



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA KARŞI
APOSİNİNİN OLASI İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

MUSTAFA KUTAY KÖROĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Feriha ERCAN

İSTANBUL-2016

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Mustafa Kutay KÖROĞLU
Tez Başlığı : Sisplatin İle Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Aposininin Olası
İyileştirici Etkisinin Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak
Değerlendirilmesi.
Sınav Yeri : Histoloji ve Embriyoloji
Sınav Tarihi : 23.06.2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Feriha ERCAN

Kurumu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

(Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Şule ÇETİNEL

Prof.Dr.Canan HÜRDAĞ

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İstanbul Bilim Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 30/06/2016 tarih ve 35 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

M. KUTAY KÖROĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm çok değerli danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız
Prof. Dr. Feriha Ercan'a,

Öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocalarım
Prof. Dr. Şule Çetinel, Prof Dr. Serap Şirvancı ve Doç. Dr. Dilek Akakın'a,

Tez deneylerimin tüm aşamalarında ve biyokimyasal analizlerde bilgi ve tecrübesini esirgemeyen M.Ü Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi Prof. Dr.Göksel Şener'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgisi ve yardımları ile destek olan
Yrd. Doç. Dr. Naziye Özkan'a ve Dr. Özlem Tuğçe Kaya'ya,
Tez hayatım boyunca yakın arkadaşlık kurduğumuz, ailem gibi olan çok değerli
büyüklerim ve arkadaşlarım,
Doktora ve Yüksek Lisans Öğrencileri Bircan Kolbaşı, Nagehan Özyılmaz Yay,
Ayça Karagöz, Merve Açikel Elmas, Elif Kervancıoğlu Demirci,
Olgu Enis Tok, Sercan Doğukan Yıldız, Duygu Gürsoy,
Nurdan Bülbül, Furkan Bölükbaşı'na, Damla Anıl ve Cansu Kandemir'e,
Teknikerlerimiz Ünal Devrim, Yücel Öztürk ve Belgin Terzi'ye

Yüksek lisans yapmamı destekleyen Emb. Dr. Engin Enginsu'ya,

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, sevgi ve ilgi ile büyüten aileme
ve hayatımın anlamı kardeşim Doktor adayı S. Benay Köroğlu'ya teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından
SAG-C-YLP-090414-0076 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Testis Histolojisi	5
4.2. Oksidatif Stres	11
4.3. Sisplatin	13
4.4. Aposinin	14
5.GEREÇ VE YÖNTEM	17
5.1. Deney Hayvanları	17
5.2. Deney Grupları	17
5.3. Sperm sayımı	18
5.4. Işık mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skorlama	18
5.5. PCNA İmmunohistokimyası	19
5.6. TUNEL Yöntemi	20
5.7. NOX2 İmmünohistokimya boyama Yöntemi	21
5.8. Geçirimli Elektron Mikroskobu Preparasyonu	22
5.9. Oksidatif Stres Analizi	22
5.9.1. Malondialdehit Tayini	22
5.9.2. Glutasyon Tayini	23
5.9.3. MPO Tayini	23
5.9.4. SOD Tayini	24
5.9.5. 8-OHdG Tayini	24
5.10. İstatistiksel Analiz	24
6. BULGULAR	25
6.1. Sıçan Ağırlığı	25
6.2. Testis Ağırlığı	26
6.3. Semen Analizi Sonuçları	27
6.4. Morfolojik Bulgular	31
6.5. Seminifer Tübül Hasarı Histopatolojik Skorlama Bulguları	44

6.6. PCNA İmmunohistokimyası Bulguları	45
6.7. TUNEL Bulguları	48
6.8 NOX2 Bulguları	52
6.9. Elektron Mikroskopi Bulguları	55
6.10. Oksidatif Stres Bulguları	60
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
8. KAYNAKLAR	70
9. ÖZGEÇMİŞ	79
10. ETİK KURUL ONAYI	81



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Erkek genital sistemi	6
Şekil 2: Testis ve genital kanalların şematik gösterimi	6
Şekil 3. Seminifer tübülün bir parçası.	9
Şekil 4: APO	15
Şekil 5: APO -dimerizasyonu ile aktif APO üretimi	15
Şekil 6: APO NOX inhibisyon mekanizması	16
Şekil 7: Deney gruplarının sıçan ağırlıkları grafiği.	25
Şekil 8: Deney gruplarının sıçan ağırlıkları grafiği.	26
Şekil 9: Deney gruplarının sıçan sperm sayısı grafiği.	28
Şekil 10: Deney gruplarının morfolojik hasar oranı grafiği.	28
Şekil 11. Deney gruplarında normal, regresif, dejeneratif tübüllerin sayısı.	44
Şekil 12. Deney gruplarına ait proliferasyon indeksi grafiği.	51
Şekil 13: Deney gruplarına ait apoptotik indeks grafiği.	51
Şekil 14: Deney gruplarına ait NOX2-ir pozitif hücre indeks grafiği.	52
Şekil 15: Deney gruplarında MDA, GSH, MPO, SOD, 8-OHdG düzeyleri.	62

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1:** Kontrol (A) ve APO (B) grubundaki sıçanlarda normal morfolojide spermatozoalar görülmektedir. Diff-Quick boyası.....**29**
- Resim 2:** SİS (A) grubunda baş (→), boyun (►) ve kuyruk (*) anomalisi olan spermatozoalar görülmektedir. SİS+APO (B) grubunda normal morfolojide spermatozoaların yanısıra baş (→) ve boyun (►) anomalisi olan spermatozoalar görülmektedir. Diff-Quick boyası.....**30**
- Resim 3:** Kontrol (A) ve APO (B) gruplarında, germinal epiteldeki spermatogonyumların, primer spermatositlerin, sekonder spermatositlerin, spermatidlerin, spermatozoanın, Sertoli ve Leydig hücrelerinin ve seminifer tübül kontürlerinin düzenli yapısı görülmektedir. H&E boyası.....**32**
- Resim 4 A, B, C:** SİS grubunda, seminifer tübüllerin epitelinde yer yer alçalma (→), seminifer tübüllerin epitelinde düzensizlik (►), spermatogenik hücrelerde vakuol (v), dejeneratif (d) ve artrofik (a) seminifer tübülleri görülmektedir. H&E boyası.....**33**
- Resim 6 A, B:** Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) seminifer tübül bazal membranlarının düzenli yapısı görülmektedir. PAS reaksiyonu.....**35**
- Resim 7 A, B:** SİS grubunda (A) Seminifer tübülün bazal membranında yer yer düzensizlikler (→), lümende spermatogenik hücre döküntüleri (*) görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) seminifer tübül bazal membran yapısının düzenli yapısı görülmektedir. PAS reaksiyonu.....**36**
- Resim 8 A, B:** Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) seminifer tübülün ve interstisyel bağ dokusunun düzenli yapısı görülmektedir. Masson'un Trikrom boyası.....**38**
- Resim 9 A, B:** SİS grubunda (A) seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (*) ve dejeneratif (d) seminifer tübüller ve düzenli morfolojide interstisyel bağ dokusu görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) düzenli morfolojide interstisyel bağ dokusu görülmektedir. Masson'un Trikrom boyası.....**39**
- Resim 10 A, B:** Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) seminifer tübülün düzenli yapısı görülmektedir. Toluidin Mavisi boyası.....**40**
- Resim 11 A, B:** SİS grubunda (A) spermatogenik hücreler arasında ayrılmalar (→) ve seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (*) görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) yer yer spermatogenik hücreler arasında ayrılmalar (→) görülmektedir. Toluidin Mavisi boyası.....**41**
- Resim 12 A, B:** Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) epididimal kanallarının düzenli yapısı ve lümende sperm kümeleri görülmektedir. H&E boyası.....**42**
- Resim 13 A, B:** SİS grubunda (A) epididimal kanal lümeninde spermatoza sayısının azaldığı (*) fibromüsküler bağ dokusunda enflamatuvar hücre infiltrasyonu (→) görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) epididimal kanallarının düzenli yapısı, lümende sperm sayısında artış ve yer yer enflamatuvar hücre infiltrasyonu (→) görülmektedir. H&E boyası.....**43**
- Resim 14 A, B, C:** İnce barsak dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde PCNA pozitif (*) boyanma gösteren hücreler görülmektedir (A). Kontrol (B) ve APO grubunda (C) çok sayıda PCNA pozitif spermatogenik hücre serisi içeren seminifer tübüller (n) görülmektedir. PCNA immünohistokimyası.....**46**
- Resim 15 A, B:** SİS grubunda (A), seminifer tübüllerde (*), PCNA pozitif boyanmış hücre sayısında azalma olduğu görülmektedir. SİS+APO grubunda (B) PCNA pozitif

spermatogenik hücre serisini içeren normal seminifer tübüllerin (n) yanı sıra, az sayıda PCNA pozitif spermatogonyumların boyandığı seminifer tübüller (*) görülmektedir.....	47
Resim 16 A, B: Kontrol (A) ve APO grubunda (B) az sayıda hücrede TUNEL pozitif işaretlenme (→) görülmektedir. TUNEL boyaması.....	49
Resim 17 A, B: SİS grubunda (A) TUNEL pozitif işaretlenme (→) görülen hücrelerde artış görülmektedir. SİS+APO grubunda (B) az sayıda hücrede TUNEL pozitif işaretlenme (→) görülmektedir. TUNEL boyaması.....	50
Resim 18 A, B: Kontrol (A) ve APO grubunda (B) interstisyel alanda az sayıda NOX2-ir pozitif hücreler (→) parlak yeşil renkte, NOX2-ir negatif hücreler ise parlak mavi renkte (►) görülmektedir. NOX2 ve DAPI II immünfloresan boyaması.	
Resim 19 A, B: SİS grubunda (A) seminifer tübüllerde NOX2-ir (→) pozitif sekonder spermatositler, spermatitler ve spermatozoalarda artış olduğu görülmektedir. SİS+APO grubunda (B) az sayıda NOX2-ir pozitif hücre (→) görülmektedir. NOX2 ve DAPI II immünfloresan boyaması.....	54
Resim 20 A, B, C: Kontrol grubunda bazal laminanın, Sertoli hücrelerinin spermatogonyumların, primer spermatositlerin (A) ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların düzenli morfolojisi görülmektedir.....	56
Resim 21 A, B, C: APO grubunda Sertoli hücrelerinin, spermatogonyumların, primer spermatositlerin ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların düzenli morfolojisi görülmektedir.....	57
Resim 22 A, B: SİS grubunda bazal laminada sitoplazma içine doğru parmaklı uzantıların oluşumu (→), bazal kompartmanda hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların etrafında büyük vakuol oluşumları (*) görülmektedir.....	58
Resim 23 A, B, C: SİS+APO grubunda bazal laminanın, Sertoli hücreleri ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların düzenli morfolojisi (→, A) ve bazı alanlarda vakuol oluşumu (v, A) görülmektedir. Lümeninde uzamış spermatidler (►, B) görülmektedir.....	59

1. ÖZET

Sisplatin ile Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Aposininin Olası İyileştirici Etkisinin Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

M. Kutay Köroğlu, Prof. Dr. Feriha Ercan

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmada sisplatinin (SİS) sıçan testisi üzerine olan toksik etkilerine karşı aposininin (APO) olası koruyucu rolünün histolojik, histokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada Sprague-Dawley ırkı sıçanlar kullanılmış ve 1) Kontrol, 2) APO, 3) SİS ve 4) SİS+APO olmak üzere 4 deney grubu (n=8) oluşturulmuştur. SİS gruplarına tek doz 7 mg/kg i.p. SİS uygulanmış, sonrasında 5 gün boyunca dimetilsülfoksit (DMSO) ya da 25 mg/kg APO oral olarak uygulanmıştır. Kontrol gruplarına sadece DMSO ya da APO uygulanmıştır. Tüm deney gruplarındaki sıçanlar deneyin 5. gününde eter anestezisi altında dekapitasyonundan sonra, ayrılan testis dokuları histopatolojik ve ince yapısal değişiklikleri inceleme, hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve NOX2 tespiti için değerlendirilmesi için hazırlanmıştır. Biyokimyasal teknikler ile malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), glutatyon (GSH), süperoksitdismutaz (SOD) ve oksidan DNA hasarı için 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHDg) düzeylerine bakılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmiştir. **Bulgular ve Sonuçlar:** SİS uygulanan grupta dejeneratif tübül, NOX2 pozitif ve TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı, SİS+APO grubunda ise azaldığı görülmüştür. SİS grubunda proliferatif indeksin anlamlı şekilde düştüğü, SİS+APO grubunda arttığı görülmüştür. Elektron mikroskopik incelemelerde, SİS grubunda Sertoli hücrelerinin ve spermatogenik seriye ait hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda ve büyük vakuoller ve hücreler arası alanlarda açılmalar gözlenmekte iken SİS+APO grubunda hücreler arasındaki açılmaların azaldığı ve hücre içinde az sayıda küçük vakuollerin olduğu görülmüştür. SİS grubunda MDA düzeyi, MPO ve 8-OHDg aktivitesi artmış, GSH ve SOD düzeyi ise düşmüştür. SİS+APO grubunda ise MDA düzeyi, MPO ve 8-OHDg aktivetelerinde düşüş, GSH ve SOD düzeylerinde ise artış gözlenmiştir. Sonuç olarak SİS'in oksidatif stres oluşturarak testiste hasar meydana getirdiği, seminifer tübüllerde spermatogenik hücre serilerinde azalmaya yol açtığı, spermatogenik hücrelerde apoptozu arttırdığı ve APO'nun ise antioksidan etkileri ile oluşan hasarı önlediği gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Sisplatin, Aposinin, Testis, Nox2, Apoptoz

2.SUMMARY

Morphological and Biochemical Evaluation of Protective Effects of Apocynin on Cisplatin-Induced Testis Damage

M. Kutay Köroğlu, Prof. Dr. Feriha Ercan

Department of Histology and Embryology

Aim: In this study, we aimed to investigate the possible protective role of Apocynin (4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone, APO) on cisplatin (CIS)-induced testicular toxicity in rats using histological, histochemical, ultrastructural and biochemical methods. **Material and Methods:** Sprague Dawley rats were used in the study and experimental groups (n=7) were formed as: 1-control, 2-APO, 3-CIS and 4-CIS+APO groups. Following a single dose of CIS (7mg/kg i.p.), either dimethyl sulfoxide (DMSO) or APO (25mg/kg, orally) was administered for 5 days. The testis tissue samples were prepared for light and electron microscopical investigation in order to evaluate general histopathology and ultrastructure, proliferative and apoptotic cells, and localization of NOX2. In order to examine oxidative tissue injury, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH), and superoxide dismutase (SOD) levels were analyzed biochemically. Data were analyzed statistically. **Results and Conclusion:** Increased degenerated and atrophic tubules, TUNEL+ and NOX2 immunoreactive cells, numerous large vacuoles in the cytoplasm of spermatogonial and Sertoli cells and dilatation of intercellular tight junctions and decreased proliferative index were observed in CIS group compared to controls. Morphological parameters were ameliorated in CIS+APO group and smaller vacuoles in the cell cytoplasm and less dilatation of intercellular tight junctions were observed. While MDA and 8-OHdG levels and MPO activity were significantly increased, GSH and SOD levels were significantly decreased in CIS group compared to controls. All biochemical parameters were ameliorated in CIS+APO group when compared to CIS induced rats. In conclusion, cisplatin causes testis damage by decreasing spermatogenic cell line and increasing apoptosis and NOX2 activity via formation of oxidative stress, and apocynin prevents testis damage by its possible antioxidant effects.

Key Words: Cisplatin, Apocynin, Testis, Apoptosis, NOX2

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki dokulardan birine ait bir veya birkaç hücrenin normal özellikleri dışında değişim göstererek kontrolsüzce çoğalması ile meydana gelen ve genellikle tümör meydana gelmesine sebep olan, çağımızın en önemli hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir. Günümüzde çeşitli tedaviler bulunmamakla beraber tedaviye yönelik olarak kanser hücrelerini öldürücü kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır (Wright NA, 2002).

Sisplatin (SİS, cis-diaminedikloroplatinum (II)), baş-boyun, mesane, prostat, testis, serviks, özofagus, over kanserleri, östeojenik sarkom ve nöroblastoma gibi birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan, oldukça geniş spektrumlu bir kemoterapötik ajandır (Kayaalp, 1998). DNA çift zincirinde zincir içi ve zincirler arası çapraz kovalent bağlar oluşturarak DNA sentezini engellemektedir. SİS'in birçok sistem üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Başta nefrotoksisite olmak üzere ototoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, miyelosupresyon ve gonadotoksisite gibi yan etkileri klinik olarak önemlidir ve kullanımını sınırlamaktadır. SİS metabolizması sırasında oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin toksisitesi nedeniyle dokularda harabiyet meydana getirdiği düşünülmektedir (Şener ve ark. 2000). Tedavi edici etkisinin yanı sıra gonadotoksik etkisinin yüksek olması sebebiyle kemoterapötiklerin kanserli ve sağlıklı erkeklerin reproduktif sistemi üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmaların çoğu SİS ile yapılmıştır. Sadece SİS veya SİS tabanlı kombine kemoterapi alan kanserli hastaların hemen hemen hepsinde akut azoospermi şekillendiği, hastaların yaklaşık yarısında kemoterapiden sonraki 6 ay ile 5 yıl arasındaki bir sürede sperm sayısında normalleşme olduğu görülmektedir ancak hastaların %30'unda kalıcı azoospermi meydana geldiği belirtilmiştir (Türk, 2013). Ayrıca SİS'in sperm toksisitesi, DNA hasarı ve kromatin anomalileri üzerine etki ettiği, süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri ve oksidatif stres nedeniyle lipid peroksidasyonunun oluşumuyla serbest radikallerin aşırı üretimine neden olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Yuluğ ve ark., 2013).

Günümüzde kemoterapötiklerin kullanımı sırasında oluşan doku hasarının azaltılabilmesi için en yaygın kullanılan alternatif tedavi yöntemi antioksidan maddelerin kullanımıdır. Bu koruyucu tedaviler konusunda çok sayıda araştırma mevcuttur. Aposinin (APO, 4-hydroxy-3methoxy-acetophenone), doğal yolla metoksi ile yer değiştirmiş katekol meydana getiren, Apocynum cannabinum (Canadian hemp) ve Picrorhiza kurroa (Scrophulariaceae) bitkilerinin köklerinden ekstakte edilen, iyi bilinen bir NADPH oksidaz (NOX) inhibitörüdür. Bu enzim reaktif oksijen türevleri (ROS) üretimini sağlayan bir enzimdir ve inhibisyonu ile aktive olmuş nötrofil ve makrofajlardan salınan süperoksit oluşumunu inhibe olur (Stefanska J ve ark., 2008). APO'nun antioksidan aktivitesi sonucunda serumdaki testosteron seviyesini arttırdığı ve testisteki morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri engellemeye çalıştığı çalışmalarda bildirilmiştir (Li M ve ark., 2013; Guo-Lin Z ve ark., 2013). Bu nedenle kemoterapötiklerle beraber kullanımının hücre ve dokularda koruyucu etkileri araştırılmaktadır.

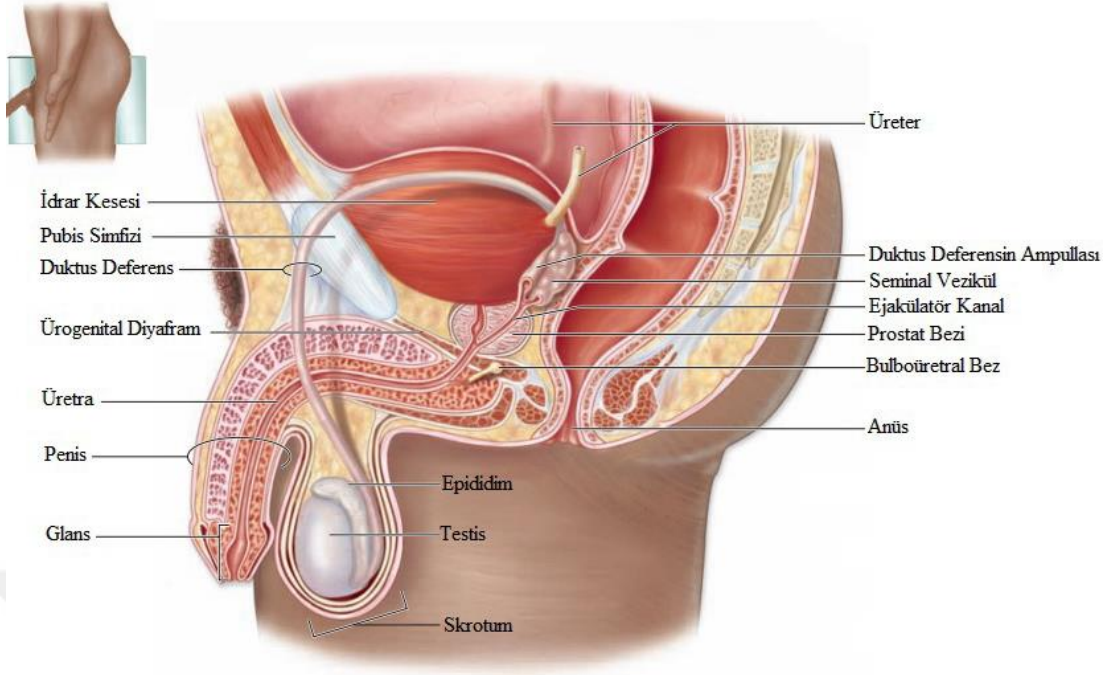
Bu çalışmada deney hayvanlarında SİS uygulanması ile ortaya çıkabilecek gonadotoksik yan etkilerin belirlenmesi ve bu yan etkilere karşı güçlü bir antioksidan olduğu düşünülen APO'nun koruyucu etkilerinin histolojik, histokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

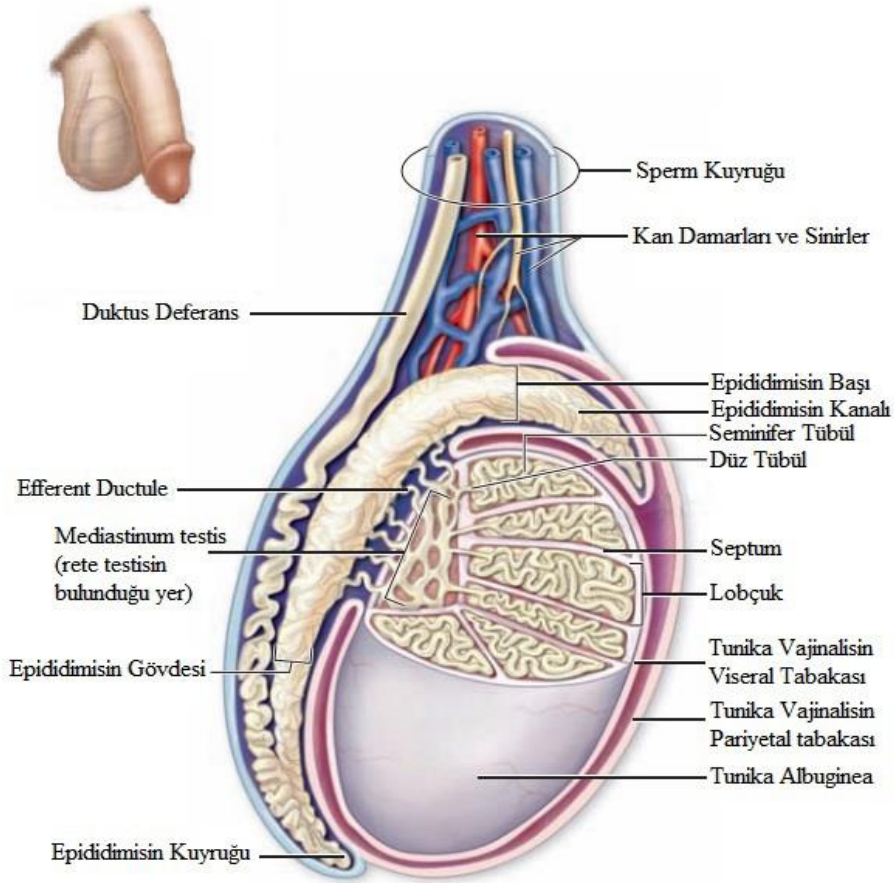
4.1. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi testislerden, genital boşaltım kanallarından, penisten ve aksesuar cinsiyet bezlerinden oluşmaktadır (Şekil 1). Aksesuar cinsiyet bezleri prostat, veziküla seminalisler ve bulboüretral bezlerdir. Testis, steroidogenez ve spermatogenez olmak üzere başlıca iki fonksiyonu bulundurur.

Testisler tunika albuginea ismi verilen yoğun bağ dokusundan meydana gelen kalın bir kapsül ile sarılıdır. Tunika albuginea testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testis ismi verilen yapıyı oluşturur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi testiküler lobüller olarak adlandırılan yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye böler. Testisin her bir lobülü, içinde sperm üretimi olan yüksek düzeyde kıvrımlı 1-4 seminifer tübülden ve Leydig (intestisyel) hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelmektedir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller seminifer tübüllerin bir labirente bağlanmasını sağlar. Anostomoz yapan rete testis kanalları yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanır (Ross ve Pawlina, 2014) (Şekil 2).



Şekil 1: Erkek genital sistemi (Anthony L. Mesher ve ark., 2015).



Şekil 2: Testis ve genital kanalların şematik gösterimi (Anthony L. Mesher ve ark., 2015).

Seminifer epitelyum iki temel hücre popülasyonundan oluşan kompleks, çok katlı ve sıra dışı bir epiteldir. Bu iki temel hücre destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinen Sertoli hücreleri ve düzenli olarak çoğalarak olgun sperme farklılaşan spermatogenik hücrelerdir.

Spermatogenik seri hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir ve işlevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatogonyumdan spermatozoon gelişim süreci spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatogenez puberteden kısa bir süre önce, pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi altında başlar ve yaşam boyunca devam eder. Spermatogenez, hipofizin folikül stimulan (FSH) ve lüteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH intertisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'ın ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda androjen bağlayıcı proteinin (ABP) sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve testosteronu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir.

