. 2001 [cited 2022 Jul 17];44:317–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11592867/>
87. Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* [Internet]. 1997 [cited 2022 Jul 27];56:1490–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9166702/>
88. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis - Print - 2000 - BioEssays - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2022 Jul 27]. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5%3C423::AID-BIES4%3E3.0.CO;2-0](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5%3C423::AID-BIES4%3E3.0.CO;2-0)
89. Özatik FY, Özatik O, Yiğitaslan S, Çengelli Ünel Ç, Erol K. Protective role of resveratrol on testicular germ cells in mice with testicular toxicity. *Turkish Journal of Urology* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 27];43:444. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33930367/>
90. Helal BAF, Ismail GM, Nassar SE, Zeid AAA. Effect of vitamin D on experimental model of polycystic ovary syndrome in female rats. *Life Sci* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 27];283. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33930367/>

91. Cito G, Cocci A, Micelli E, Gabutti A, Russo GI, Coccia ME, Franco G, Serni S, Carini M, Natali A. Vitamin D and Male Fertility: An Updated Review. *The World Journal of Men's Health* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 17];38:164. Available from: [/pmc/articles/PMC7076312/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37076312/)
92. Jensen MB. Vitamin D and male reproduction. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 27];10:175–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24419359/>
93. Sood S, Marya RK, Reghunandanan R, Singh GP, Jaswal TS, Gopinathan K. Effect of vitamin D deficiency on testicular function in the rat. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 1992 [cited 2022 Jul 17];36:203–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1471857/>
94. Sood S, Reghunandanan R, Reghunandanan V, Mary RK, Singh PI. Effect of vitamin D repletion on testicular function in vitamin D-deficient rats. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 1995 [cited 2022 Jul 17];39:95–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7625775/>
95. Jeremy M, Gurusubramanian G, Kumar Roy V. Vitamin D3 regulates apoptosis and proliferation in the testis of D-galactose-induced aged rat model. Available from: www.nature.com/scientificreports
96. Liu Y, He Y, Wang Q, Guo F, Huang F, Ji L, An T, Qin G. Vitamin D3 supplementation improves testicular function in diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor- γ /transforming growth factor-beta 1/nuclear factor-kappa B. *Journal of Diabetes Investigation* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jul 27];10:261–71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jdi.12886>