Spermatogenez üç faza ayrılmaktadır:

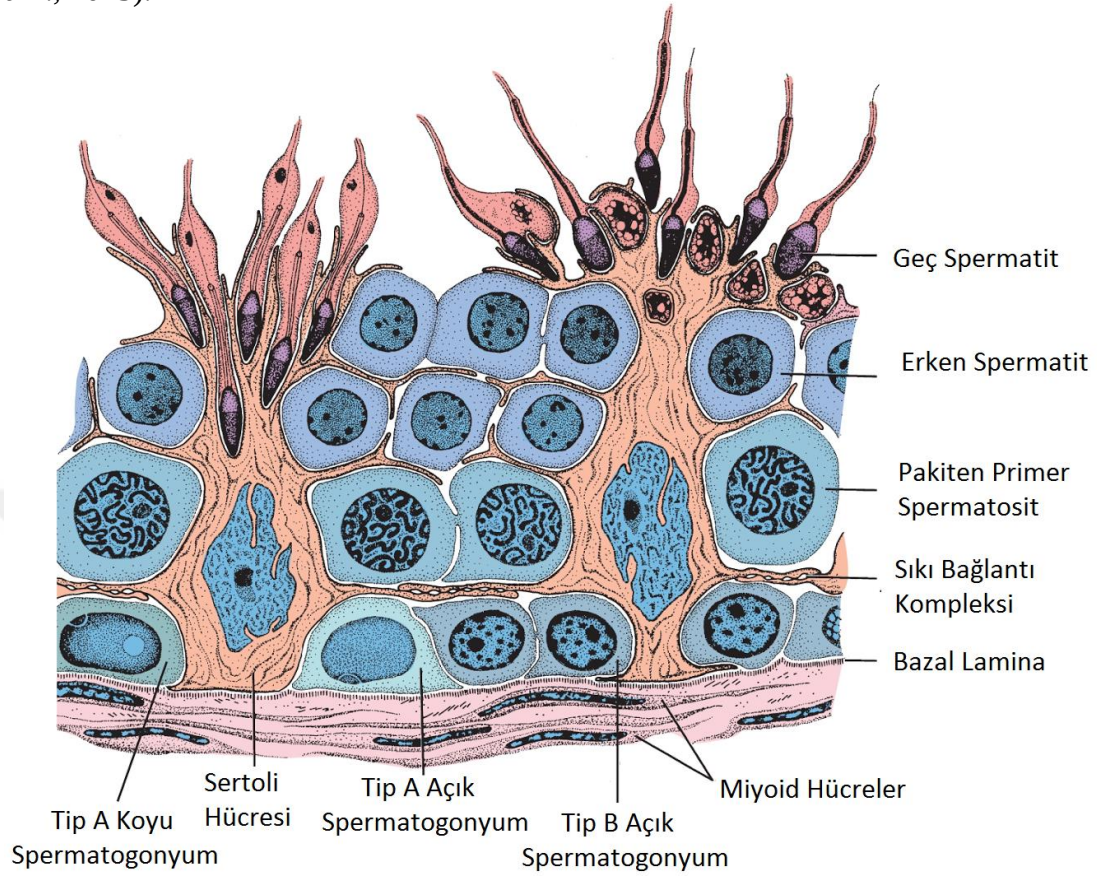
1. Spermatogonyal fazda spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek hücreleri oluştururken, sonuçta primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum popülasyonunu da oluştururlar.
2. Spermatosit fazında primer spermatositler iki mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azaltırlar ve spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar.
3. Spermatid fazında (spermiyogenez) spermatidler matür sperm hücrelerine farklılaşırlar (Ross ve Pawlina, 2014).

İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır. Bunlar, koyu renkli boyanan koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyum kök hücre rezervi olarak görev alır. Zaman zaman tip B spermatogonyuma farklılaşan açık tip A spermatogonyuma bölünür. Tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar mitotik bölünmeler geçirdikten sonra primer spermatositleri oluştururlar. Son S fazını (DNA sentezini) tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına giren primer spermatositler, tetraploid DNA miktarına sahiptir. Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi meydana getirmek üzere birinci mayoz bölünmeye (redüksiyon bölünmesi) girer. Diploid DNA miktarına sahip sekonder spermatositler belirgin bir DNA sentezi olmayan, sadece tamir DNA sentezinin meydana geldiği ikinci mayoz bölünmeye (eşitlenme bölünmesi) girer. Spermatositler, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların üstünde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Dolayısıyla mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde meydana gelir. Her bir sekonder spermatositten haploid DNA miktarına sahip iki adet spermatid oluşur.

Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur (Şekil 3).

İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür. Sürecin yavaş olmasının yanı sıra spermatogenez her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu nedenle bir tübül kesitinin farklı alanlarında ve farklı tübül kesitlerinde spermatogenezin farklı aşamaları izlenebilmektedir. Bu aynı zamanda spermatozoonların neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin görüldüğünü de açıklamaktadır. Bu

durum seminifer epitelyum siklusu olarak adlandırılmaktadır (Anthony L. Mesher ve ark., 2015).



Şekil 3. Seminifer tübülün bir parçası. Seminifer epitel 2 tip hücreden oluşmuştur: Spermatogenik seri hücreleri ve destek ya da sertoli hücreleri (Ross ve Pawlina, 2014).

Seminifer tübüllerde bulunan bir diğer hücre de Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Yan yana bulunan Sertoli hücreleri hücrenin alt yan yüzlerinde (bazolateral) engelleyici sıkı ilişkiler ile birbirlerine bağlanarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Sertoli hücreleri ‘sıkı bağlantılar (gap junction)’ denilen birleşmelerle bağlanmıştır ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır.

Sertoli hücrelerinin çeşitli işlevleri vardır:

-Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi

-Fagositoz: Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosit edilir ve sindirilir.

-Sekresyon: Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.

-Anti-Müllerian Hormon üretimi: Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar. Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışınlarına maruz kalma gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar ve bu zararlı etkilere karşı spermatogenik seri hücrelerinden daha dirençlidirler. Memelilerde spermatozonların salınımı hücresel Sertoli hücresinin üst sitoplazmasında bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentlerin hareketlerinin bir sonucudur (Ross ve Pawlina, 2014).

Sertoli hücreleri birbirlerine sıra dışı Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantı kompleksi aracılığıyla bağlanırlar. Bu kompleks komşu membranlarda 50'den fazla paralel kaynaşma çizgisi içeren oldukça sıkı bir bağlantı (zonula okludens) ile karakterizedir.

Testisin seminifer tübülleri arasındaki interstisyel doku androjen üretimi açısından önemlidir ve bağ dokusu, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi

makromoleküllerin geçişine mücadele ederler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun ağ, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının birleşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir. Bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Pubertede bir hücre tipi daha belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir çekirdeği ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan ve steroid salgılayan testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondrion ve düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilmektedir.

Leydig hücrelerinin aktiviteleri ve miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında plasentada üretilen gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Bu hormonların varlığı erkek genital organlarının embriyonik farklılaşması için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4. ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan Lüteinizan Hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (Anthony L. Mesher ve ark., 2015).

4.2.Oksidatif Stres

Oksidatif stres temel olarak vücuttaki oksidan ve antioksidan dengenin oksidanlar yönünde bozulmasının sonucu olarak meydana gelmektedir. Canlılar için hayati öneme sahip oksijen metabolizmasının sonucu olarak serbest radikal kaynağı olarak bilinen reaktif oksijen metabolitleri oluşmaktadır (Collodel ve ark., 2011). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir ve antioksidan mekanizmaların kapasitesini aşacak miktarda oluştukları zaman hücre ve dokularda hasara yol açmaktadırlar (Akkuş, 1995).

Artmış serbest radikaller lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücre membranı ve doku bütünlüğünün bozulmasına ve genetik mutasyonlara neden olmaktadır. Serbest radikallere bağlı lipid, protein ve DNA hasarları kanser, ateroskleroz, alerji, diyabet nörodejeneratif hastalıklar gibi klinik durumların gelişmesinde rol oynamaktadır (Sinclair ve ark., 1990; Valko ve ark., 2006; Ribeiro ve ark., 2014)

Bunun yanı sıra reaktif oksijen metabolitleri düşük konsantrasyonda enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı savunmada rol oynamaları ve mitotik yolaktaki enzimlerin aktivasyonunda yer almaları gibi biyolojik olarak yararlı birçok etkiye sahiptir (Valko ve ark., 2007).

Serbest oksijen radikallerini oluşturan kaynaklar endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılabilir:

Endojen olarak fagositlerin ürettiği H_2O_2 , O_2 , OH , $HOCl$, NO gibi reaktif oksidan ürünler veya fizyolojik olarak serbest oksijen radikallerinin temel kaynağı olan mitokondriyal elektron transport sistemi gibi vücutta endojen olarak normal metabolik aktiviteler sonucunda meydana gelirler (Mccord, 1993).

Eksojen olarak ise hava kirliliği, sigara dumanı, antineoplastik ilaçlar, radyasyon, alkol, stres, bazı kimyasallar (pestisitler, anestezikler, asbest) gibi etkenler sıralanabilir.

Endojen veya eksojen olarak oluşan serbest radikalleri dengeleyebilmek için vücutta antioksidan savunma sistemi devreye girmektedir. Antioksidan savunma sistemleri etkilerini 4 şekilde gösterir:

a) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini daha zayıf bir moleküle çevirme ya da tutma etkisi.

b) Tamir edici etki: Bu etki ile okside proteinler proteolitik enzimler tarafından, membran lipidleri ise lipazlar, açıl transferazlar ve peroksidazlar tarafından ortadan kaldırırlar.

c) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek inaktif hale getirme veya etkisini azaltma.

d) Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak reaksiyon zincirini kırarlar.

Oluşmuş serbest radikalleri tutma ya da çok daha zayıf olan yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki”, serbest radikallerle etkileşip onlara bir H⁺ aktararak etkilerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemine “baskılayıcı etki”, serbest radikalleri kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kıran etkiye “zincir kırıcı etki” ve diğer bir antioksidan savunma sistemi olan tamir işlemine de “onarıcı etki” denmektedir (Akkuş, 1995).

4.3. Sisplatin

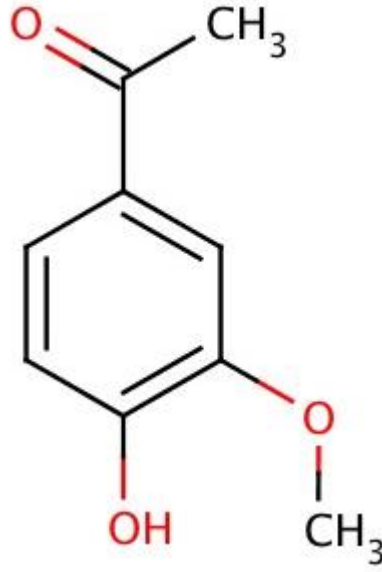
SİS moleküler ağırlığı 300.045 dalton olan ve merkezdeki iki değerlikli platin atomuna bağlı iki amonyum ve iki klor bağı içeren bir kimyasal ajandır. Bileşik, *cis* ve *trans* olmak üzere iki izomere sahiptir. Bunlardan sadece *cis* izomeri sitotoksiktir. SİS, platin bazlı ilaçlar grubunda geliştirilmiş ilk ilaçtır. Bu gruptaki diğer ilaçlar arasında karboplatin ve okzalipatin sayılabilir (Kelland, 2007).

SİS, DNA çift zincirinde zincir içi ve zincirler arası çapraz kovalent bağlar oluşturarak DNA sentezini engellemektedir. Guanin bazının, oldukça reaktif olan 7. azot atomu ile kolayca tepkimeye girer. SİS, en sık aynı DNA zincirindeki komşu guaninler arasında çapraz bağ oluştururken; ikinci sıklıkta, guanin-adenin çapraz bağları oluşturur. Zincirler arası çapraz bağ oluşturması daha nadir görülmektedir. SİS’in DNA ile kovalent bağlar oluşturması sonucu hücre siklusunda duraklama ve apoptoz meydana gelmektedir (Sueishi K ve ark., 2002; Kayaalp, 1994).

SİS yaygın kullanılan bir kemoterapötiktir, ancak birçok sistem üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Nefrotoksisite ve ototoksisite doz sınırlayıcı iken nörotoksisite, kardiyotoksisite, miyelosupresyon ve gonadotoksisite gibi yan etkileri de klinik olarak önemlidir. SİS metabolizması sırasında oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin doku harabiyetine neden olduğu düşünülmektedir (Şener ve ark., 2000; Rahman ve ark., 2006). SİS toksisitesinde mekanizma tam olarak anlaşılmış değildir ancak hipoksi, serbest radikaller, inflamasyon ve apoptoz gibi çeşitli mekanizmaların dahil olduğu düşünülmektedir. SİS'in sperm toksisitesi, DNA hasarı ve kromatin anomalileri üzerine etki ettiği, süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri ve oksidatif stres nedeniyle lipid peroksidasyonunun oluşumuyla serbest radikallerin aşırı üretimine neden olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Yuluğ E ve ark., 2013; Rezfandar ve ark., 2013; Salem ve ark., 2012).

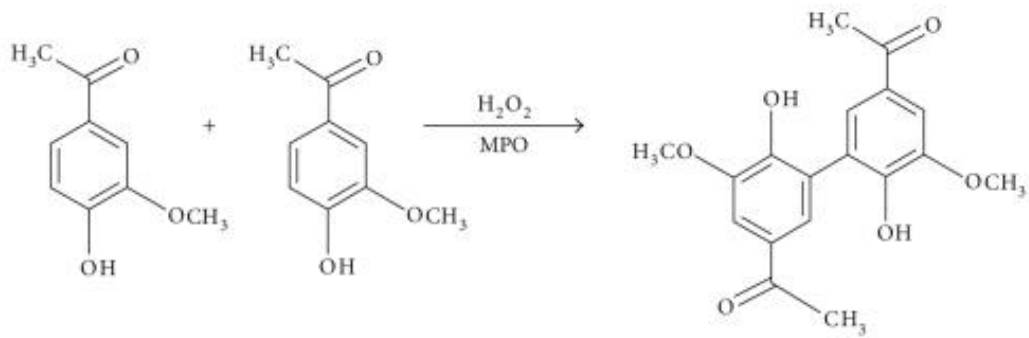
4.4. Aposinin

Aposinin (APO, 4-hidroksi-3metoksi-asetofenon) ilk defa 1883'de Schmiedeberg tarafından tarif edilmiş ve doğal yolla metoksi ile yer değiştirmiş katekol meydana getiren Apocynum Cannabinum (Canadian hemp) bitkisinin köklerinden izole edilmiştir. Daha sonra, Hindistan, Nepal, Tibet ve Pakistan dağlarında yetişen bir bitki olan, Picrorhiza kurroa (Scrophulariaceae) kökünden de 1971 yılında APO elde edilmiştir. Elde edilen ekstratlar ödem ve kalp sorunları için resmi ilaç olarak kullanılmıştır. APO, 166,17 molekül ağırlığına sahip bir asetofenondur. Hafif bir vanilya kokusuna ve 115 °C'lik bir erime noktasına sahiptir. (Luchtefeld ve ark., 2008; Hougee ve ark., 2006) (Şekil 4).



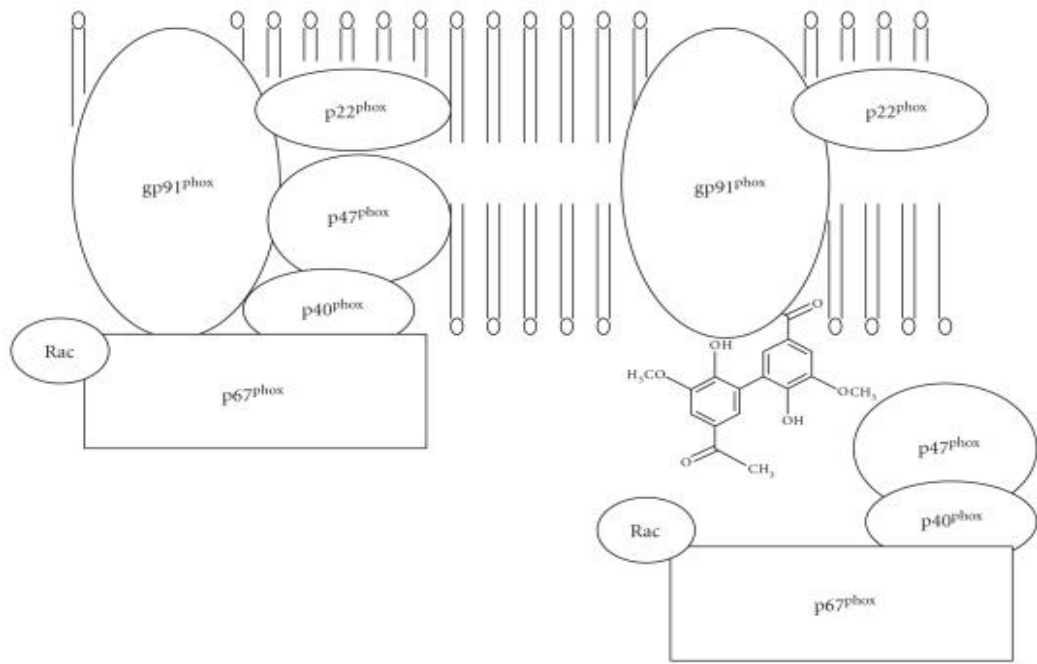
Şekil 4: APO (Hougee S ve ark. 2006).

Apocynum cannabinum köklerinden ekstakte edilen APO fagositik ve fagositik olmayan hücreler dahil pek çok deneysel modellerde iyi bilinen bir NOX inhibitörüdür (Lafeber ve ark., 1999; ‘t Hart ve ark., 2014). Ancak inhibisyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. NOX kompleksinin sitosolik bileşeni, p47phox’un hücre zarında translokasyon bozukluğunu kapsar (Barbieri ve ark., 2004; Peters ve ark., 2001). Bu mekanizma ile ilgili önemli bir bulgu da dimer peroksidaz aracılı oksidasyon ile dönüştürülen bir ilaç olan APO’nun ilk formundan daha etkili olduğudur (Johnson ve ark., 2002) (Şekil 5).



Şekil 5: APO -dimerizasyonu ile aktif APO üretimi (Johnson ve ark., 2002).

NOX oldukça karışık bir yapıya sahiptir. İki tane zar sınırlı elemana (gp91phox ve p22phox), üç sitozolik bileşene (p67phox, p47phox ve p40phox) ve bir düşük molekül ağırlıklı G proteinine (rac 2 veya rac 1) sahiptir (Hougee ve ark., 2006). NOX aktivasyonu sitozolik bileşenlerin hücre membranına göçüyle gerçekleşmektedir (Smit ve ark., 2000; Peters ve ark., 2001). APO, NOX aktivitesi ve aktive edilmiş insan nötrofillerinde ROS üretiminin seçici bir inhibitörüdür (IC50: 10 μ M). Ancak, fagositoz ya da diğer hücre içi öldürme mekanizmalarını etkilemez (Stolk ve ark., 1994; Johnson ve ark., 2002) (Şekil 6).



Şekil 6: APO NOX inhibisyon mekanizması (J. Stefanska ve ark., 2008).

APO'nun in vitro anti-inflamatuar etkileri şunlardır:

- Nötrofil oksidatif patlama kapasitesinin azaltılması (Simons ark., 1990)
- Nötrofil-aracılı oksidatif hasar (Simons ark., 1990)
- Azalmış polimorfonükleer granülosit kemotaksisi (Müller ve ark., 1999)
- Peroksinitrit engellenmesi (Muijsers ve ark., 2000)
- Enflamasyon aracılı kıkırdak tahribatından inhibisyonu (Lafeber Ve ark., 1999)

Ahmad A. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada diyabetik sıçanlarda APO'nun nefropati üzerinde koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Ahmad, 2012).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (26.11.2014-84..2014.mar). Çalışmada genç erişkin Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar uygun kafesler içinde en fazla 4 hayvan olacak şekilde, 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutulmuştur. Deney hayvanları standart sıçan yemi ile beslenmişler ve musluk suyu içmişlerdir.

5.2. Deney Grupları

Kontrol Grubu (n=6): Aynı laboratuvar koşullarında tutulmuş ve DMSO verilmiştir.

Aposinin Grubu (n=6): Sıçanlara 5 gün boyunca eter anestezisi altında oral olarak gavaj ile 25 mg/kg DMSO içinde çözülmüş APO uygulanmıştır.

Sisplatin Grubu (n=8): Sıçanlara 7mg/kg SİS i.p. olarak uygulanmasının ardından 5 gün boyunca DMSO verilmiştir.

Sisplatin+Aposinin Grubu (n=8): Sıçanlara 7 mg/kg SİS i.p. olarak uygulanmasının ardından 5 gün boyunca eter anestezisi altında oral olarak gavaj ile 25 mg/kg DMSO içinde çözülmüş APO uygulanmıştır.

5.3.Sperm sayımı

Tüm gruplardaki sıçanların sol epididimis örnekleri diseke edildikten sonra Hepes eklenmiş Earle's Balanced Salts Solution içerisine alınmıştır. Epididimis dokularından semen incelemesi yapmak için epididimis küçük parçalara ayrılmıştır. Oluşan doku sıvı karışımı falcon tüplere alındı (5ml) ve çöktürme işlemi yapılmıştır. Beş dakika dokuları çöktürme işleminden sonra sonra üst kısımdaki süpernatant alınmıştır. Daha sonra alınan süpernatant, gradient yöntemi kullanılarak 18 dakika 1800 devir/dakikada santrifuj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kalan 0,5 ml örneğin üzerine 2 ml sperm yıkama medyumu eklenerek 10 dakika 2000 devir/dakikada santrifuj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Elde ettiğimiz pellete 0,3 ml fertilization medyumu eklenmiştir. Makler sayım kamarası üzerine bir damla damlatılmıştır ve 100 karedeki tüm sperm sayılmış ve milyonla çarpılmıştır. Kalan örnekler semen yayma yöntemi kullanılarak ince bir katman olacak şekilde yayılmış ve kurutulmuştur. Hücreleri hem fikse etmek hemde dehidrate etmek için etanol kullanılmıştır. Diff-Quik boyası kullanılarak boyanmıştır. Her preparatta 100 sperm seçilerek baş, boyun ve kuyruk anomalileri incelenmiştir.

5.4. Işık Mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skolama

Tüm gruplardan alınan sağ testislerin yarısı, sağ epididimis örnekleri ışık mikroskopik incelemeler için hazırlanmıştır. Dokular %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edilmiştir. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiştir, 2x10 dakika ksilende tutularak şeffaflaştırılmış, 60°C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklandı. Parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında alınan kesitlere morfolojik değerlendirme ve histopatolojik semikantitatif analiz yapabilmek için Hematoksilin ve Eosin (H&E), bazal membran değerlendirmesi için Periodik Asit Schiff (PAS) ve interstisyel alandaki değişiklikleri göstermek için Masson'un trikrom boyası uygulanmıştır. Sağ epididimisler de aynı şekilde parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında kesitler alınarak morfolojik değerlendirme için Hematoksilin ve Eosin boyası ile boyanmıştır.

Seminifer tübüllerde histolojik hasar skorlaması rastgele seçilen benzer alandaki 50 adet seminifer tübül 20X b y tmde Rex A. Hess (1988)'in çalışmasından modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır (Hess ve ark. 1988; şentürk ve ark. 2011):

1) Normal: Normal spermatogenez ve hücreler arası bağlantı

2) Regresif: Seminifer tübüllerin bir veya birden fazla bozukluk içermesi, hücreler arası bağlantı normal olmakla birlikte gevşek hücresel organizasyon, hücresel dejenerasyon (piknotik çekirdek, granüler eozinofilik sitoplazma, karyolizis).

3) Dejeneratif: Düzensiz yerleşimli ve hücreler arası bağlantısı olmayan az sayıda germ hücreleri ve Sertoli hücreleri.

4) Atrofik: Sadece Sertoli hücreleri, ya nadiren germ hücreleri ve Sertoli hücreleri ya da az sayıda hücresel bağlantıları olmayan germ hücreleri ve Sertoli hücreleri.

5.4. PCNA İmmunohistokimyası

Deney gruplarından alınan sol testislerin yarısı PCNA immunohistokimyası için %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edilmiştir. Pozitif şarılı lamlara alınan 4  m kalınlığında parafin kesitler 1 gece boyunca 37 C'lik etüvde bekletildikten sonra, deparafinize etmek amacıyla ksilende 3x5 dakika tutuldu, %96'luk alkolde 2 kere 10 dakika bekletildikten sonra endojen enzim blokajı yapmak için metanol ile hazırlanmış %3'l k hidrojen peroksitte 20 dakika bekletilmiştir.  nce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için ısıtılmış sitrat tamponda 20 dakika 300 W mikrodalgaya maruz bırakılmıştır. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılan kesitler PBS ile 2 kere 5 dakika yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletilmiştir. Fare anti-PCNA biotinlenmiş sekonder antikorda (kullanıma hazır, Invitrogen PCNA staining kit cat. no.93-1143) 1 saat oda ısısında ve nemli ortamda bekletilmiştir. Kesitler 3 kere 2'şer dakika PBS'te yıkandıktan sonra 10 dakika streptavidin peroksidazda (Invitrogen, kullanıma hazır) 10 dakika bekletilmiştir. Tekrar 3 kez 2'şer dakika PBS ile

yıkandıktan sonra, DAB kromojeninde 5 dakika bekletilerek renk reaksiyonu mikroskopta gözlenmiştir. Distile suda yıkanan kesitlere Mayer Hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır. Musluk suyu ve distile su ile yıkamanın ardından 2 kere 2'şer dakika %96'luk alkolde bekletilen kesitler kurutulduktan sonra entellan ile kapatılmıştır. Proliferasyon indeksi her kesitte 20 seminifer tübül incelenerek ve her bir seminifer tübülde PCNA pozitif hücre sayısı toplam hücre sayısına bölünerek belirlenmiştir.

5.5. TUNEL Yöntemi

Apoptoz tayini için in situ DNA uç işaretleme yöntemi kullanılmıştır ve TUNEL kiti içerisindeki klavuzda yazılı olan işlemler sırasıyla uygulanmıştır (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore). Doku kesitleri, 3x5 dk ksilen, 2x5 dk %100 alkol, 3 dk %95 alkol, 3 dk %70 alkolde bekletilmiş ve 5 dk PBS ile çalkalanmıştır. Proteinlerin sindirilmesi için kesitler Proteinaz K (20µg/ml) ile oda ısısında 15 dk inkübe edildi ve 2x2 dk distile su ile çalkalanmıştır. Endojen peroksidazın maskelenmesi için kesitler PBS ile hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 5 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. PBS ile 2x5 dk yıkanmıştır. Lamaların etrafı dikkatlice kurularak kesitlerin üzerine 15 µl dengeleyici tampon konulup, plastik lameller ile kapatılmış ve 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Plastik lameller kaldırılarak dokunun etrafı kurulanmış ve her lam üzerine 15 µl Tdt enzimi konulmuş ve tekrar plastik lameller ile kapatılmıştır. Nemli ortamda 37 °C etüvde 1 saat inkübe edilmiştir. Plastik lameller kaldırılarak kesitler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dk yıkanmıştır. PBS ile 3x5 dk yıkanmıştır. Her kesit üzerine 13 µl Anti-Digoksin- Peroksidaz konulmuş ve üzerlerine plastik lameller kapatılarak oda ısısında 30 dk inkübe edilmiştir. Kesitler PBS ile 3x5 dk yıkanmıştır. Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra her kesit üzerine 15 µl 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrat solusyonu damlatılmıştır. Boyanma için oda ısısında 5 dk bekletilmiştir. Renk reaksiyonu oluşması gözlemlendikten sonra kesitler distile su ile yıkanmıştır. Kesitler Mayer Hematoksilin ile boyanarak zıt boyaması yapılmış, %96 alkolde 2x2 dk bekletildikten sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruma gerçekleştikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Boyalı kesitlerde 20 seminifer tübül incelenerek, 3 veya

daha fazla TUNEL pozitif hücre içeren seminifer tübüller sayılmıştır. Apoptotik indeks, 3 veya daha fazla TUNEL pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısının toplam seminifer tübül sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur.

5.6. NADPH oksidaz / gp91phox (NOX2) İmmünohistokimya boyama yöntemi

Dokularda NOX2 ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla peroksidaz (HRP) konjuge polimerik immünohistokimya boyama yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntemde; parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamlara 3 µm kalınlığında kesitler alınarak 37° C' de 1 gece deparafinize edilmiştir. Kesitler 3 ayrı ksilende 5'er dakika ve iki ayrı %96 etanolde 10'ar dakika bekletilerek hidrate edilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesi, metanolde hazırlanmış %3 H₂O₂ çözeltisi ile 20 dakika süreyle baskılanmıştır. Maskelenen antijenleri açığa çıkarmak amacıyla, kesitlere mikrodalga fırında 200 W güçte sitrat tampon çözeltisi (pH 6,0) ile 20 dakika ön işlem uygulanmıştır. Oda ısısında soğutulan lamalar iki ayrı fosfat tampon çözeltisinde (PBS) 5'er dakika yıkanmıştır. Nonspesifik boyanmayı engellemek amacıyla dokulara protein blokaj çözeltisi (EXPOSE Rabbit spesifik HRP/DAB detection IHC kit, Abcam, Cambridge, UK) damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Blokajın ardından kesitlere 1: 100 dilüsyon oranında tavşan anti-NOX2/gp91phox (bs-3889R, Bioss Inc, Massachusetts, USA) antikoru damlatılarak 4-8° C' de 1 gece inkübe edilmiştir. Süre sonunda iki ayrı PBS ile yıkanan kesitlere Keçi anti-tavşan IgG (H+L) ikincil antikoru (DyLight 488 conjugate, 35552, Thermo, Massachusetts, USA) uygulanmış ve 60 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan kesitlere nükleus boyaması için 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) eklenmiştir ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir. NOX2 pozitif hücre oranı, her kesitte 20 seminifer tübül incelenerek, 3 veya daha fazla NOX2 pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısının toplam seminifer tübül sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur.

Semen yayma yapılmış preparatlar ve boyalı kesitler fluorensan eklentili Olympus BX51 mikroskobu (Tokyo, Japonya) ile görüntülenmiş ve Olympus DP72 kamera (Tokyo, Japonya) ile fotoğraflanmıştır.

5.6.Geçirimli Elektron Mikroskobu Preparasyonu

Sol testislerin yarısından alınan doku örnekleri 1 mm³ boyutunda parçalar haline getirildikten sonra %2,5'luk 0,1 M PBS tamponlu (pH 7,2) glutaraldehit fiksatifi içerisine konarak +4°C'de 12 saat fikse edilmiştir. Dokular PBS'e alınmıştır. Daha sonra %2'lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyonu yapılmıştır. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra propilen oksitten geçirilmiş ve epona gömülmüştür. Epona gömülen doku örnekleri polimerizasyon için 60°C'deki etüvde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Ultramikrotomda (Leica Ultracut R) alınan yaklaşık 1 µm kalınlığındaki yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanmıştır. Yarı ince kesitler ile ilgilenilen bölge tespit edildikten sonra 60 nm kalınlığındaki ince kesitler bakır gridler üzerine alınmış ve uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır. İnce kesitler, JEOL 1200 SX II TEM ile 80kV'de incelenmiş ve dijital kamera (Morada Soft Imaging System, Olympus, USA) ile fotoğraflanmıştır.

5.7. Oksidatif Stres Analizi

5.7.1. Malondialdehit (MDA) Tayini

Dokuda MDA tayini, Beuge yöntemine göre yapılmıştır (Beuge ve Aust, 1978). MDA tayininde GSH tayini için hazırlanan % 10'luk homojenatlar kullanılmıştır, 1 ml % 0,375 tiyobarbitürik asit (TBA) ile karıştırılıp 15 dakika kaynar su banyosuna bırakılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 10 dakika 3000 devir/dakikada santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 532 nm'de okunmuştur.

5.7.2. Glutatyon (GSH) Tayini

Dokuda GSH tayini Ellman yöntemine göre yapılmıştır (Beutler, 1975). Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan testisler serum fizyolojik ile yıkandıktan

sonra filtre kâğıdı ile kurutulmuş ve tartılmıştır. Homojenizatörde (Ika Werk) buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle %10'luk homojenatı hazırlanmıştır, 0,4 mL % 10'luk homojenata 0,2 mL %20'lik Trikloroasetik asit (TCA) eklenerek karıştırılmıştır, 15 dakika 3000 devir/dakikada santrifüj edilmiştir. Üst fazda GSH çalışılmış, çökelti atılmış, 1 ml 0,3 M Na₂HPO₄ + 0,05 ml Ellman çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış, 5 dakika bekletilmiş ve oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 412 nm'de okunmuştur.

5.7.3. Myeloperoksidaz (MPO) Tayini

Dokuda MPO tayini Hillegass yöntemi ile yapılmıştır (Hillegass ve ark., 1990). Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan testis dokuları kan ve çevre artıklarından temizlenmesi için serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kâğıdı ile kurutulmuştur ve tartılmıştır. Testis dokusu 50 mM K₂HPO₄ (pH:6) ile homojenize edilmiş, % 10'luk homojenat hazırlanmış, 3 mL %10'luk doku homojenatı 41400 g de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldı, çökeltiye 3 mL %0,5'lik hegzadesiltrimetil-amonyum bromid (HETAB) eklenerek homojenizasyonu yapıldı, 3 kez donduruldu – çözündürüldü – sonike edildi, 41400 g de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi, 0,3 mL üst faz ile çalışılmıştır. Bu aşamadan sonraki işlemler 37 °C'lik su banyosunda yapılmıştır. 0,2 mL % 2'lik sodyum azid ile renk reaksiyonu durdurulmuştur. 37°C lik su banyosundan alınmıştır ve karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında bekletilmiştir, 3000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 460 nm'de okunmuştur.

5.7.4. Süperoksitdismutaz (SOD) Tayini

Dokuda SOD aktivitesi tayini, daha önce tarif edilen yöntemle göre ölçülmüştür (Myroie ve ark., 1986). Kısaca, ölçümler 0,1 mM EDTA'lı 2,8 mL 50 mM potasyum

fosfat (pH 7,8), 0,1 mM 0,39 mM riboflavinli 10mM potasyum fosfat (pH 7,5) deiyonize su içinde 0,1ml 6 mM o-dianisidin·2HCl ve doku ekstraktı içeren küvetlerde gerçekleştirildi (50, 100µl). Tüm bileşenleri içeren küvetler 5cm yukarıya yerleştirilmiş olan 20-W Sylvania Grow Lux floresan ile aydınlatılmıştır ve 37°C'de muhafaza edilmiştir. Absorbanslar Shimadzu UV-02 model spektrofotometreyle 460 nm'de okunmuştur. Standart eğri, sıgır SOD (Sigma–Aldrich; S-2515-3000 U) referansı ile rutin olarak hazırlanmıştır. Absorbans okumaları 0 ve 8 dakika sonra alınmıştır ve net absorbans hesaplanmıştır.

5.7.5. 8-hidroksi-2'-deooksiguanosin (8-OHdG) Tayini

Dokuda 8-OHdG tayini yapmak için, doku örnekleri toplanmıştır ve dokulardaki genomik DNA imalatçı firmanın protokolüne uygun olarak ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanarak (Invitrogen, ABD) yapılmıştır ve -80°C'de saklanmıştır. Doku 8-OHdG seviyesinin ölçümü üretici firmanın belirttiği şekilde OxiSelect™ Oksidatif DNA Hasarı ELISA kiti (Celi Biolabs, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

8. İstatistiksel Analiz

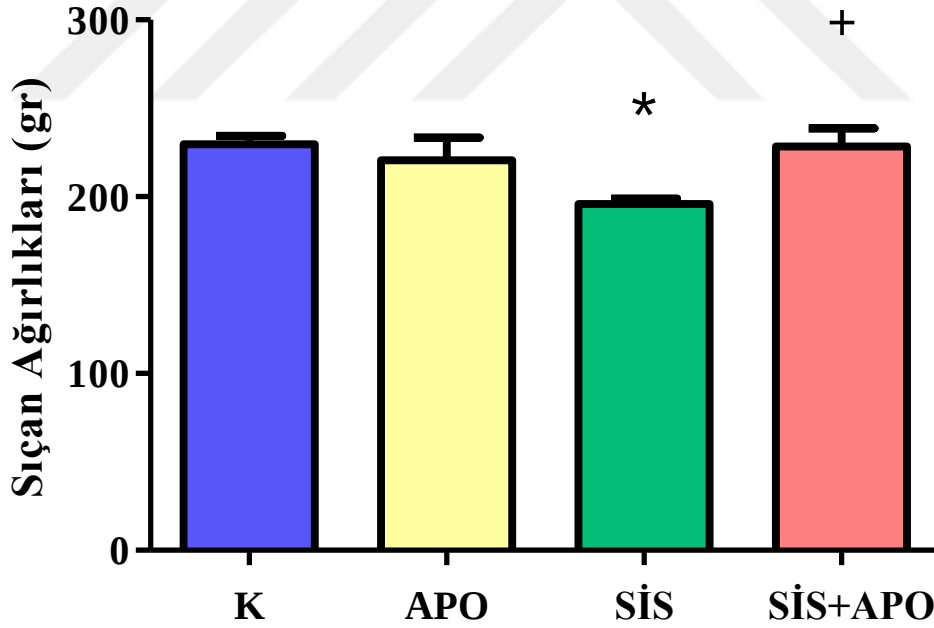
İstatistiksel analiz yapmak için Graph-Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey testi kullanılmıştır. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6.BULGULAR

6.1.Sıçan Ağırlığı

Kontrol grubunda sıçan ağırlığı $229,6 \pm 11,30$ gr iken APO grubunda $220,5 \pm 31,82$ gr, SİS grubunda $195,8 \pm 8,21$ gr ve SİS+APO grubunda $228,2 \pm 29,15$ gr'dır.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda sıçan ağırlığında anlamlı bir düşüş ($p<0.05$), SİS+APO grubunda ($p<0.05$) ise SİS grubuna göre sıçan ağırlığında anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 7).

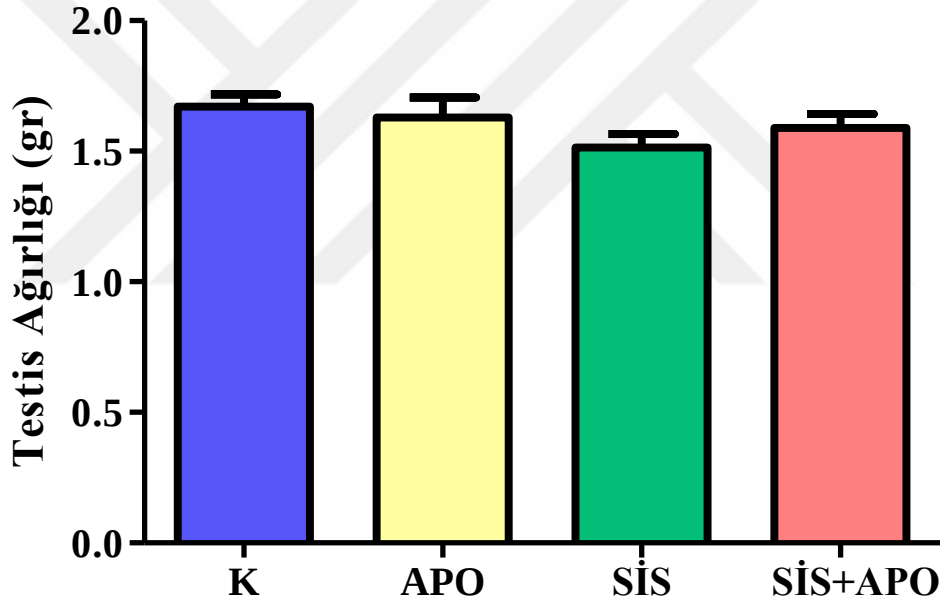


Şekil 7: Deney gruplarının sıçan ağırlıkları grafiği. *: $p<0.05$ kontrol (K) grubu ile kıyaslandığında.
+ : $p<0.05$ SİS grubu ile kıyaslandığında.

6.2. Testis Ağırlığı

Kontrol grubunda testis ağırlığı $1,67 \pm 0,11$ gr iken APO grubunda $1,63 \pm 0,18$ gr, SİS grubunda $1,51 \pm 0,14$ gr ve SİS+APO $1,58 \pm 0,15$ gr'dır.

Kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında testis ağırlığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 8).



Şekil 8: Deney gruplarının sıçan ağırlıkları grafiği. Deney grupları arasında testis ağırlığında istatistiksel fark yoktur.

6.3. Semen Analizi Sonuçları

Morfolojik değerlendirme Diff-Quik ile boyama sonrası yapılmıştır. Kontrol ve APO grubu spermalarında normal morfolojide spermaların yanı sıra az sayıda baş, boyun ve kuyruk hasarı olan spermiler gözlenmiştir (Resim 1 A, B).

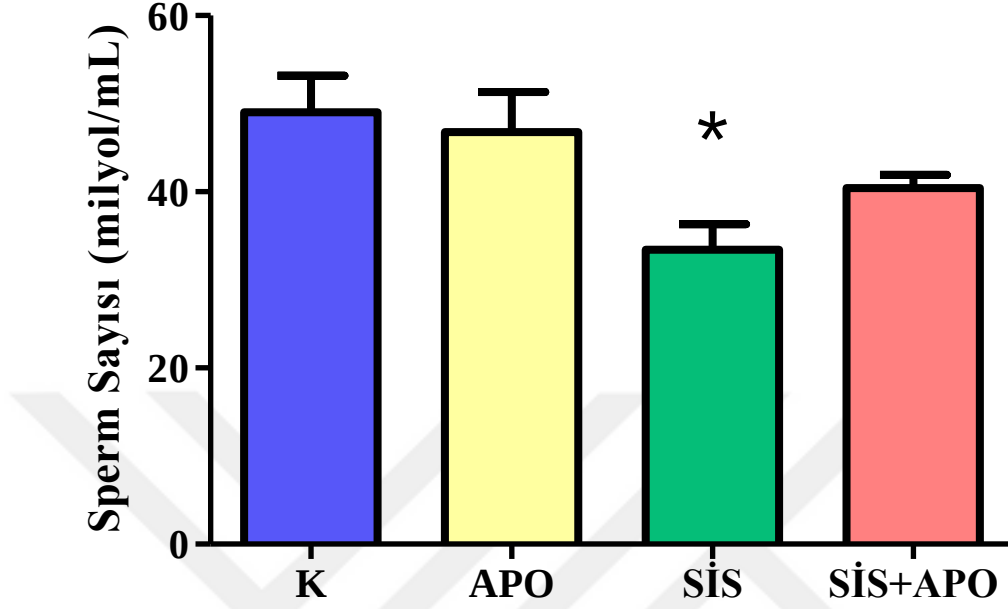
SİS grubu spermelerde normal morfolojiye sahip spermilerin sayısında önemli ölçüde azalma gözlenirken, baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip sperm sayısında da anlamlı olmamakla beraber artış gözlenmiştir (Resim 2 A). Ayrıca SİS grubu sıçanların sperm sayısında da kontrol grubu sıçanlara göre anlamlı bir düşüş görülmüştür (Şekil 9).

SİS+APO grubu spermelerde ise normal morfolojiye sahip spermilerin sayısında anlamlı olmamakla beraber SİS grubuna kıyasla artış gözlenirken, baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip spermiler de gözlenmiştir (Resim 2 B).

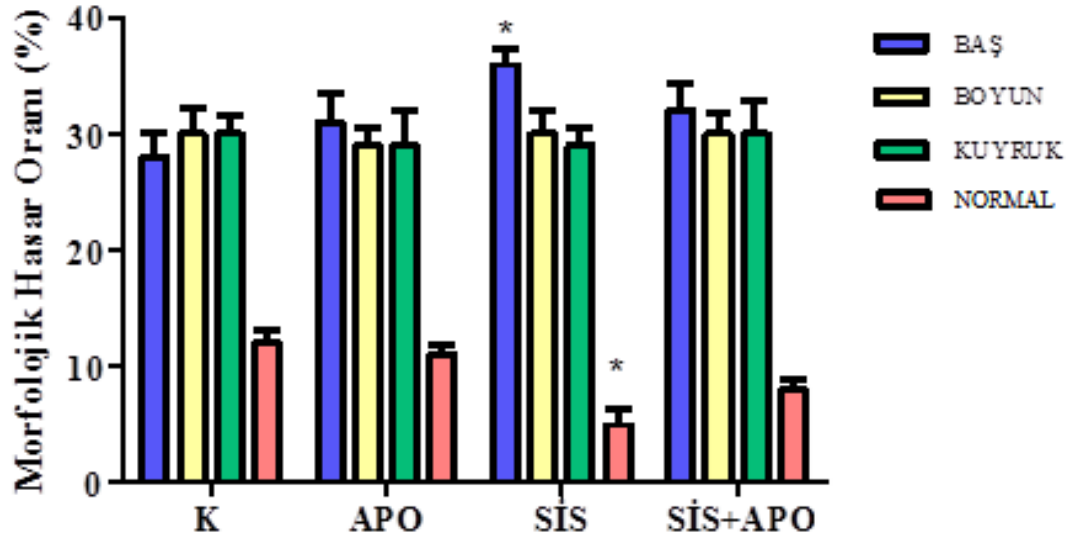
Kontrol grubunda sperm sayısı $49.10^6 \pm 9,38.10^6$ milyon/mL iken APO grubunda $46,8.10^6 \pm 10,1.10^6$ milyon/mL, SİS grubunda $33,4.10^6 \pm 6,54.10^6$ milyon/mL ve SİS+APO $40,4.10^6 \pm 3,43.10^6$ milyon/mL'dir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda sperm sayısında anlamlı bir düşüş ($p<0.05$) gözlenmiştir (Şekil 9).

Kontrol grubunda normal morfolojiye sahip $\%12 \pm 2,23$ sperm var iken APO grubunda $\%11 \pm 1,81$, SİS grubunda $\%5 \pm 1,12$ ve SİS+APO grubunda ise $\%8 \pm 0,98$ sperm görülmüştür. Kontrol grubunda baş anomalili $\%28 \pm 5,74$ sperm var iken APO grubunda $\%31 \pm 4,63$, SİS grubunda $\%36 \pm 3,80$ ve SİS+APO grubunda ise $\%32 \pm 2,54$ sperm görülmüştür. Kontrol grubunda boyun anomalili $\%30 \pm 5,12$ sperm var iken APO grubunda $\%29 \pm 1,80$, SİS grubunda $\%30 \pm 4,23$ ve SİS+APO grubunda ise $\%30 \pm 3,12$ sperm görülmüştür. Kontrol grubunda kuyruk anomalili $\%30 \pm 3,50$ sperm var iken APO grubunda $\%29 \pm 1,71$, SİS grubunda $\%29 \pm 6,93$ ve SİS+APO grubunda ise $\%30 \pm 3,46$ sperm görülmüştür.

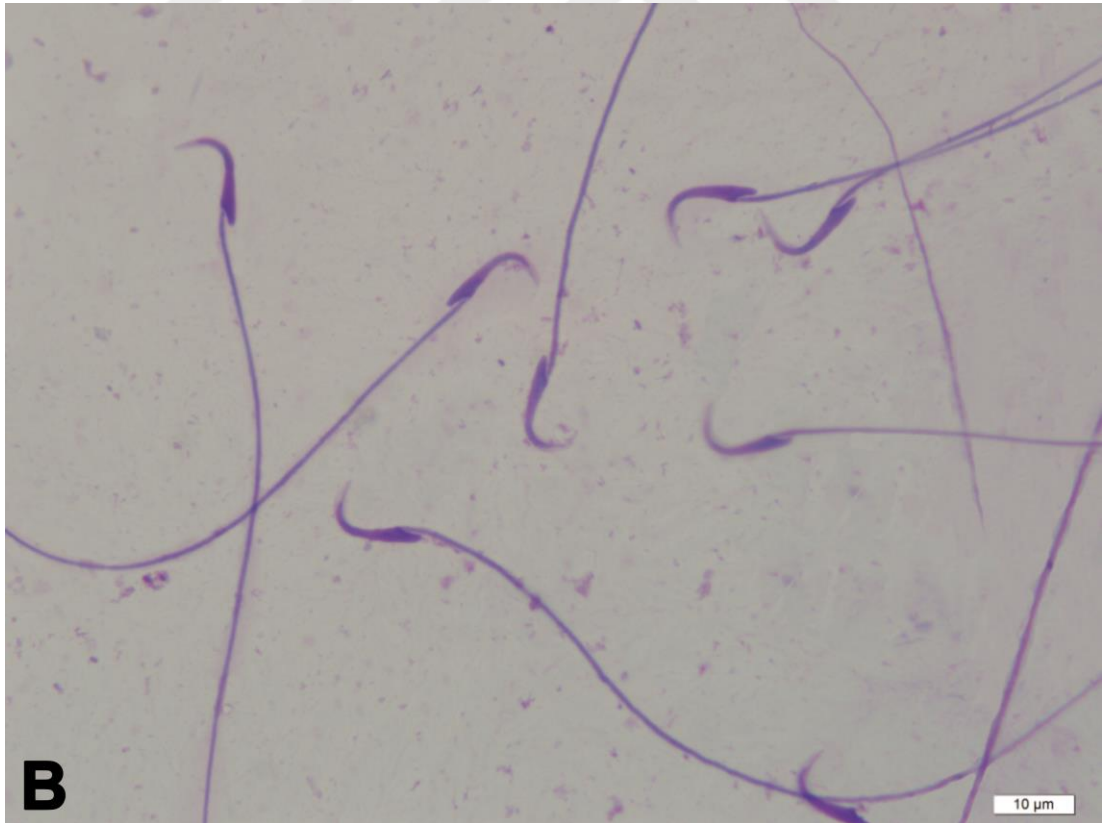
Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda normal morfolojide düşüş ($p<0.05$) ve baş anomalisinde anlamlı artış ($p<0.05$) görülmüştür (Şekil 10).



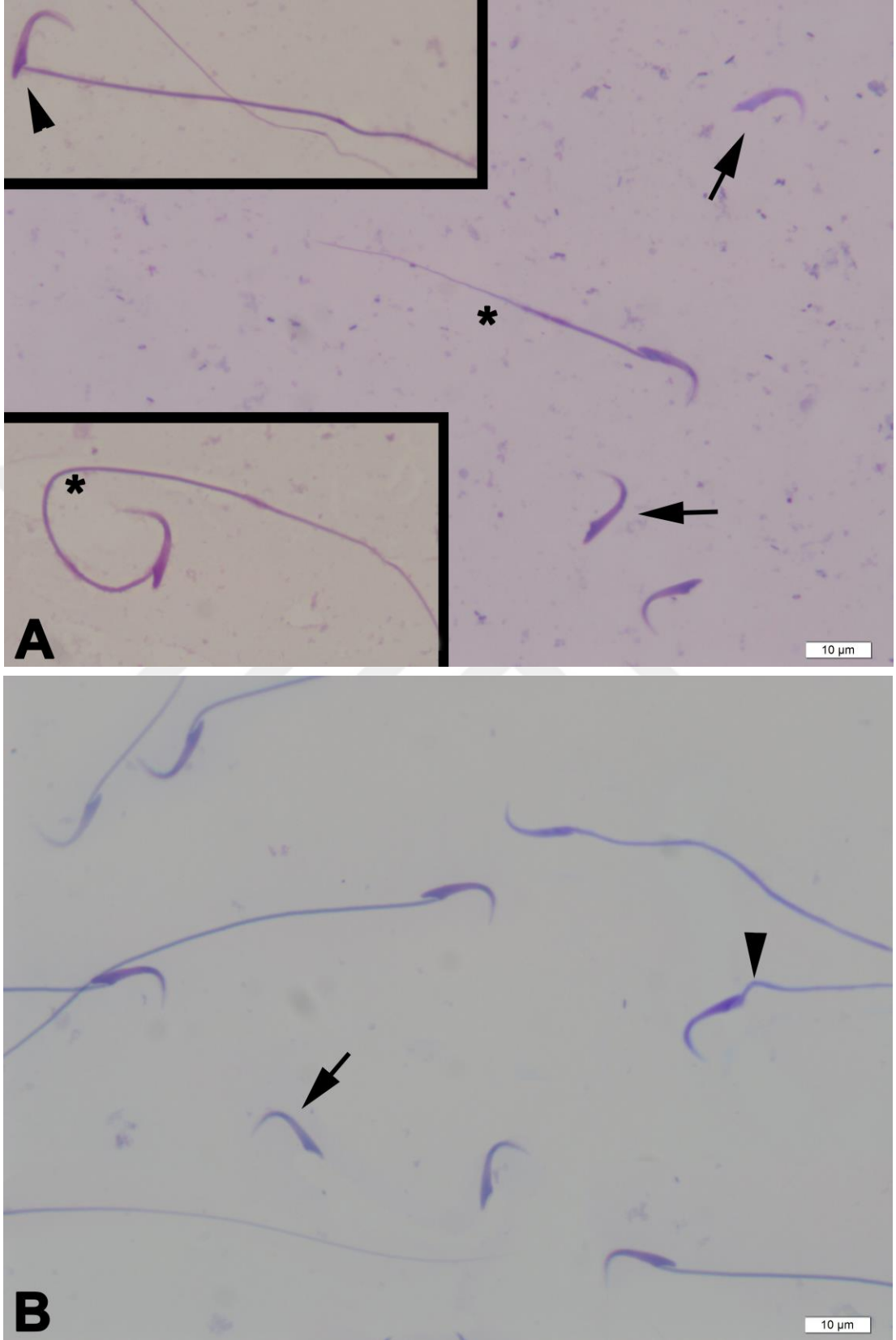
Şekil 9: Deney gruplarının sıçan sperm sayısı grafiği. (*) $p<0.05$ kontrol (K) grubu ile kıyaslandığında.



Şekil 10: Deney gruplarının morfolojik hasar oranı grafiği. (*) $p<0.05$ kontrol (K) grubu ile kıyaslandığında.



Resim 1: Kontrol (A) ve APO (B) grubundaki sıçanlarda normal morfolojide spermatozoalar görülmektedir. Diff-Quick boyası



Resim 2: SİS (A) grubunda baş (→), boyun (►) ve kuyruk (*) anomali olan spermatozoalar görülmektedir. SİS+APO (B) grubunda normal morfolojide spermatozoaların yanısıra baş (→) ve boyun (►) anomali olan spermatozoalar görülmektedir. Diff-Quick boyası

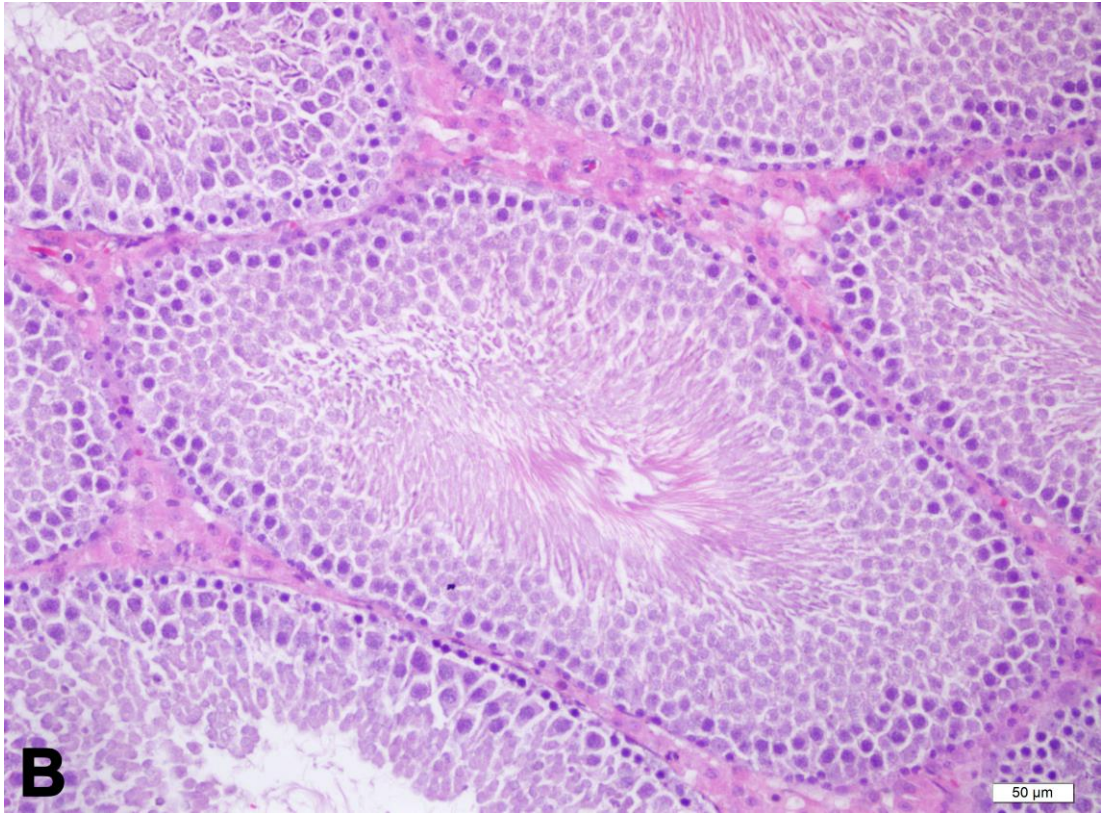
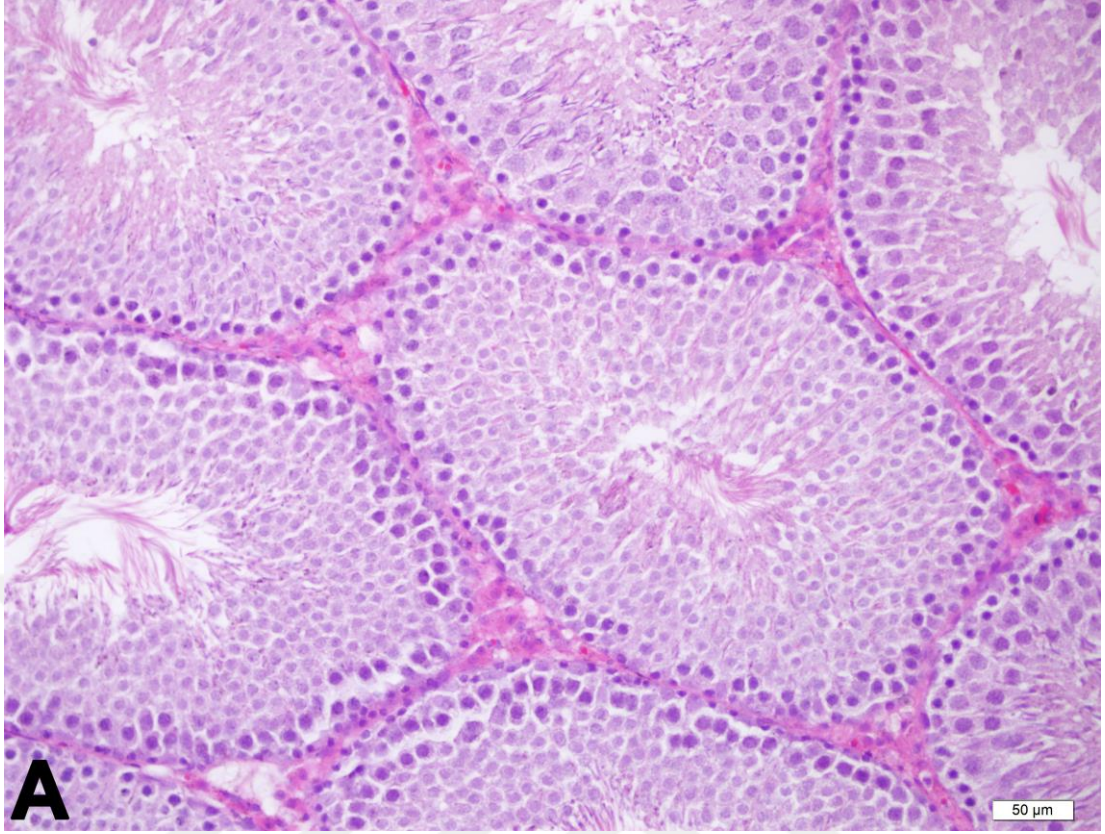
6.4. Morfolojik Bulgular

Işık mikroskopik incelemelerde H&E ile boyalı kesitler ve toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitler incelendiğinde kontrol grubuna ait seminifer tübüllerde normal morfolojik yapı gözlenmiştir. Seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik seriyi oluşturan, bazaldan lümene doğru sırası ile spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatidler gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin çoğunluğunda lümende spermatozoa görülmüştür. Sertoli hücreleri normal görünümündedir. (Resim 3A, Resim 10A). APO grubunda kontrol grubuna benzer şekilde düzenli testis morfolojisi gözlenmiştir (Resim 3B, Resim 10B).

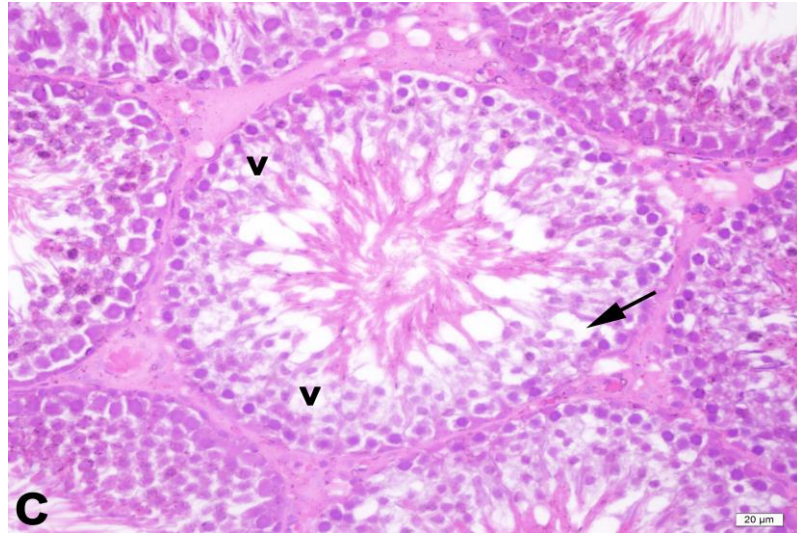
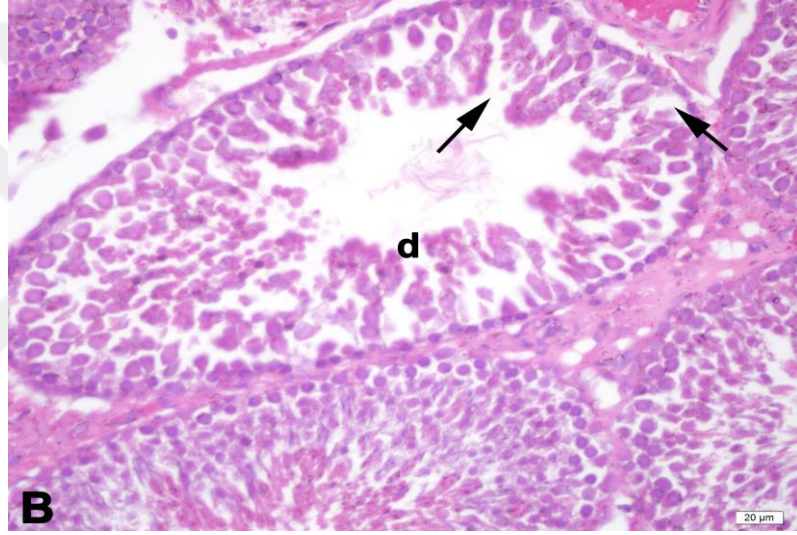
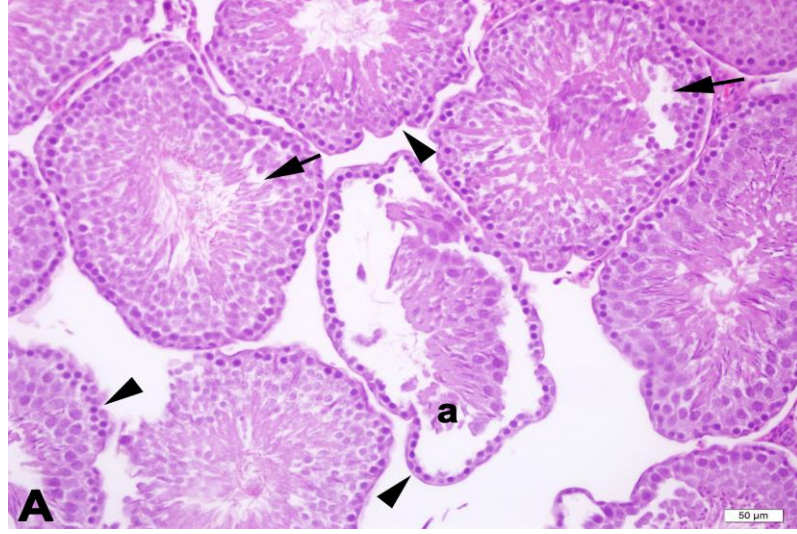
SİS grubunda çok sayıda regresif seminifer tübüllerle beraber çok sayıda dejeneratif seminifer tübül gözlenmiştir. Birçok seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri bulunmakla beraber bazı seminifer tübüllerde ise spermatogenik hücrelerde vakuolizasyon ve spermatogenik seriye ait hücrelerde yer yer açılmalar görülmektedir. Çoğu seminifer tübülün lümeninde döküntü hücrelere rastlanmıştır (Resim 4, Resim 11A).

SİS + APO grubunda çok sayıda normal ve regresif seminifer tübülün yanı sıra az sayıda dejeneratif tübül gözlenmiştir. Bazı tübüllerde hücreler arasındaki alanlarda açılmalar ve vakuoller gözlenmiştir. Bazı tübüllerin lümeninde immatür hücre döküntülerine rastlanmıştır (Resim 5, Resim 11B).

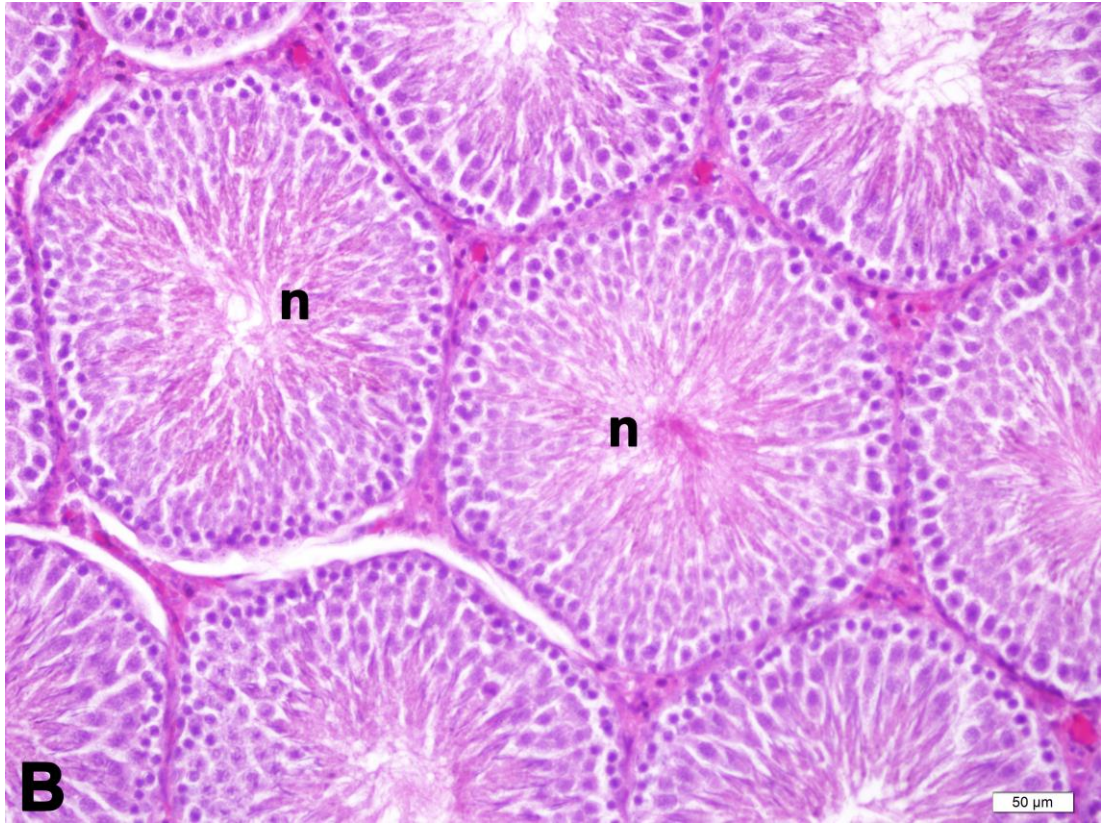
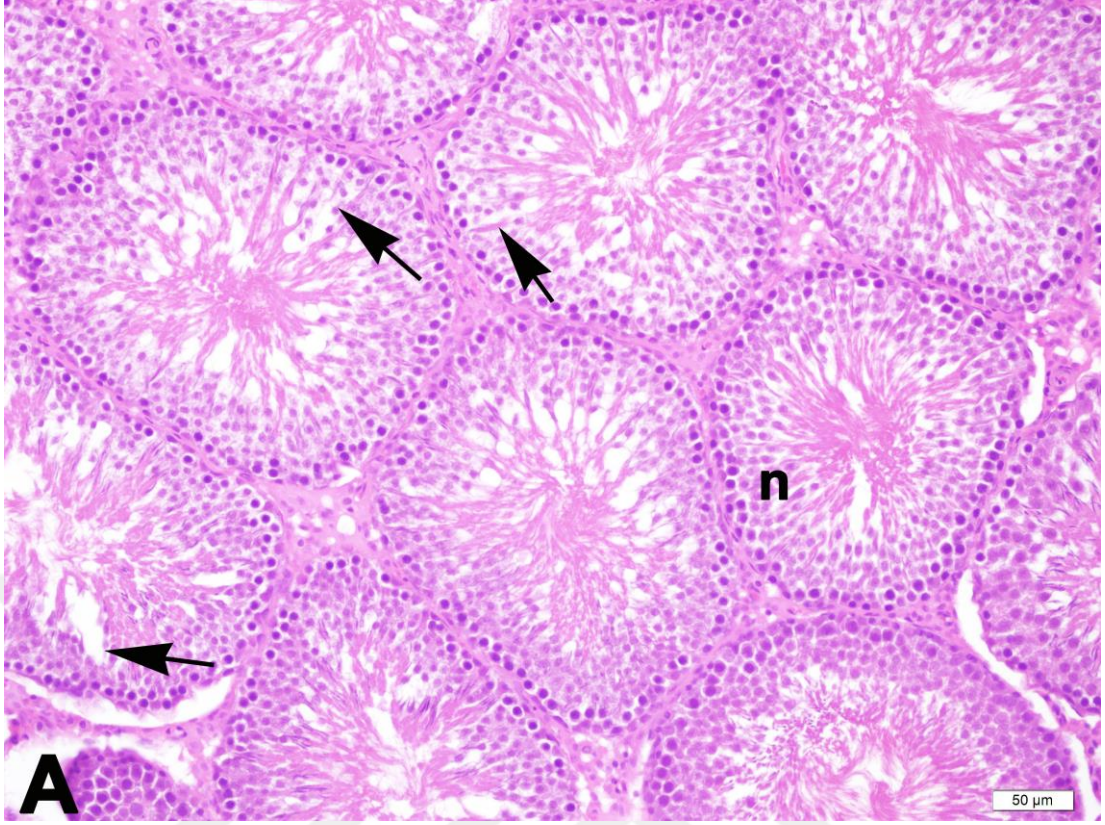
PAS ile boyalı kesitler incelendiğinde kontrol ve APO (Resim 6A, B) gruplarında bazal membran yapılarının ve seminifer tübül kontürlerinin düzenli morfolojide olduğu gözlenmiştir. SİS grubunda bazı tübüllerde seminifer tübül kontürlerinin bozulduğu gözlenmiştir. SİS+APO grubunda bazal membran yapılarının ve seminifer tübül kontürlerinin düzenli morfolojide olduğu gözlenmiştir (Resim 7 A, B).



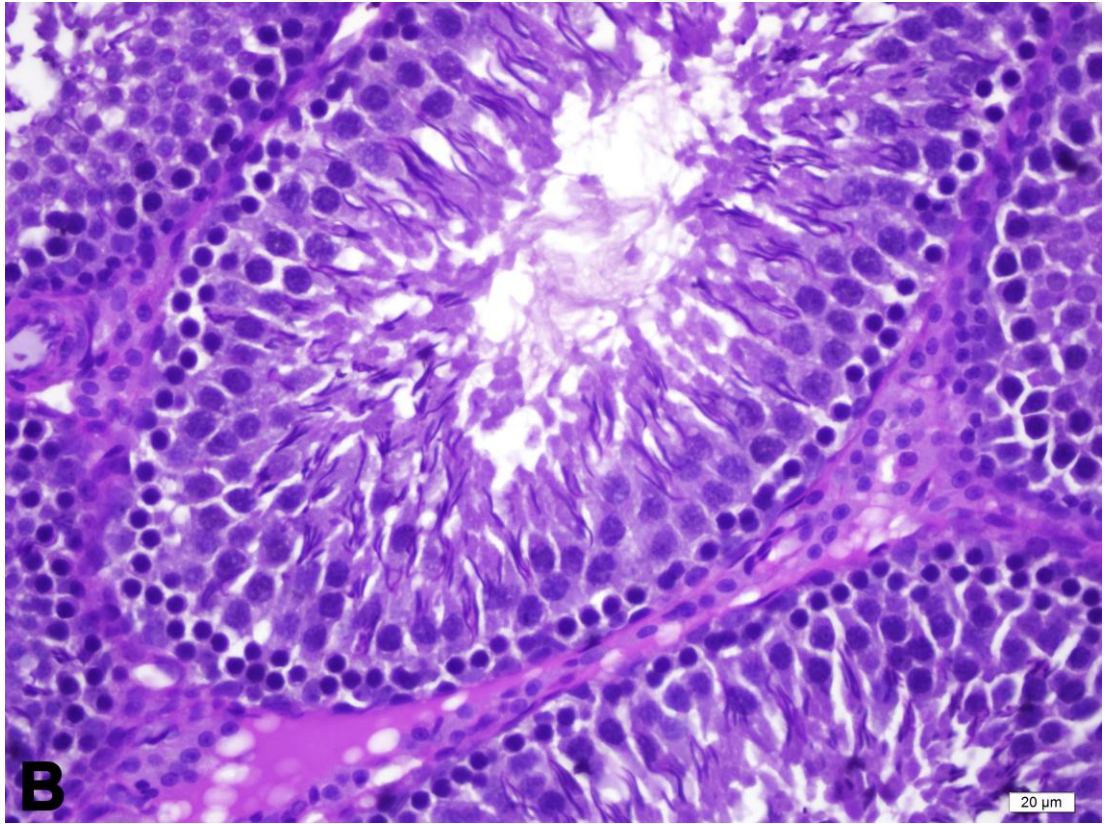
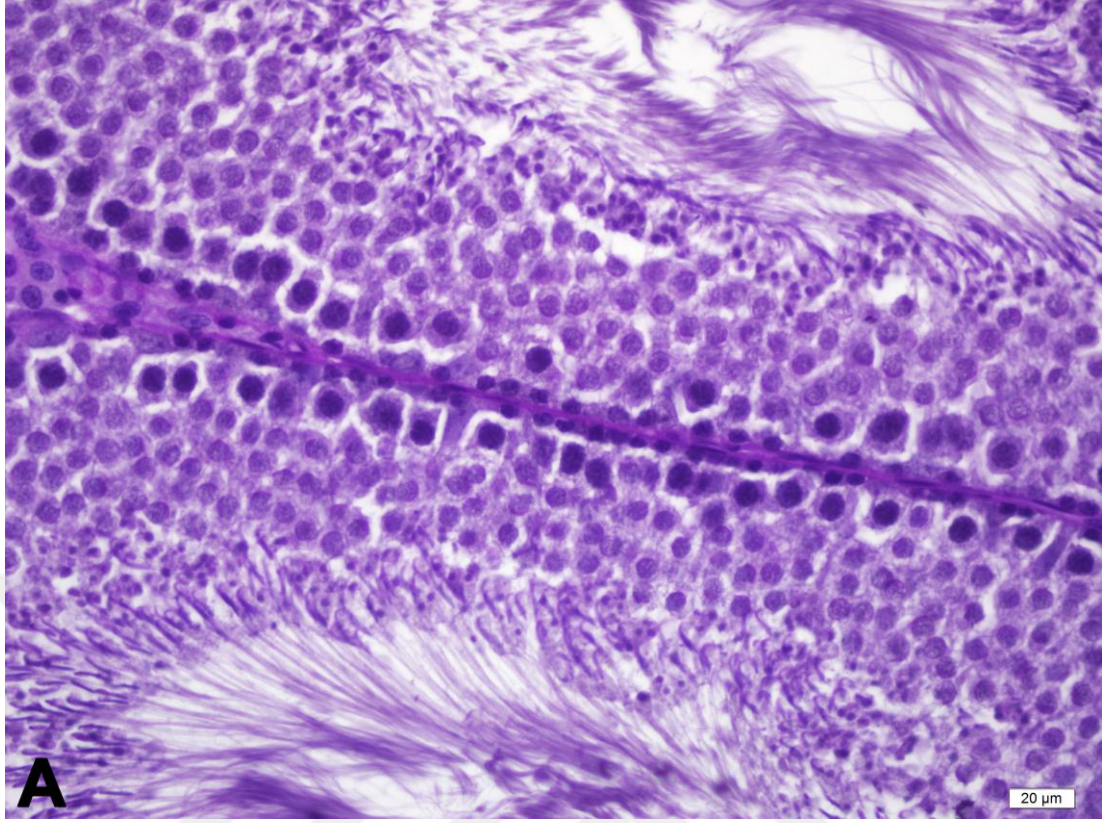
Resim 3: Kontrol (A) ve APO (B) gruplarında, germinal epiteldeki spermatogonyumların, primer spermatositlerin, sekonder spermatositlerin, spermatidlerin, spermatozoanın, Sertoli ve Leydig hücrelerinin ve seminifer tübül kontürlerinin düzenli yapısı görülmektedir. H&E boyası.



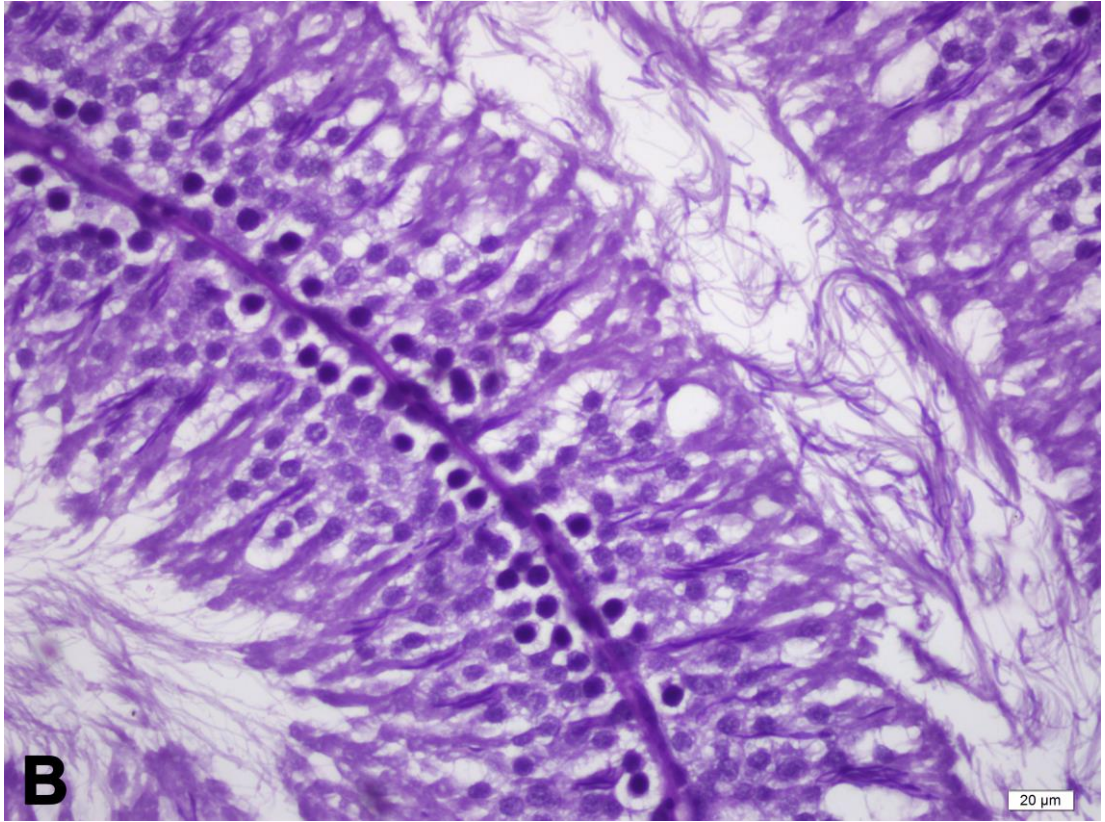
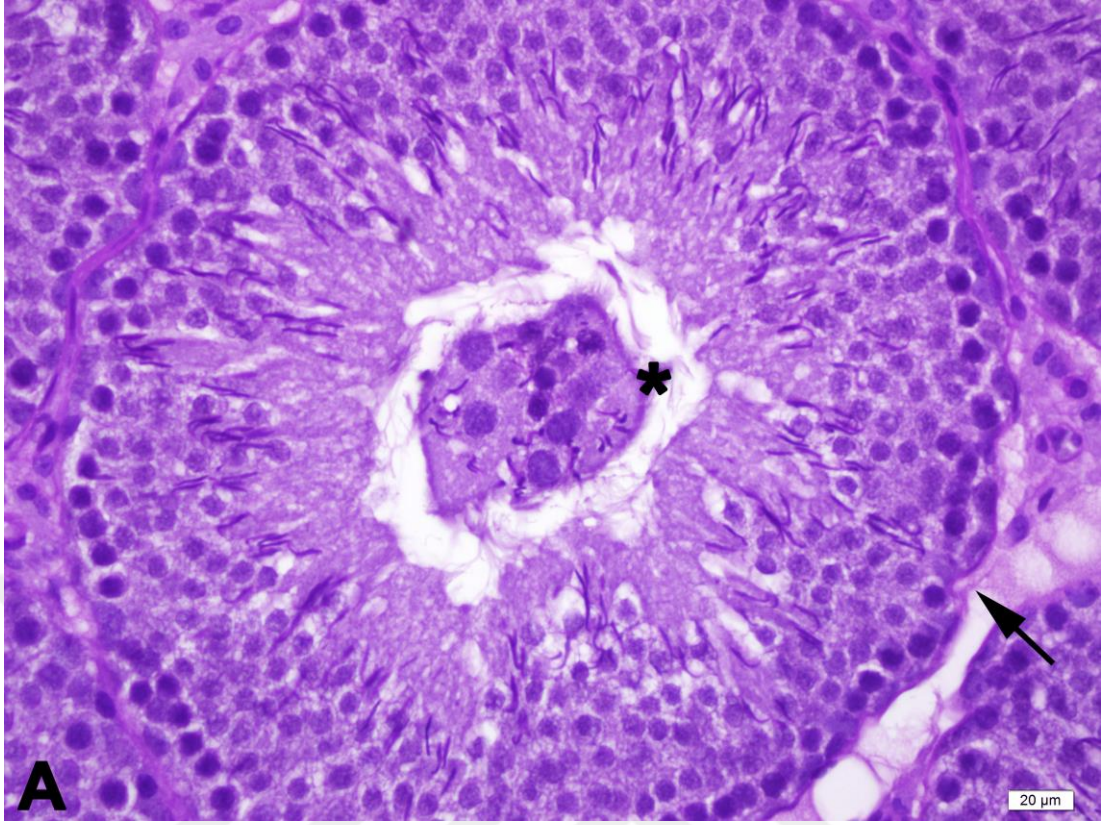
Resim 4 A, B, C: SİS grubunda, seminifer tübüllerin epitelinde yer yer alçalma (→), seminifer tübüllerin epitelinde düzensizlik (►), spermatogenik hücrelerde vakuol (v), dejeneratif (d) ve artrofik (a) seminifer tübülleri görülmektedir. H&E boyası.



Resim 5 A B: SİS+APO grubunda, bazı seminifer tübüllerin epitelinde yer yer açılmalar (→) olmakla birlikte çok sayıda normal (n) morfolojisi olan seminifer tübül yapıları görülmektedir. H&E boyası.



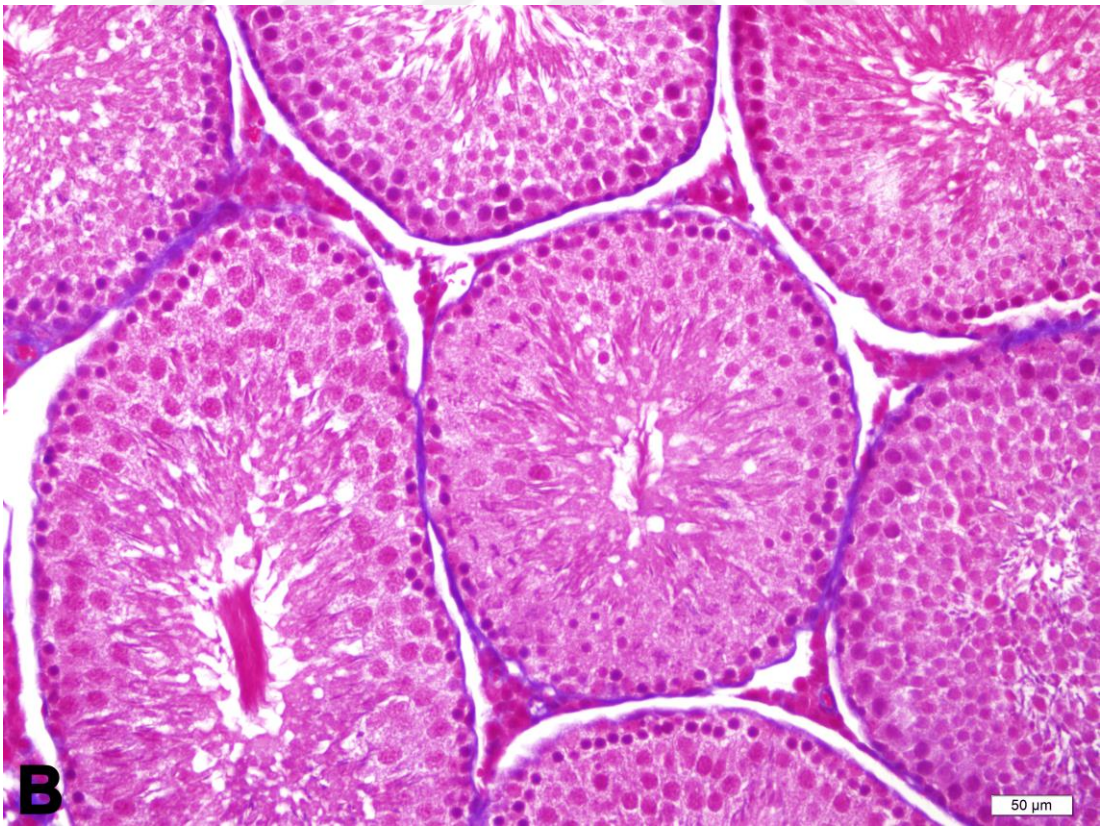
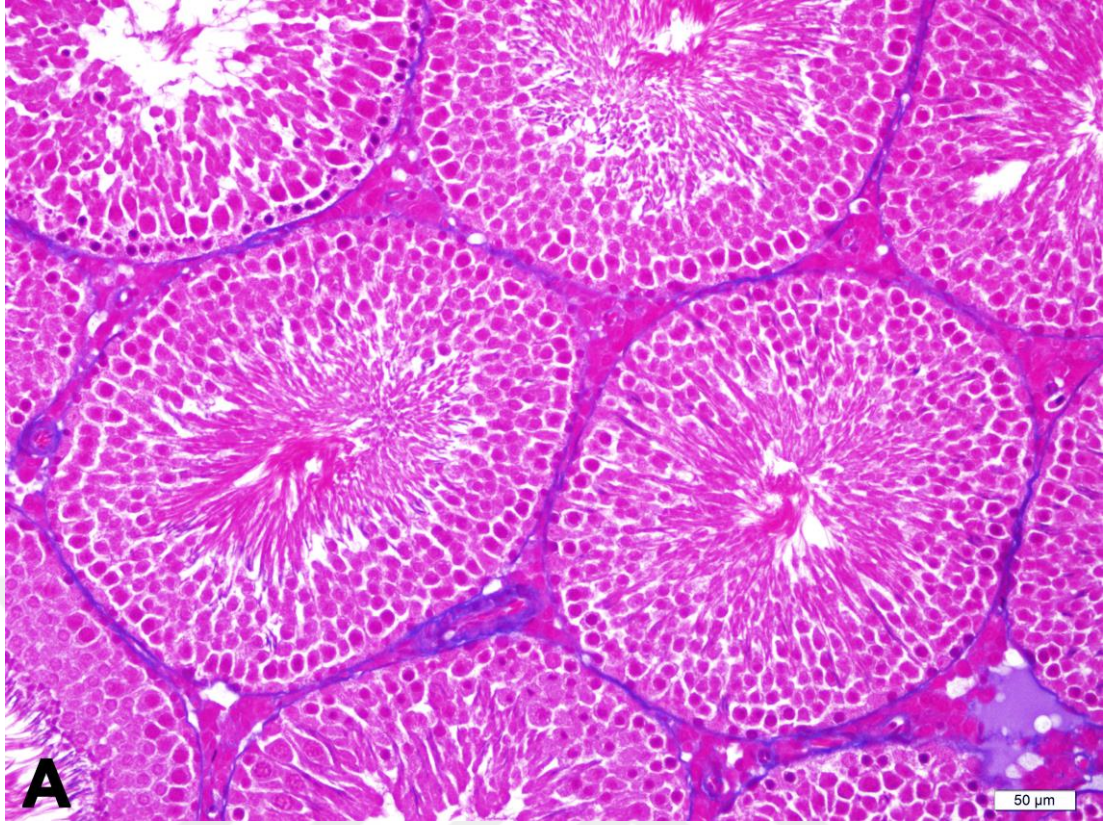
Resim 6 A, B: Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) seminifer tübül bazal membranlarının düzenli yapısı görülmektedir. PAS reaksiyonu.



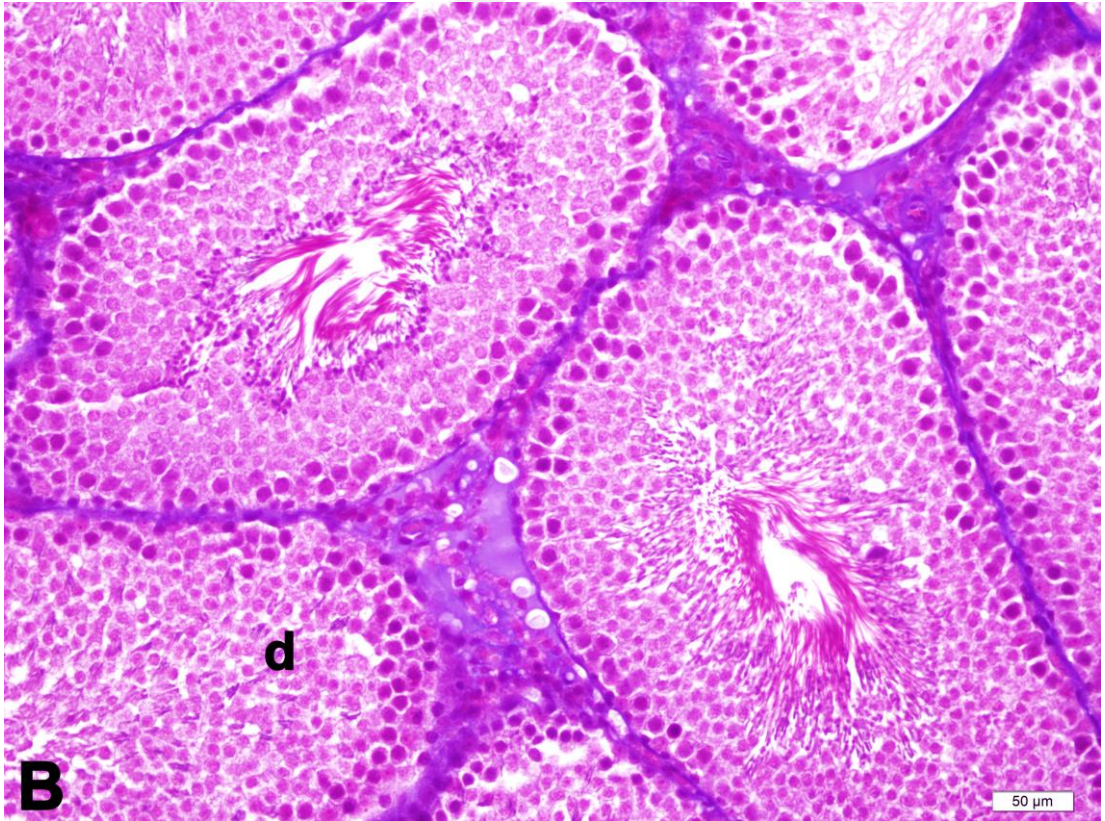
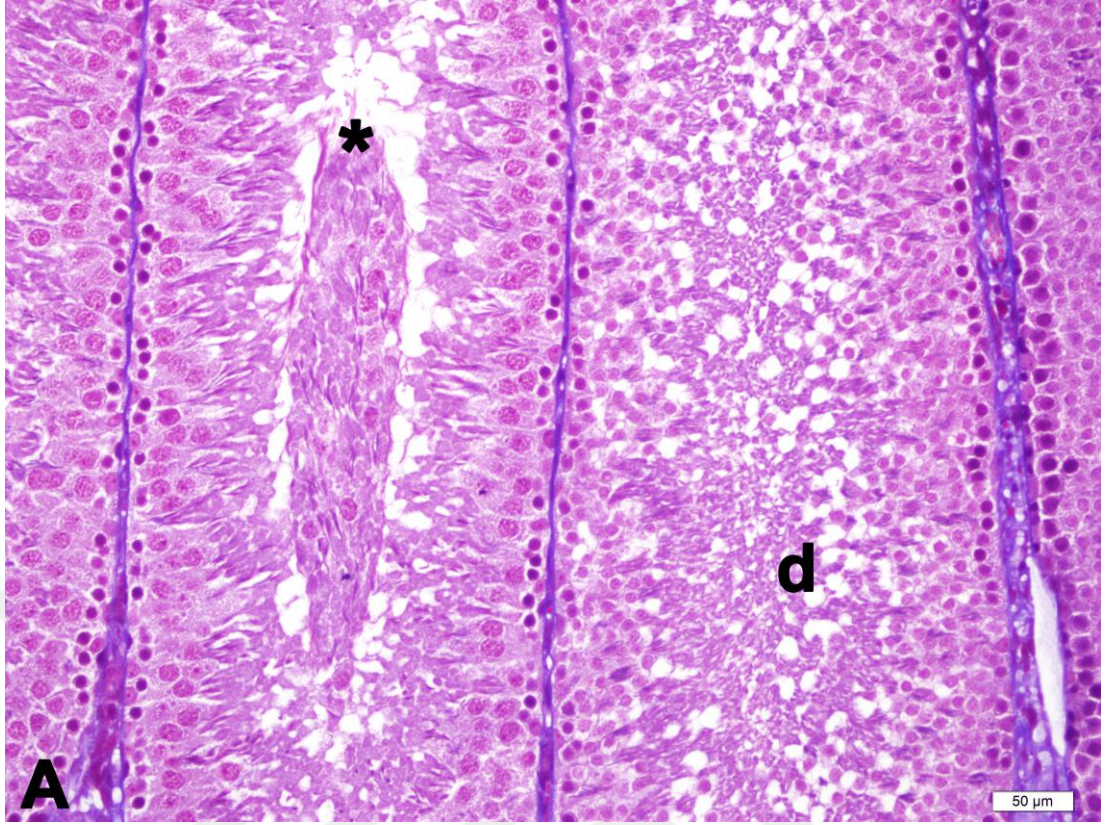
Resim 7 A, B: SİS grubunda (A) Seminifer tübülün bazal membranında yer yer düzensizlikler (→), lümende spermatogenik hücre döküntüleri (*) görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) seminifer tübül bazal membran yapısının düzenli yapısı görülmektedir. PAS reaksiyonu.

İnterstisyel bağ dokudaki değişikleri incelemek için kesitler Masson'un üçlü boyasıyla boyanmıştır. Tüm deney gruplarında interstisyel bağ dokusuna ait yapıların düzenli morfolojide olduğu gözlenmiştir (Resim 8 A, B, Resim 9 A, B).

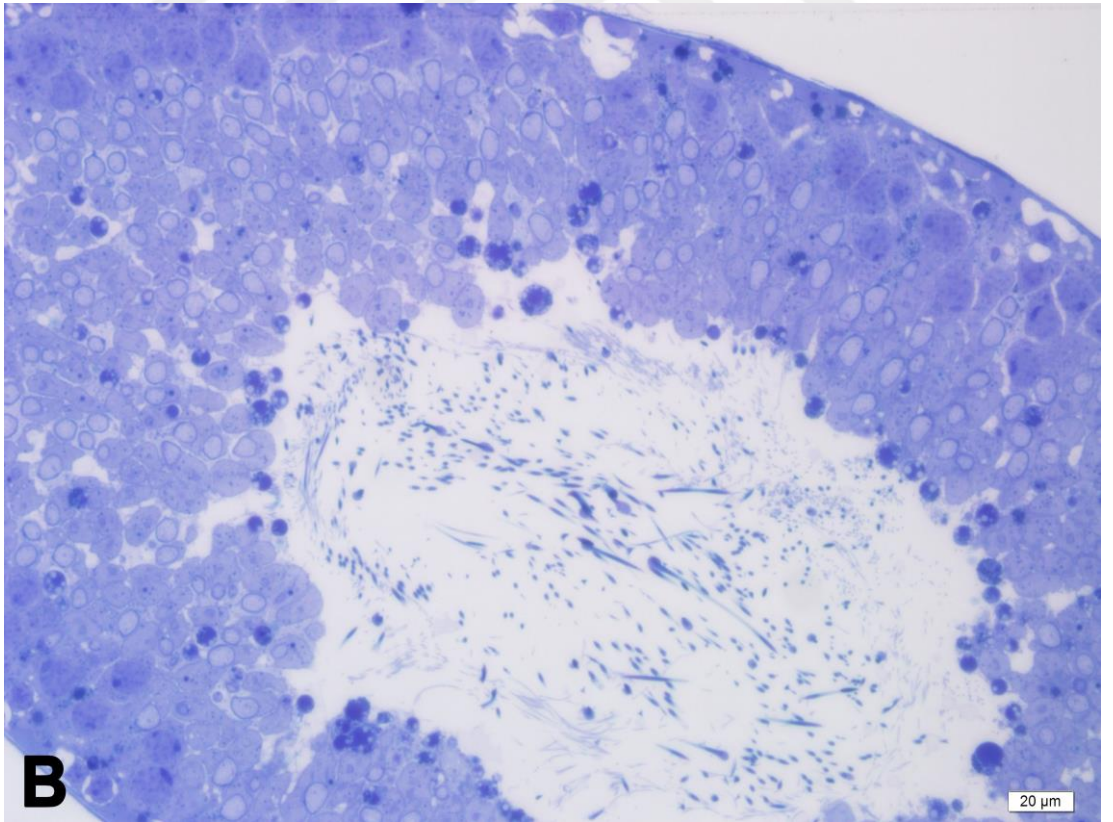
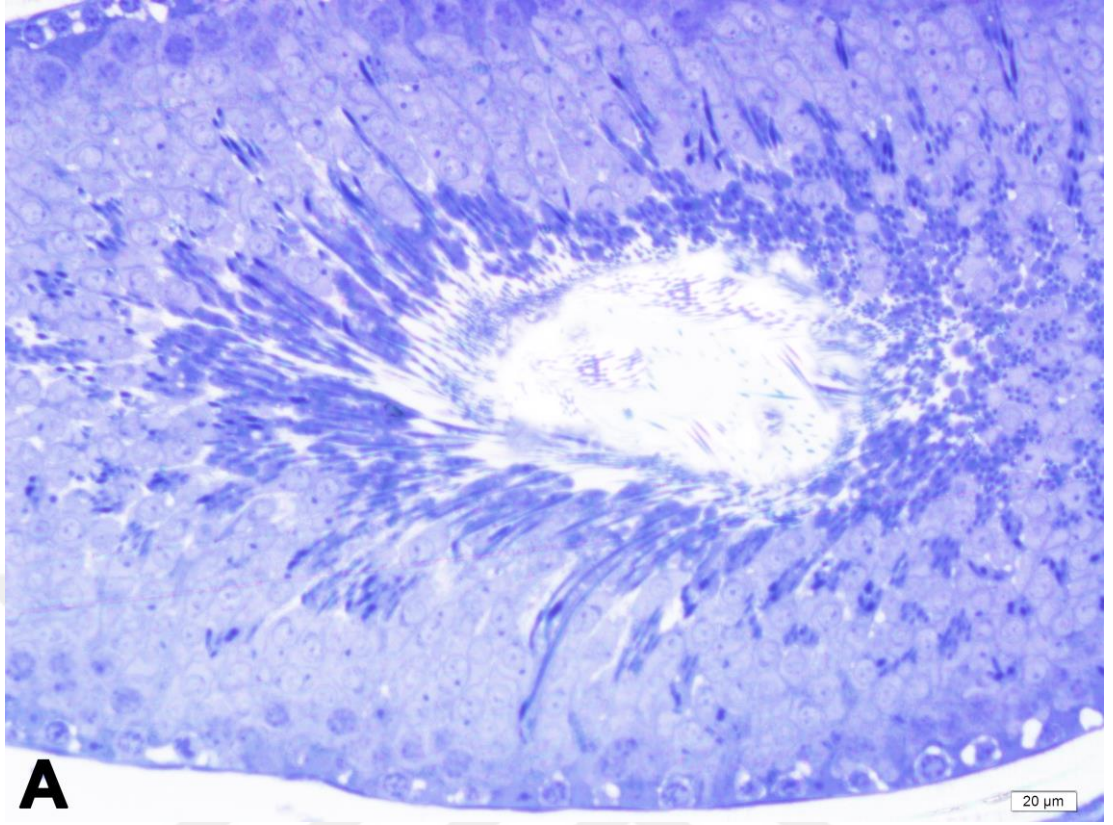
Işık mikroskopik incelemelerde H&E ile boyalı kesitlerde, Kontrol ve APO gruplarına ait epididimis örneklerinde epididimal kanal kesitlerinde lümeninin spermatozoa ile dolu olduğu, fibromüsküler bağ dokunun düzenli morfolojde olduğu görüldü (Resim 12 A, B). SİS grubuna ait bazı epididimal kanal kesitlerinin lümeninde spermatoza sayısının kontrol grubuna göre azaldığı fibromüsküler bağ dokusunda enflamatuvar hücre infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Resim 13A). SİS+APO grubuna ait bazı epididimal kanal kesitlerinin lümeninde spermatoza sayısının SİS grubuna göre arttığı, fibromüsküler bağ dokusunda enflamatuvar hücre infiltrasyonunda ise belirgin bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir (Resim 13B).



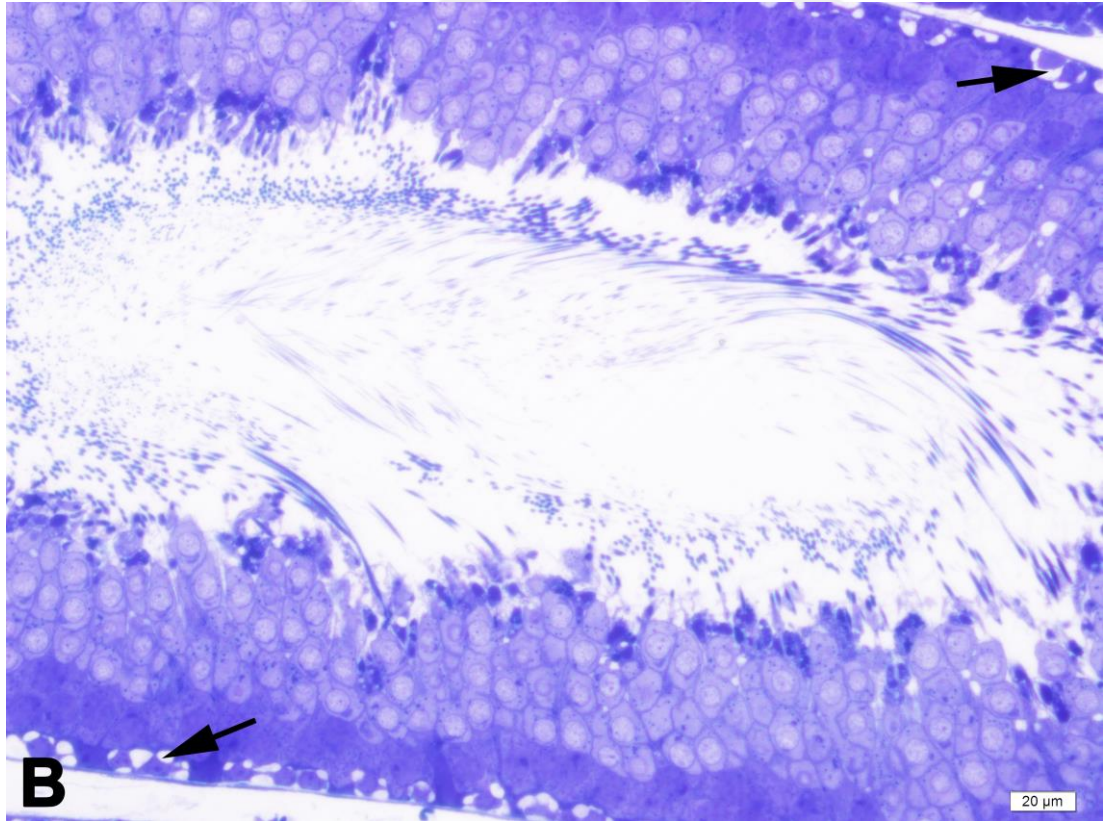
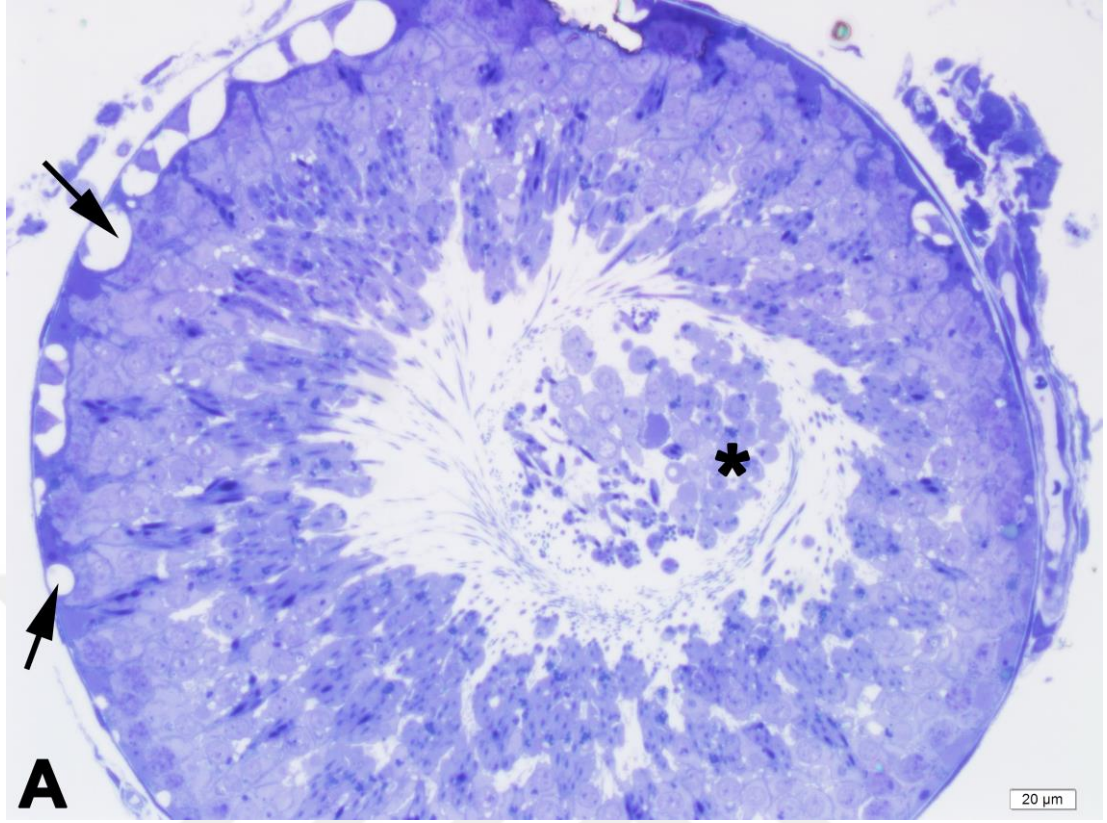
Resim 8 A, B: Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) seminifer tübülün ve interstisyel bağ dokusunun düzenli yapısı görülmektedir. Masson'un Trikrom boyası.



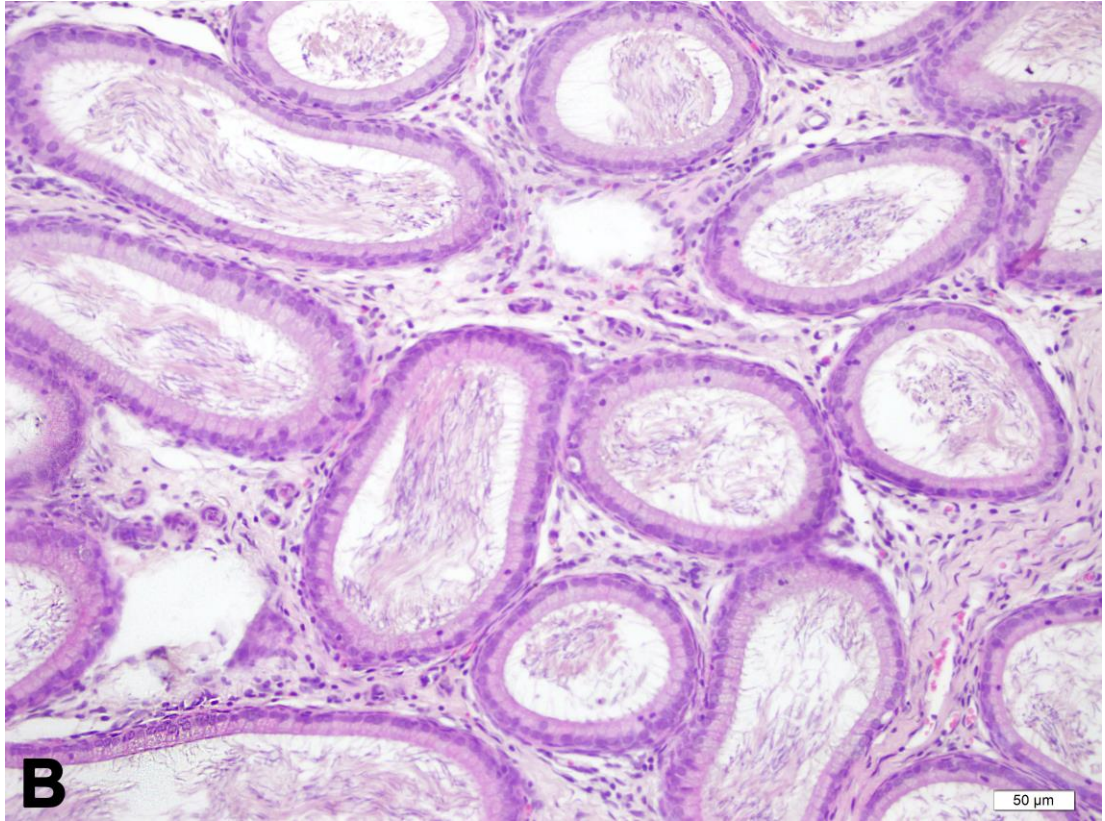
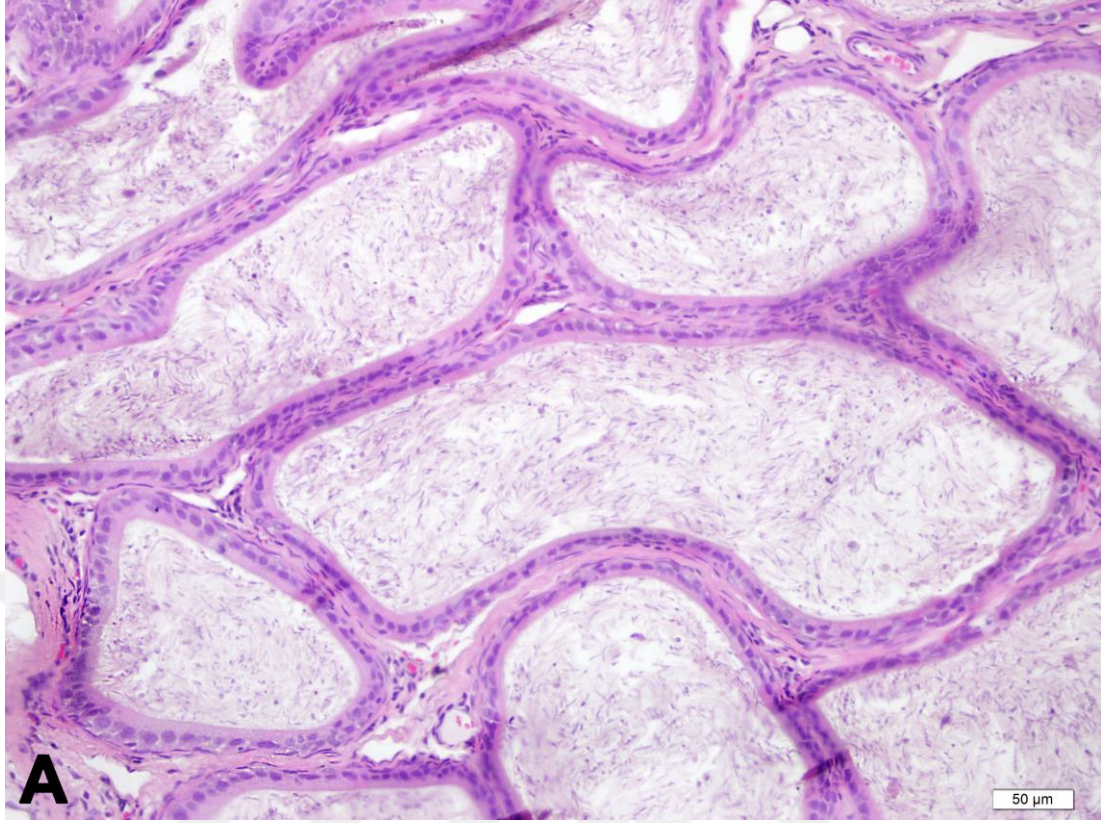
Resim 9 A, B: SİS grubunda (A) seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (*) ve dejeneratif (d) seminifer tübüller ve düzenli morfolojide interstisyel bağ dokusu görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) düzenli morfolojide interstisyel bağ dokusu görülmektedir. Masson'un Trikróm boyası.



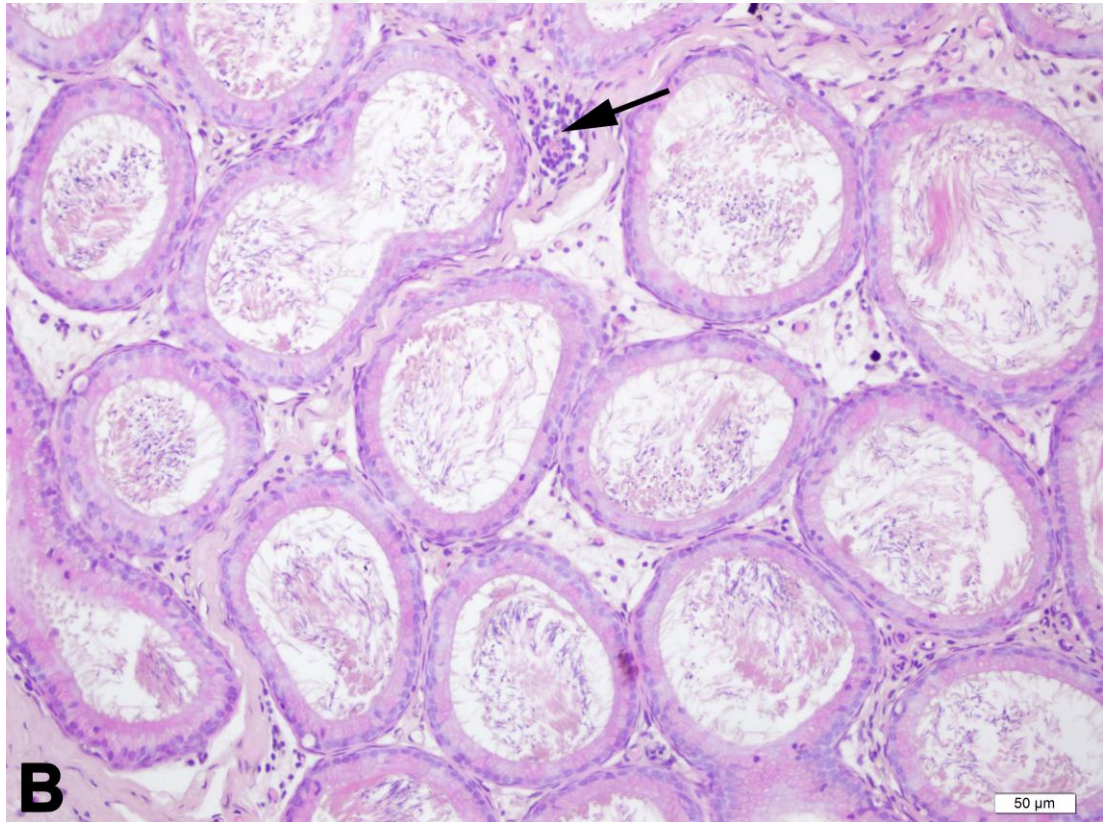
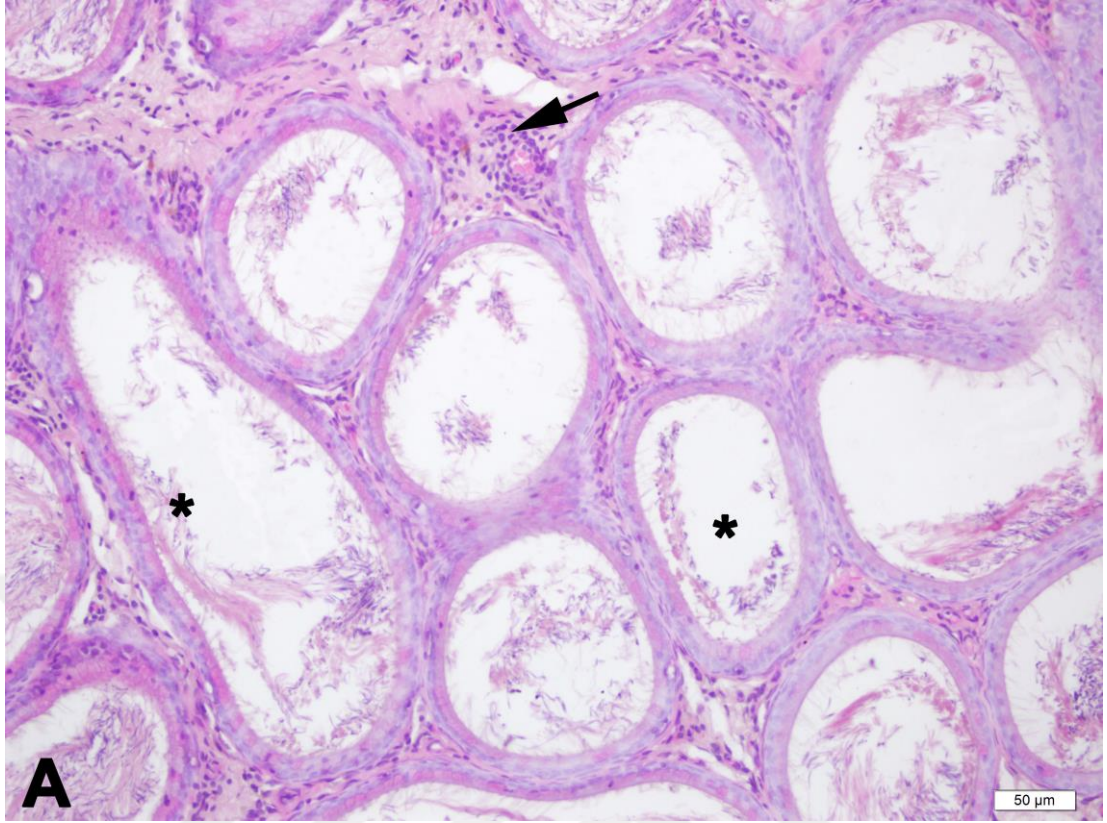
Resim 10 A, B: Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) seminifer tübülün düzenli yapısı görülmektedir. Toluidin Mavisi boyası.



Resim 11 A, B: SİS grubunda (A) spermatogenik hücreler arasında ayrılmalar (→) ve seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (*) görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) yer yer spermatogenik hücreler arasında ayrılmalar (→) görülmektedir. Toluidin Mavisi boyası.



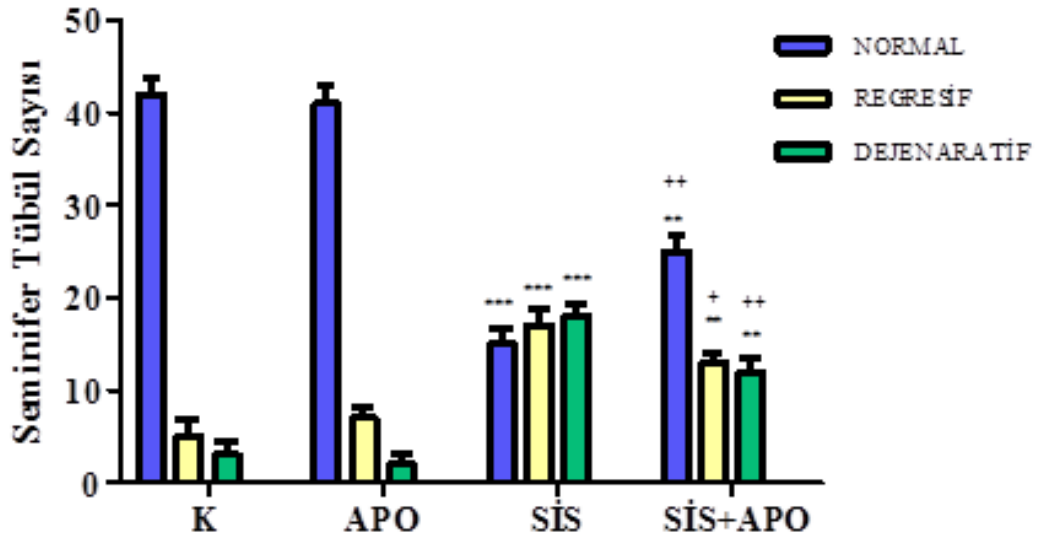
Resim 12 A, B: Kontrol grubu (A) ve APO grubunda (B) epididimal kanallarının düzenli yapısı ve lümende sperm kümeleri görülmektedir. H&E boyası.



Resim 13 A, B: SİS grubunda (A) epididimal kanal lümeninde spermatoza sayısının azaldığı (*) fibromüsküler bağ dokusunda enflamatuvar hücre infiltrasyonu (→) görülmektedir. SİS + APO grubunda (B) epididimal kanallarının düzenli yapısı, lümende sperm sayısında artış ve yer yer enflamatuvar hücre infiltrasyonu (→) görülmektedir. H&E boyası.

6.5. Seminifer Tübül Hasarı Histopatolojik Skorlama Bulguları

Tüm deney gruplarına ait seminifer tübüllerdeki histopatolojik değerlendirmeler Şekil 11’de gösterilmiştir. Kontrol ve APO grubunda çok sayıda normal seminifer tübül yapısı görülmüştür. SİS grubunda normal tübül sayısı anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.001$). Regresif seminifer tübül sayısı ve dejeneratif seminifer tübül sayısı SİS grubunda anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.001$). SİS + APO grubunda ise SİS grubuna göre normal seminifer tübül sayısında artış ($p<0.01$), regresif ($p<0.05$) ve dejeneratif ($p<0.01$) seminifer tübül sayısında azalma görülmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. Deney gruplarında normal, regresif, dejeneratif ve atrofik seminifer tübüllerin sayısı. **; $p<0.01$, ***: $p<0.001$ kontrol (K) grubu ile karşılaştırıldığında. + : $p<0.05$, ++ : $p<0.01$ SİS grubu ile karşılaştırıldığında.

6.6. PCNA İmmünohistokimyası Bulguları

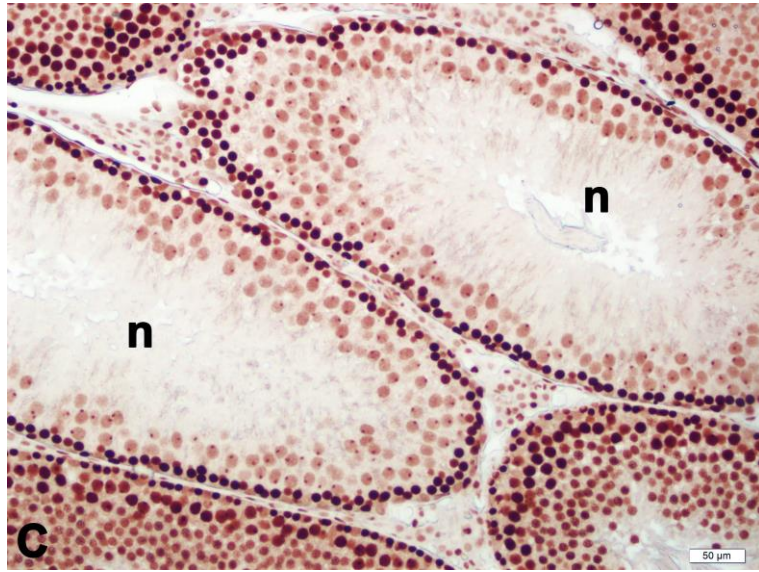
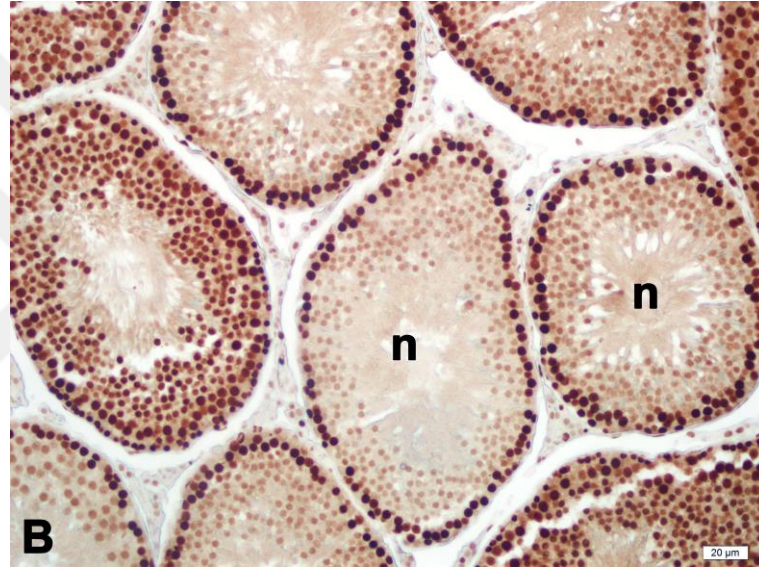
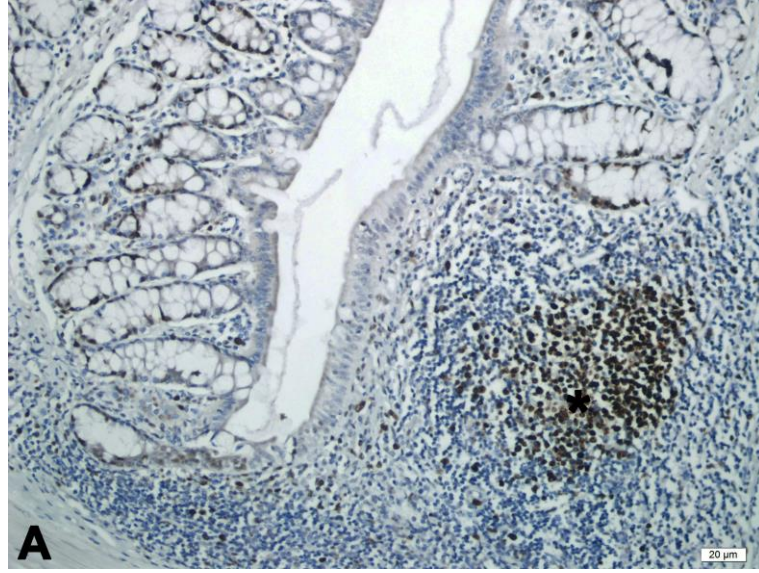
İnce barsak dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde (Resim 14 A) PCNA pozitif hücreler epitelyum dokusunda ve lamina propriada nükleusu koyu kahverengi boyanmış hücreler olarak gözlenmiştir. Kontrol grubuna ait testis dokusunda spermatogenik seriye ait çok sayıda PCNA pozitif hücreler koyu kahverengi boyalı olarak görüldü (Resim 14 B). APO grubunda kontrol grubuna benzer PCNA immünreaktivitesi gözlenmiştir (Resim 14 C).

SİS grubunda seminifer tübüllerde azalmış sayıda PCNA pozitif spermatogenik hücre serisi içeren seminifer tübüllere rastlanmıştır (Resim 15 A). SİS+ APO grubunda ise bazı tübüllerde daha fazla olmak üzere PCNA pozitif hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. SİS grubunda hücre proliferasyonunun diğer tüm gruplardan düşük olduğu ve SİS+ APO grubunda ise hücre proliferasyonunun kontrol ve APO gruplarına göre düşük olmakla beraber SİS grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Resim 15 B).

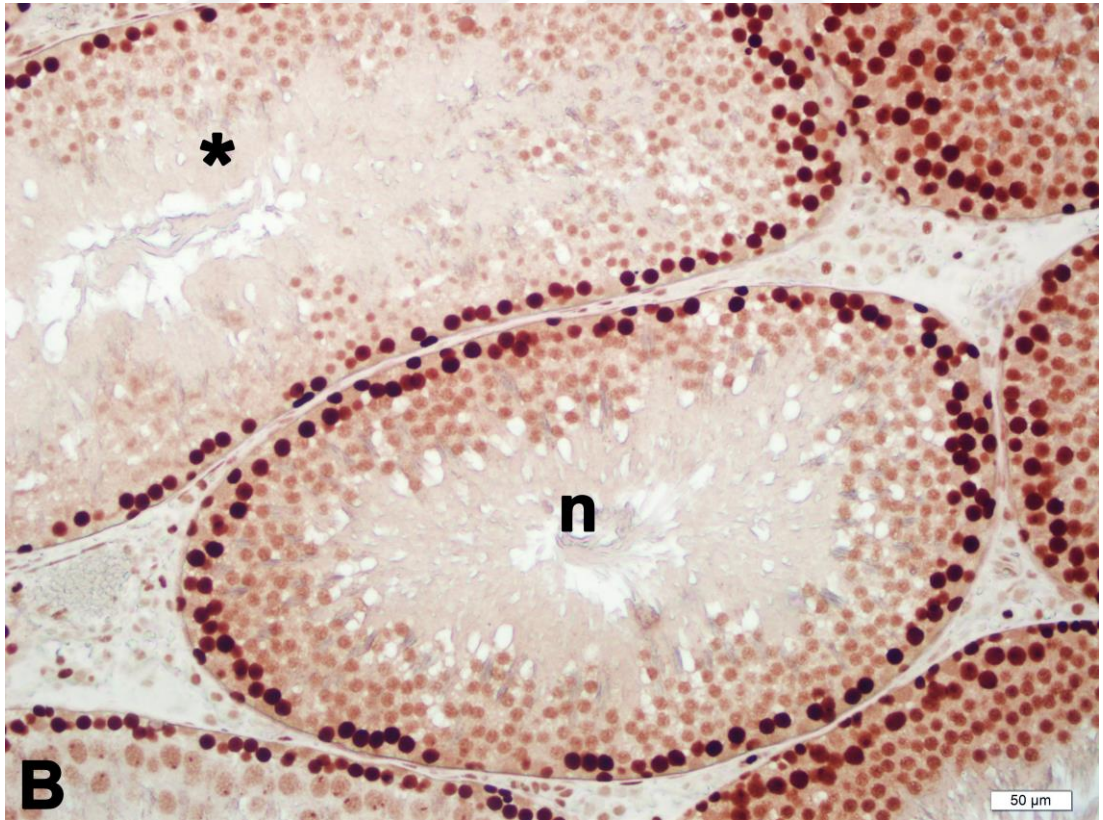
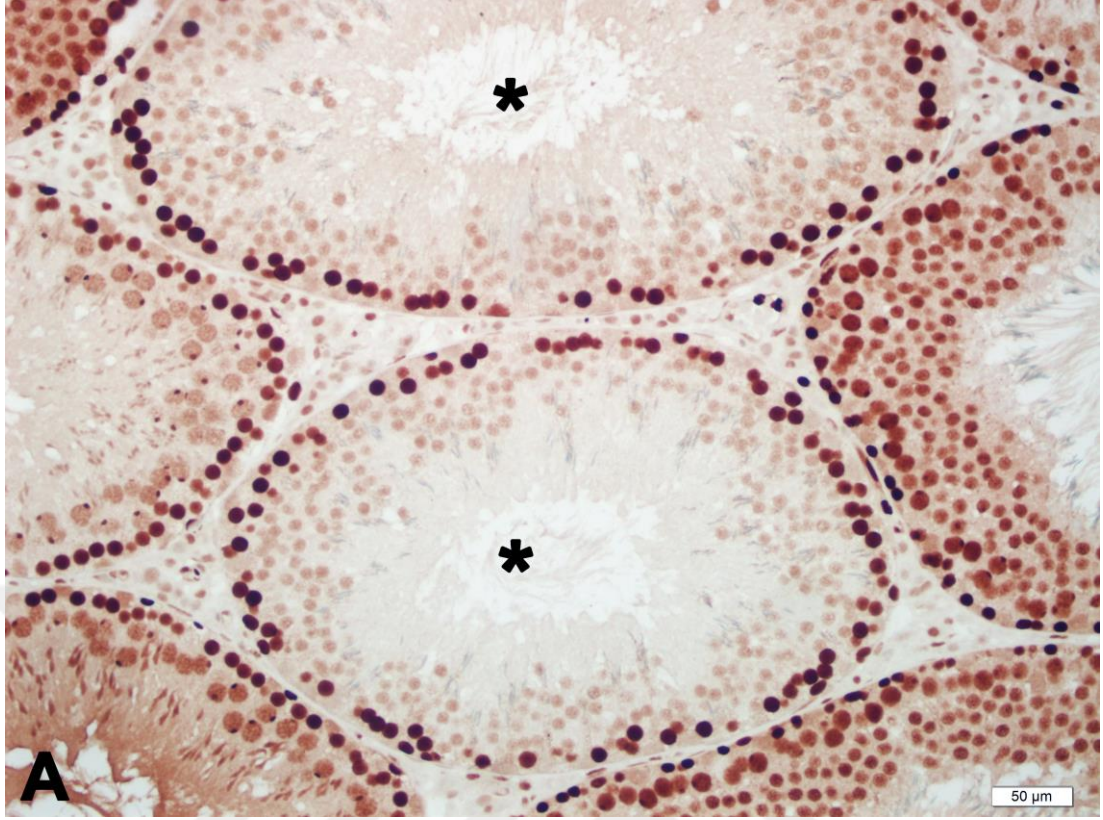
6.6.1. Proliferasyon İndeksi Analizi

Proliferasyon indeksi, kontrol grubunda ortalama $29,1 \pm 2,1$ iken APO grubunda $31,8 \pm 2,9$, SİS grubunda $22,5 \pm 5,3$ ve SİS+APO grubunda $26,9 \pm 4,8$ idi.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda proliferasyon indeksinin anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.001$). SİS+APO grubunda ise SİS grubuna göre yükselme gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ve kontrol grubu ile kıyaslandığında halen anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$) (Şekil 12).



Resim 14 A, B, C: İnce barsak dokusuna ait pozitif kontrol örneğinde PCNA pozitif (*) boyanma gösteren hücreler görülmektedir (**A**). Kontrol (**B**) ve APO grubunda (**C**) çok sayıda PCNA pozitif spermatogenik hücre serisi içeren seminer tübüller (**n**) görülmektedir. PCNA immünohistokimyası.



Resim 15 A, B: SİS grubunda (A), seminifer tübüllerde (*), PCNA pozitif boyanmış hücre sayısında azalma olduğu görülmektedir. SİS+APO grubunda (B) PCNA pozitif spermatogenik hücre serisini içeren normal seminifer tübüllerin (n) yanı sıra, az sayıda PCNA pozitif spermatogonyumların boyandığı seminifer tübüller (*) görülmektedir.

6.7. TUNEL Bulguları

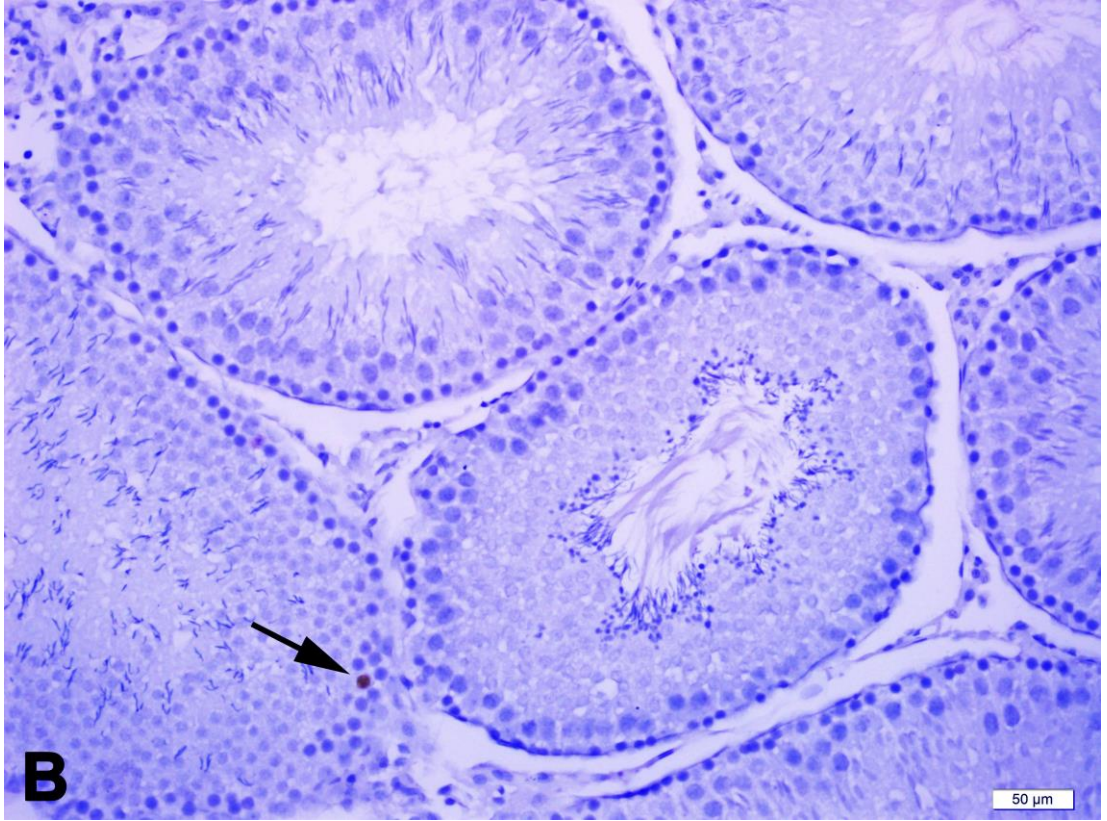
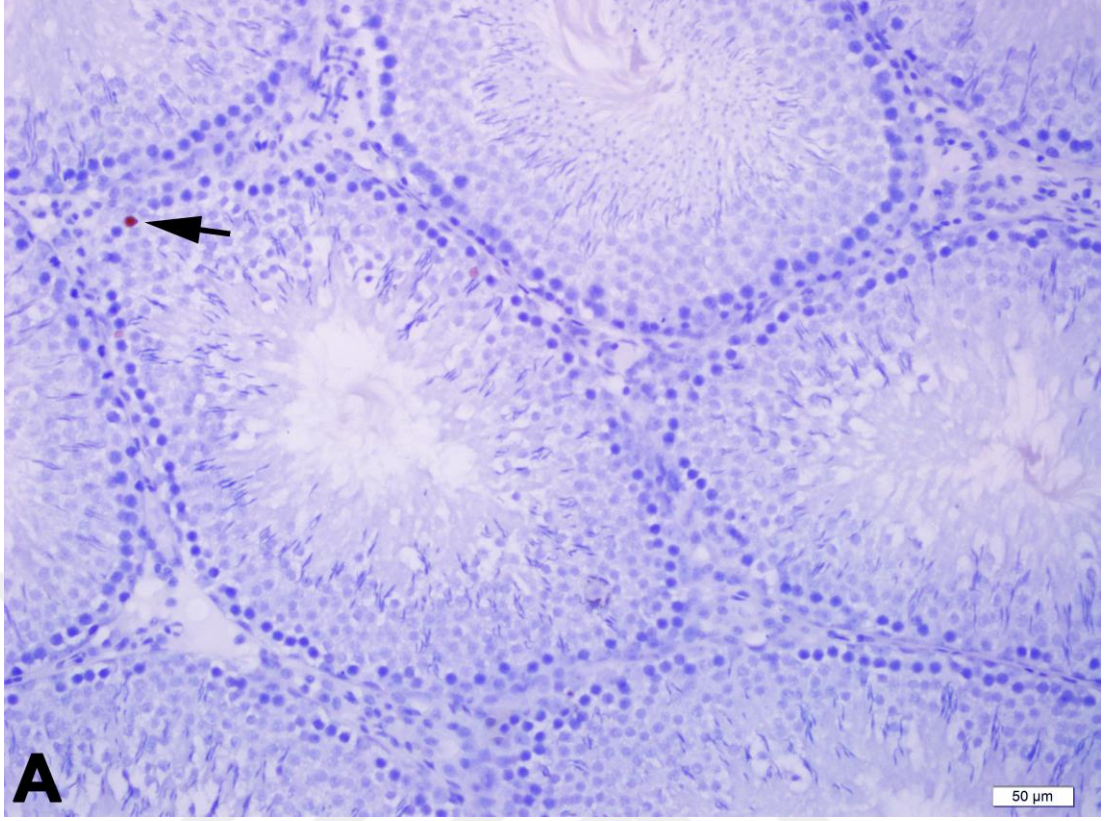
Kontrol grubu ve APO grubuna ait testis dokularında bulunan seminifer tübüllerin çoğunda hücrelerde çok az sayıda TUNEL pozitif işaretlenmiş hücrelere rastlanmıştır (Resim 16 A ve B).

SİS grubunda 3 ve daha fazla TUNEL pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısında artış olduğu gözlenmiştir (Resim 16 A). SİS+APO grubunda 3 ve daha fazla TUNEL pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısında azalma olduğu gözlenmiştir (Resim 16 B).

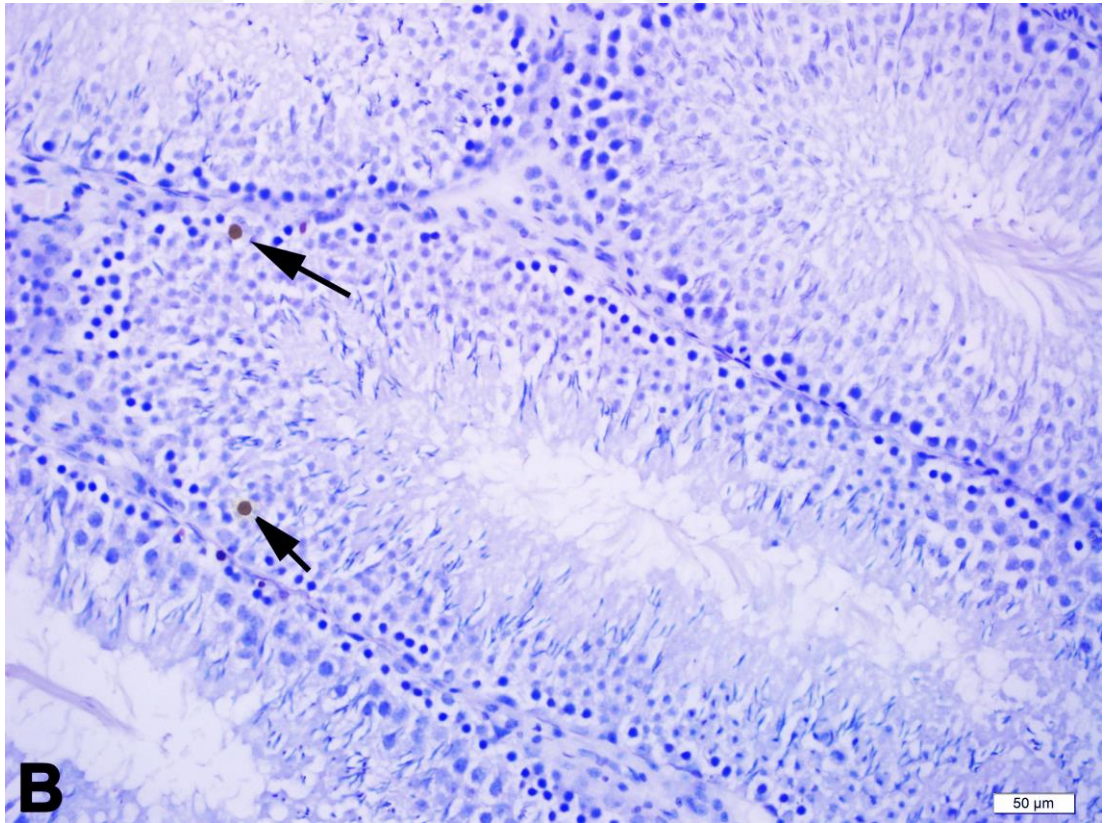
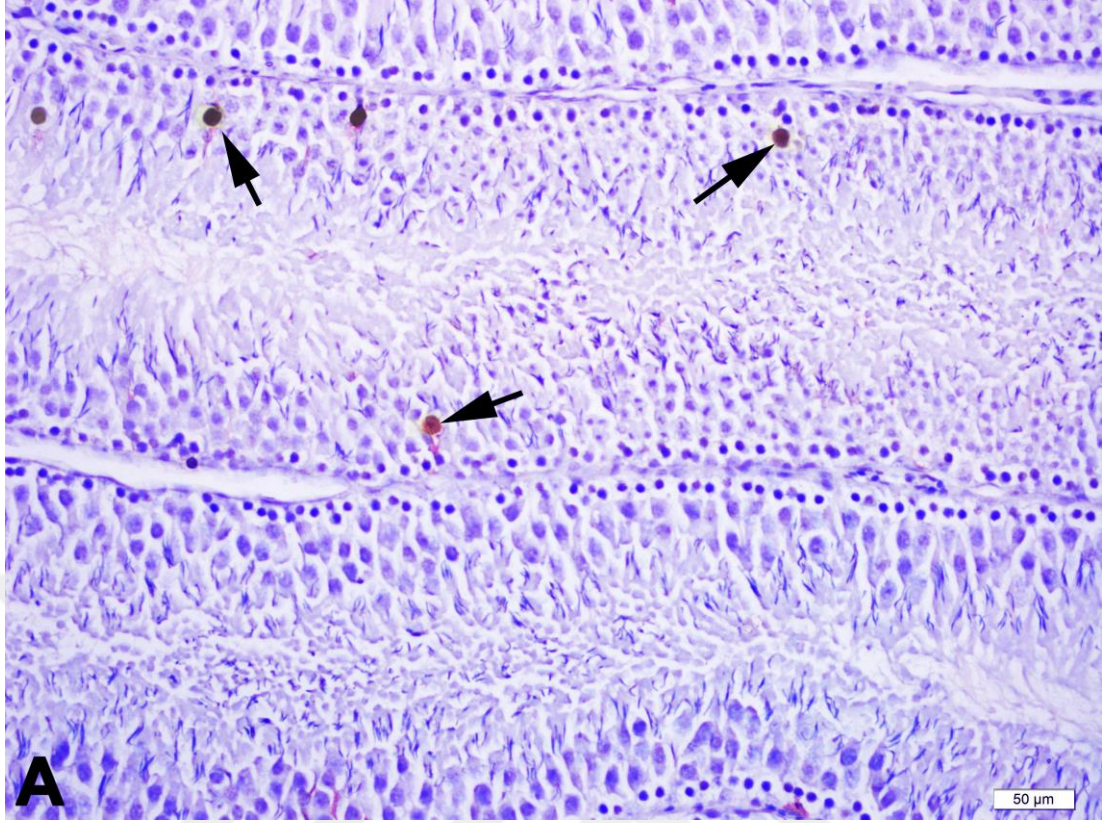
6.7.1. Apoptotik İndeks Analizi

Apoptotik indeks, kontrol grubunda $1,57 \pm 0,7$ APO grubunda $0,85 \pm 0,6$, SİS grubunda $5,8 \pm 2,6$ ve SİS+APO grubunda ise $3,2 \pm 2,2$ olarak bulunmuştur.

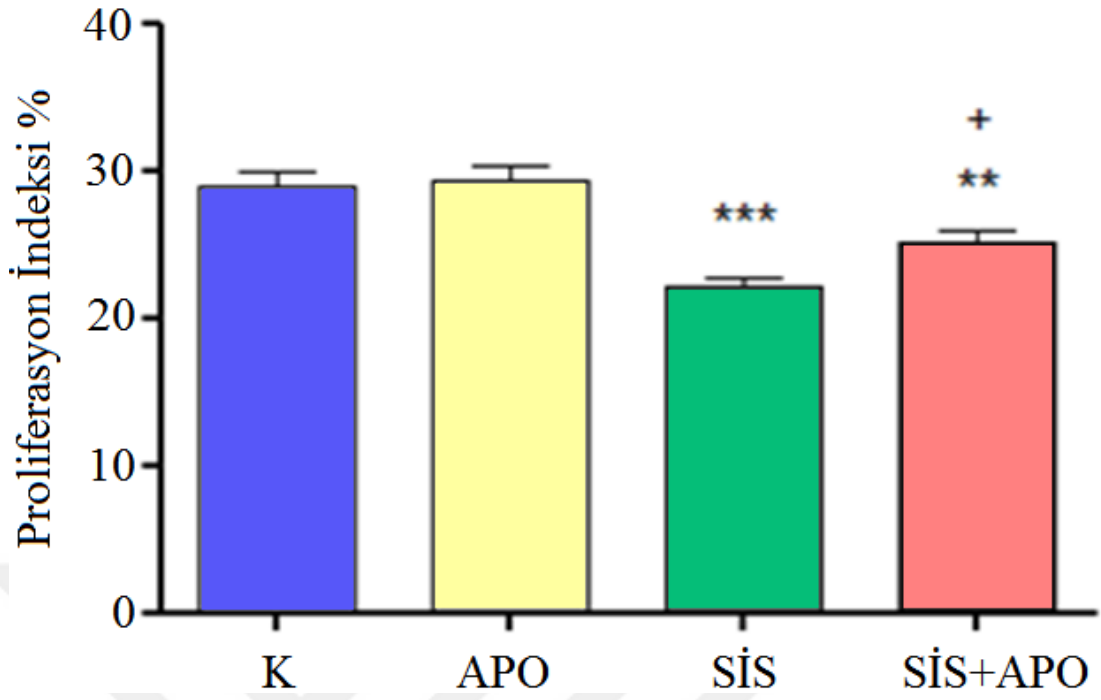
Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda apoptotik indeks anlamlı bir şekilde ($p < 0.001$) yüksekti. SİS+APO grubunda SİS grubuna göre anlamlı düşüş ($p < 0.001$) gözlenmekle birlikte hala kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) yüksekti (Şekil 13).



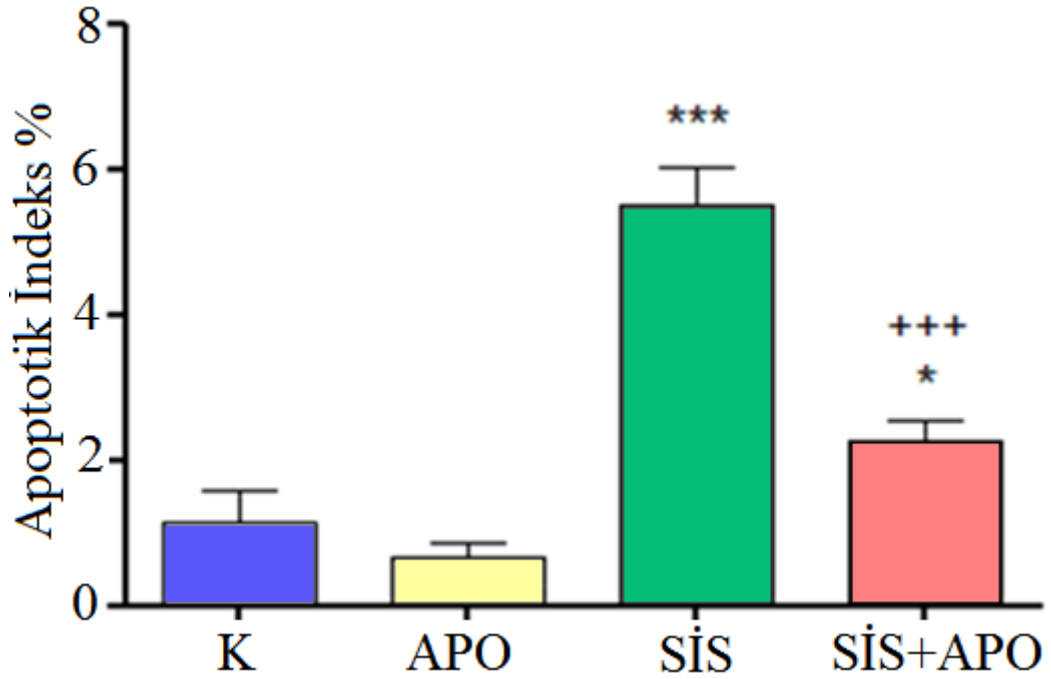
Resim 16 A, B: Kontrol (A) ve APO grubunda (B) az sayıda hücrede TUNEL pozitif işaretlenme (→) görülmektedir. TUNEL boyaması.



Resim 17 A B: SİS grubunda (A) TUNEL pozitif işaretlenme (→) görülen hücrelerde artış görülmektedir. SİS+APO grubunda (B) az sayıda hücrede TUNEL pozitif işaretlenme (→) görülmektedir. TUNEL boyaması.



Şekil 12. Deney gruplarına ait proliferasyon indeksi grafiği. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Kontrol (K) grubu ile kıyaslandığında. + : $p < 0.05$ SİS grubu ile kıyaslandığında.



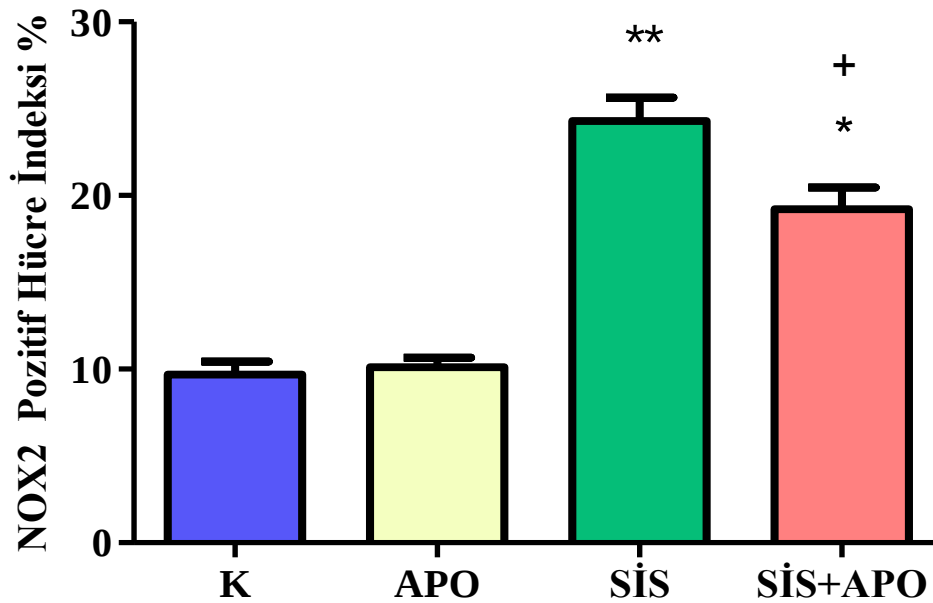
Şekil 13: Deney gruplarına ait apoptotik indeks grafiği. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. +++ : $p < 0.001$ SİS grubu ile kıyaslandığında.

6.8 NOX2 İmmünohistokimya Bulguları

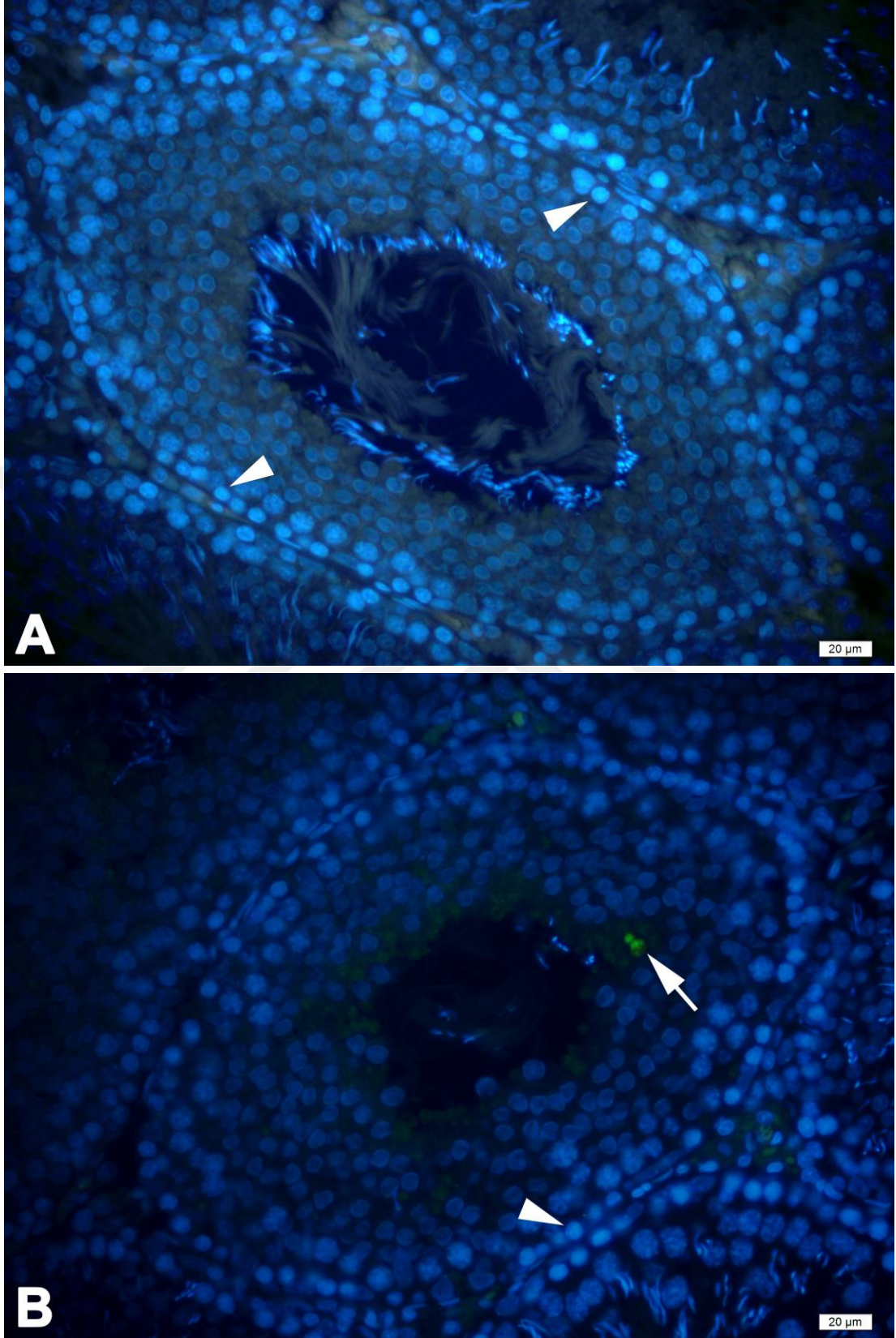
Kontrol grubu ve APO grubuna ait testis dokularında bulunan seminifer tübüllerde ve interstisyel bağ dokuda çok az sayıda hücrenin NOX2 immünreaktif (ir) pozitif işaretlenmiş olarak parlak yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. NOX2-ir negatif hücrelerin ise sadece nücleusları mavi boyalı olarak görülmüştür (Resim 18 A ve B). SİS grubunda NOX2-ir pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısında artış olduğu ve bu artışın da özellikle spermatidlerde olduğu görülmüştür (Resim 19 A). SİS+APO grubunda NOX2-ir pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısında azalma olduğu gözlenmiştir (Resim 19 B).

6.8.1. NOX2 Pozitif Hücre Analizi

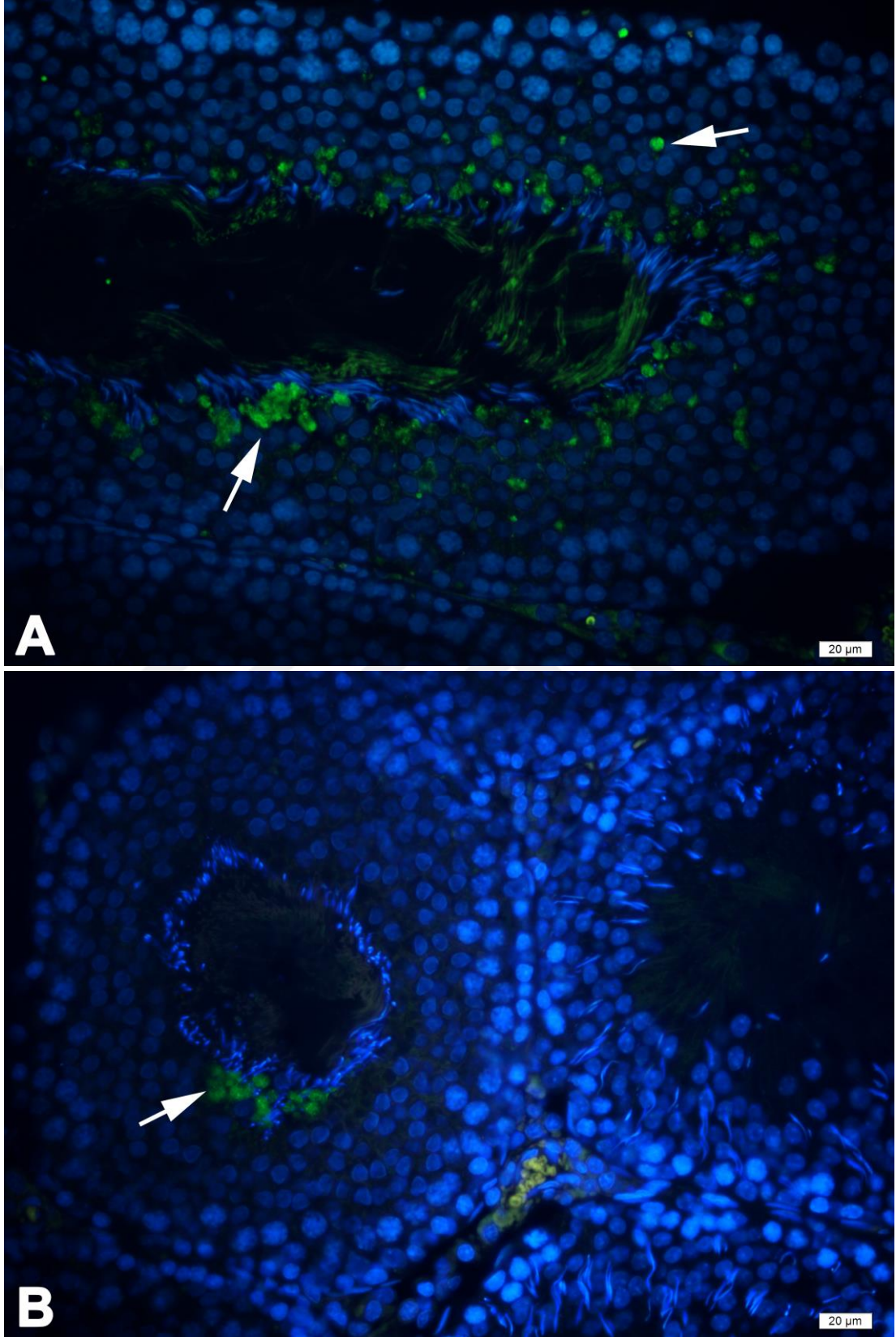
NOX2-ir pozitif hücre indeksi, kontrol grubunda $9,7 \pm 3,31$ APO grubunda $10,1 \pm 2,53$, SİS grubunda $24,3 \pm 5,93$ ve SİS+APO grubunda ise $19,2 \pm 5,62$ olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda pozitif hücre indeksi anlamlı bir şekilde ($p < 0.01$) yüksekti. SİS+APO grubunda SİS grubuna göre anlamlı düşüş ($p < 0.05$) gözlenmekle birlikte hala kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) yüksekti (Şekil 14).



Şekil 14: Deney gruplarına ait NOX2-ir pozitif hücre indeksi grafiği. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. + : $p < 0.05$ SİS grubu ile kıyaslandığında.



Resim 18 A, B: Kontrol (A) ve APO grubunda (B) interstisyel alanda az sayıda NOX2-ir pozitif hücreler (→) parlak yeşil renkte, NOX2-ir negatif hücreler ise parlak mavi renkte (►) görülmektedir. NOX2 ve DAPI II immünfloresan boyaması.



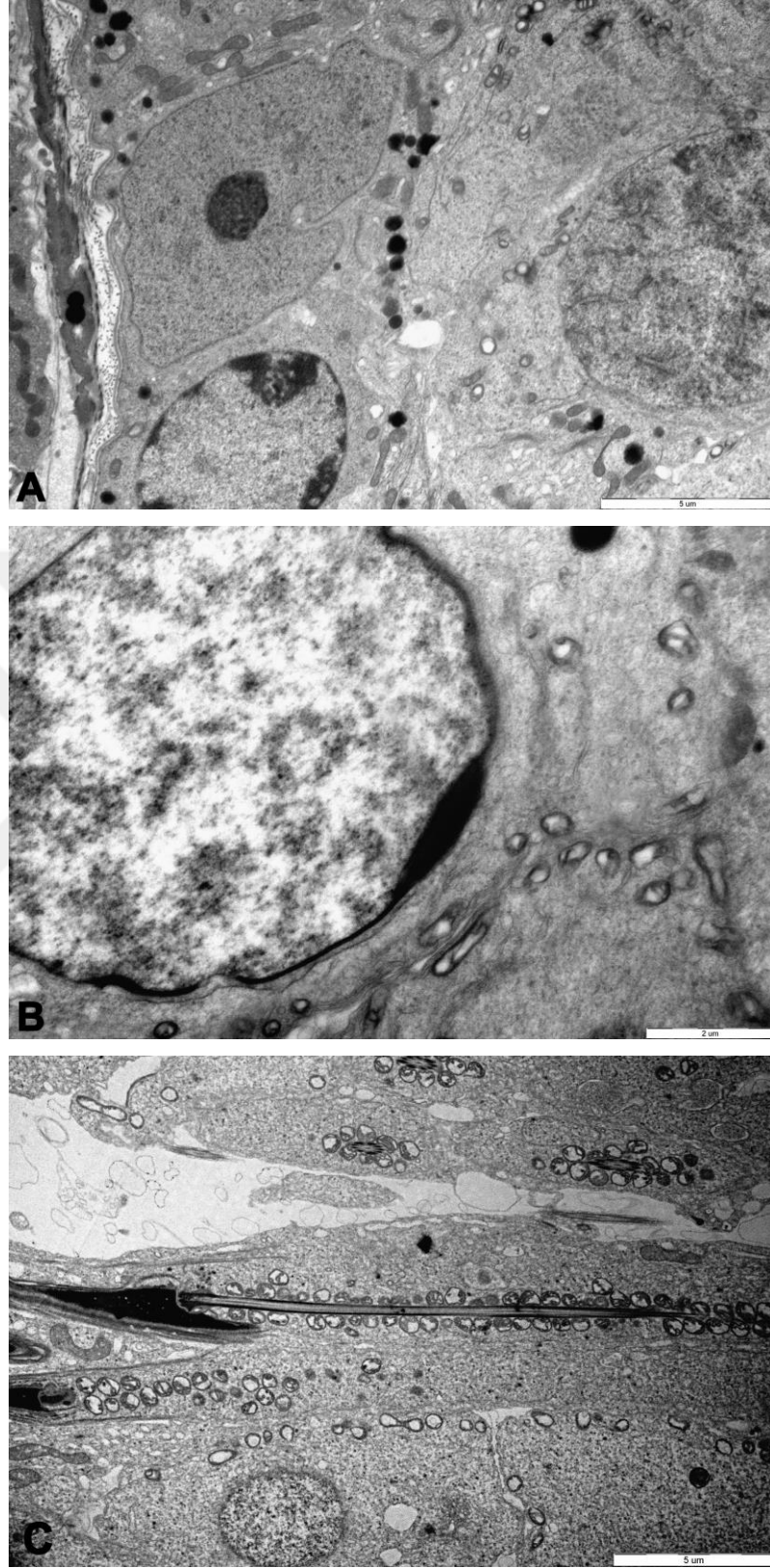
Resim 19 A B: SİS grubunda (A) seminifer tübüllerde NOX2-ir (→) pozitif sekonder spermatositler, spermatitler ve spermatozalarda artış olduğu görülmektedir. SİS+APO grubunda (B) az sayıda NOX2-ir pozitif hücre (→) görülmektedir. NOX2 ve DAPI II immünfloresan boyaması.

6.9.Elektron Mikroskop Bulguları

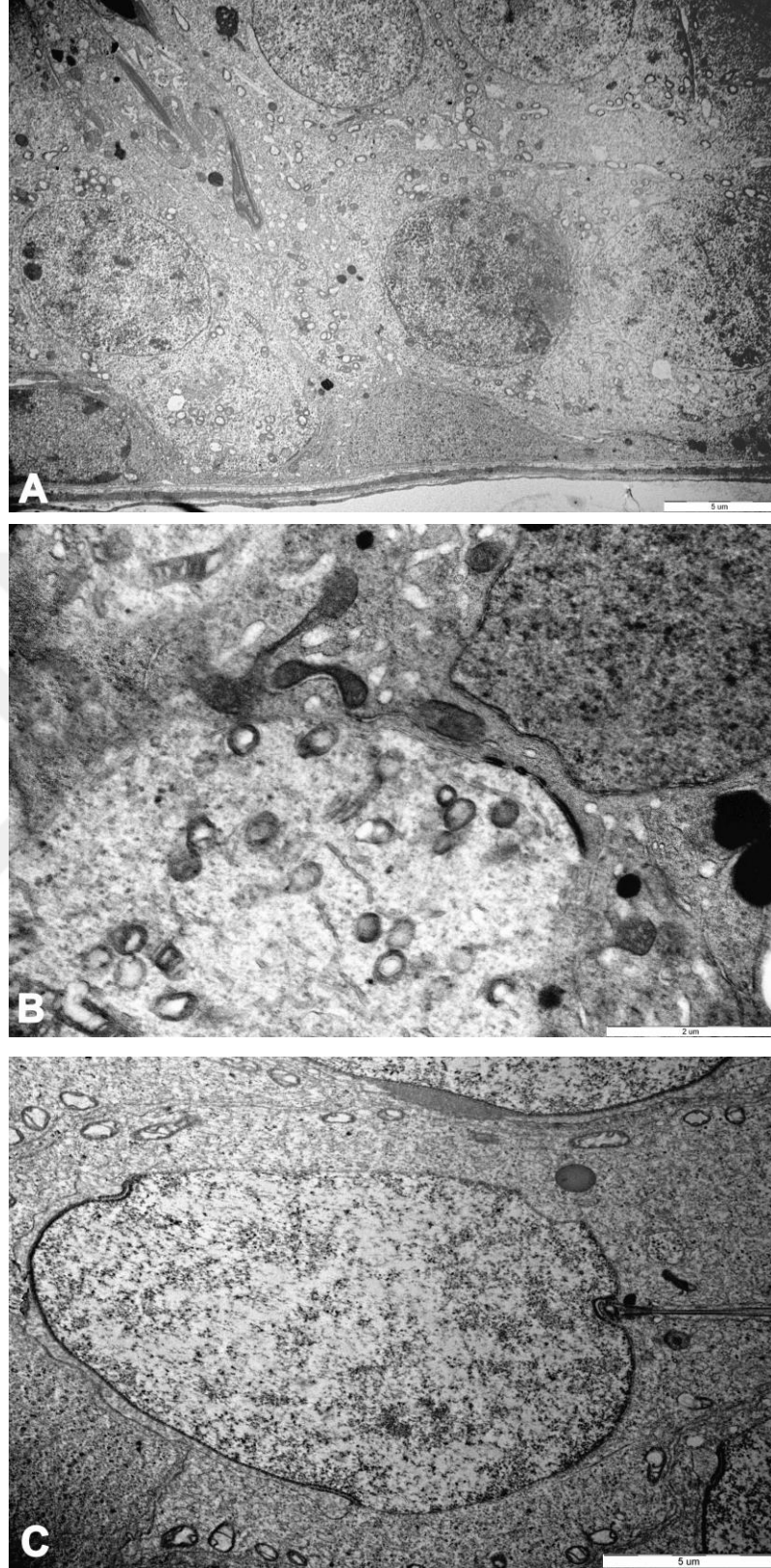
Kontrol grubu (Resim 20 A, B ve C) ve APO grubunda (Resim 21 A, B ve C) düzenli morfolojide, normal kalınlıkta bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar gözlenmiştir. Sertoli hücreleri arasında düzenli morfolojide sıkı bağlantılar bulunmaktaydı. Spermatogenik hücrelerin bazaldan lümeneye doğru organizasyonları normal morfolojide gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin lümeninde düzenli morfolojide bol miktarda sperm başı ve kuyruk morfolojileri gözlenmiştir.

SİS grubunda seminifer tübül hasarı oldukça belirgindi. Seminifer tübül duvarındaki hücre sırası 1-2 hücreye kadar gerilediği gözlenmiştir. Sertoli hücrelerinin ve spermatogenik seriye ait hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu ve hücreler arası alanlarda büyük boşlukların olduğu gözlenmiştir. Tübül lümeninde hücre artıklarının olduğu görülmüştür. Hücreler arasındaki sıkı bağlantıların etrafında büyük boşlukların oluştuğu gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin etrafındaki bazal laminada lümeneye doğru uzanan parmaklı uzantıların oluştuğu gözlenmiştir (Resim 22 A, B).

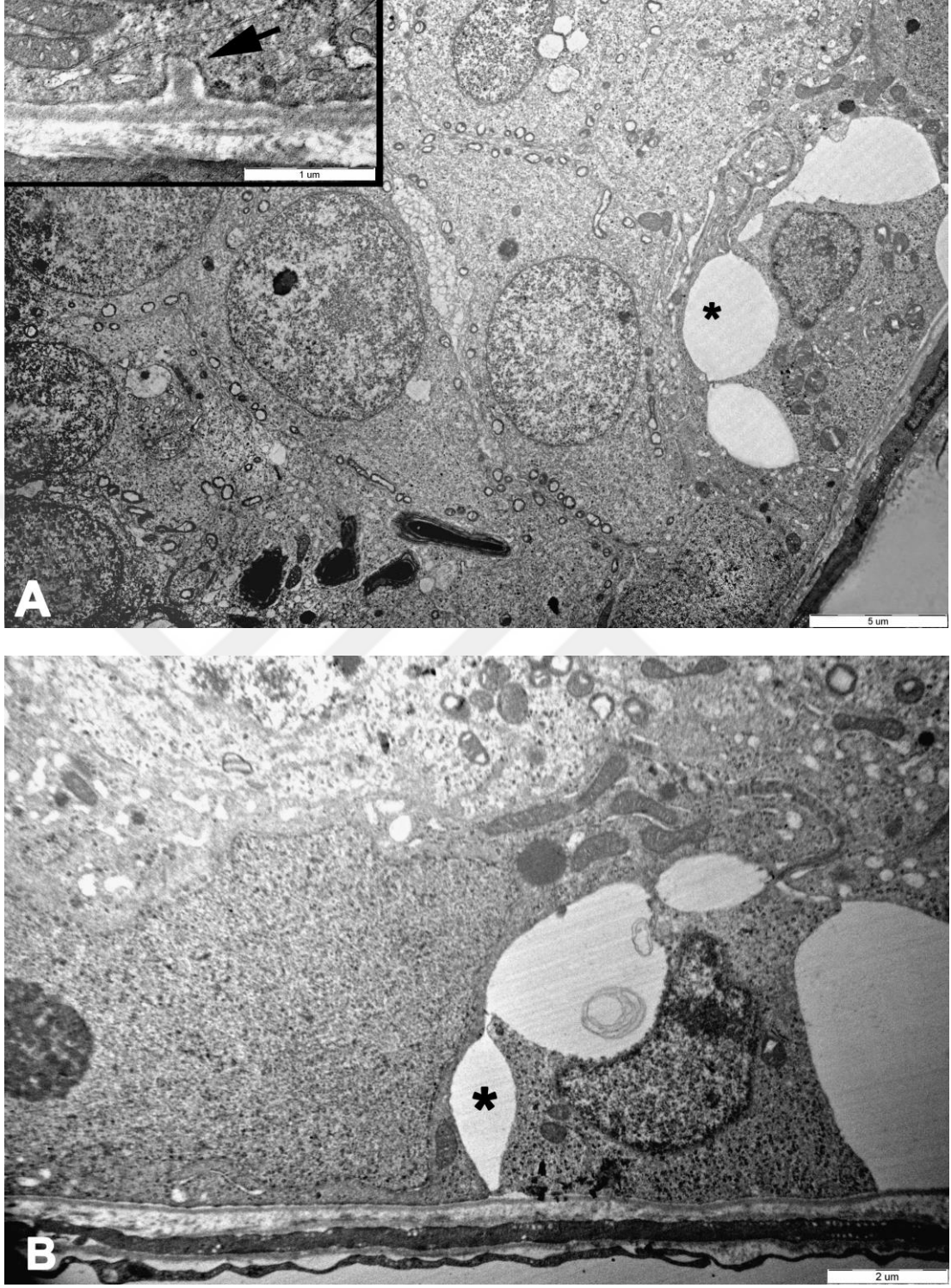
SİS+APO grubunda bazal lamina üzerinde bulunan birçok alanda düzenli morfolojide Sertoli hücreleri, sıkı bağlantılar ve spermatogenik seriye ait hücreler gözlenmiştir. Seminifer tübül lümeninde çok sayıda uzayan spermatidler ve spermatozoonlar gözlenmiştir. Bazı tübüllerin bazal bölümlerinde hücre içinde ve sıkı bağlantıların etrafındaki sitoplazmik alanlarda vakuol oluşumlarına ve hücreler arası alanlarda lokal açılımlara rastlanmıştır (Resim 23 A, B ve C).



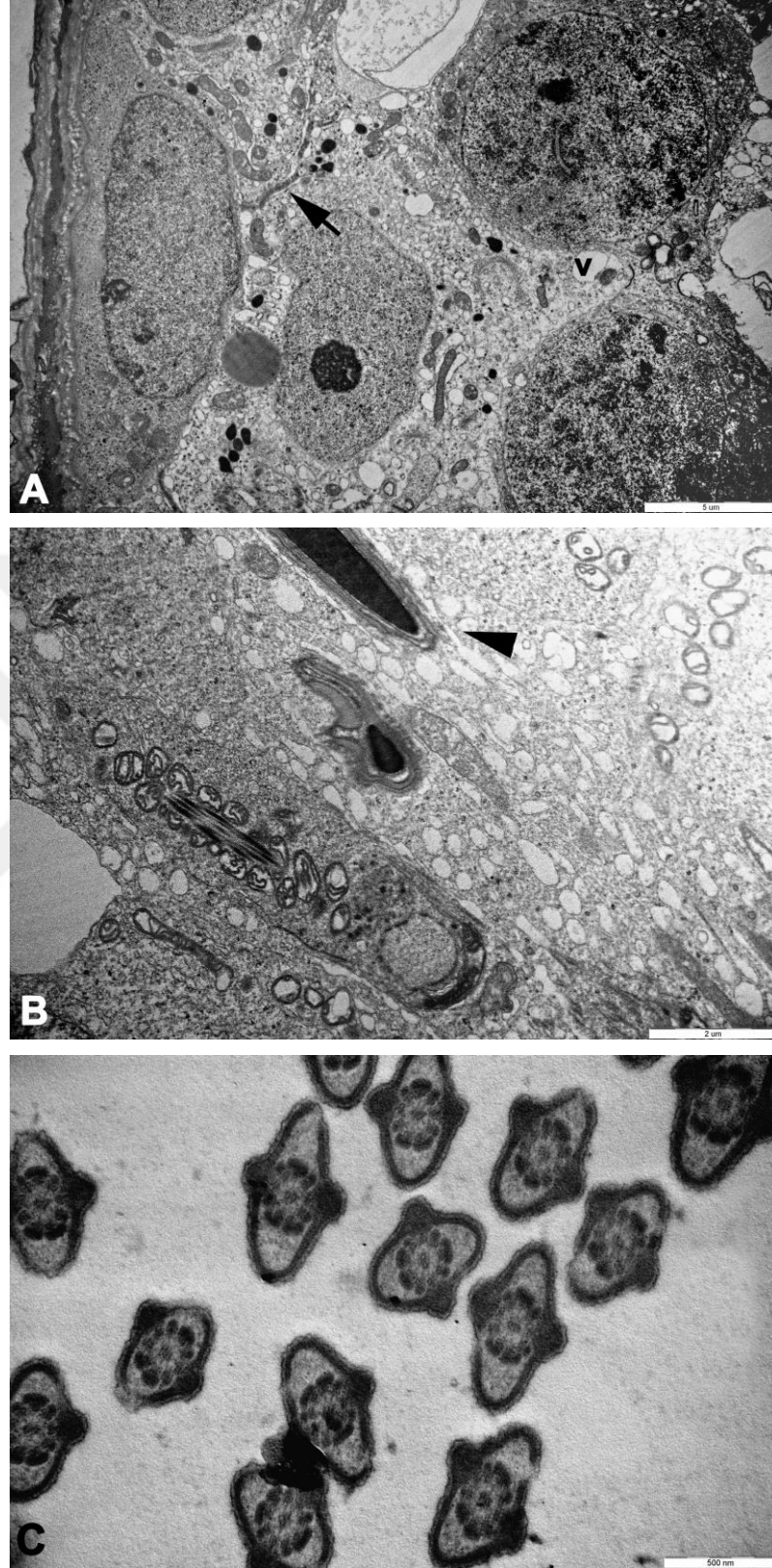
Resim 20 A, B, C: Kontrol grubunda bazal laminanın, Sertoli hücrelerinin spermatogonyumların, primer spermatositlerin (A) ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların düzenli morfolojisi görülmektedir.



Resim 21 A, B, C: APO grubunda Sertoli hücrelerinin, spermatogonyumların, primer spermatositlerin ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların düzenli morfolojisi görülmektedir.



Resim 22 A, B: SİS grubunda bazal laminada sitoplazma içine doğru parmaklı uzantıların oluşumu (□), bazal kompartmanda hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların etrafında büyük vakuol oluşumları (*) görülmektedir.



Resim 23 A, B, C: SİS+APO grubunda bazal laminanın, Sertoli hücreleri ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların düzenli morfolojisi (→, A) ve bazı alanlarda vakuol oluşumu (v, A) görülmektedir. Lümeninde uzamış spermatidler (►, B) görülmektedir. Sperm kuyruğunun eninne görüntüsü (C).

6.10. Oksidatif Stres Bulguları

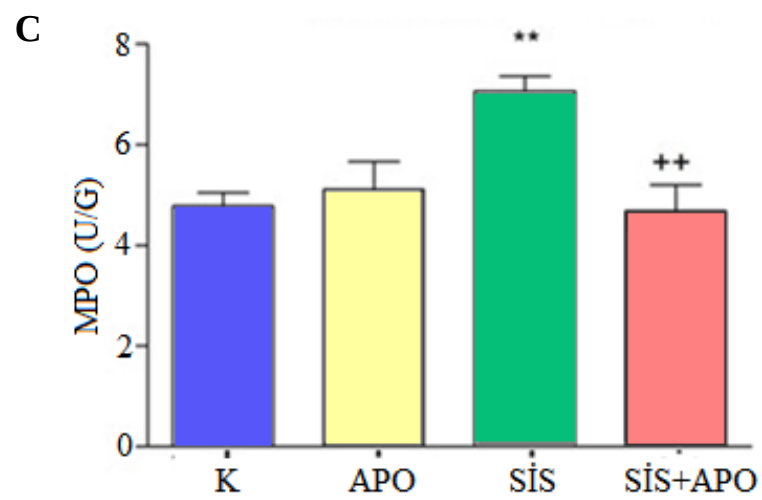
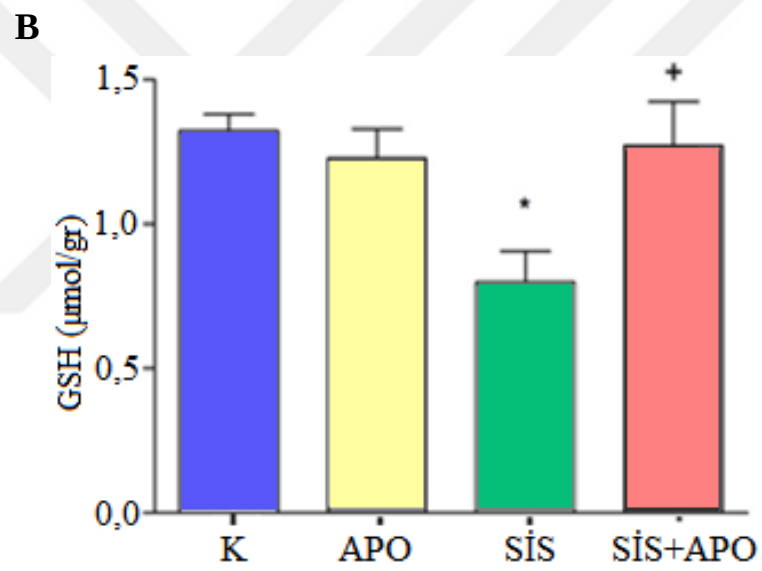
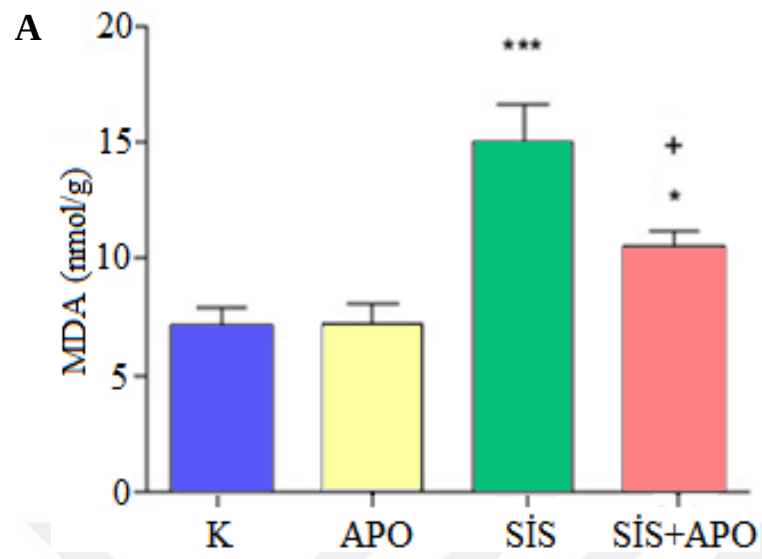
Kontrol grubu ile kıyaslandığında, SİS grubunda MDA düzeyinde ($p<0.001$) anlamlı artış gözlenmektedir. SİS+APO grubunda, SİS grubu ile kıyaslandığında ise anlamlı düşüş olduğu görülmüştür ($p<0.05$), ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA düzeyinin hala yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 15 A).

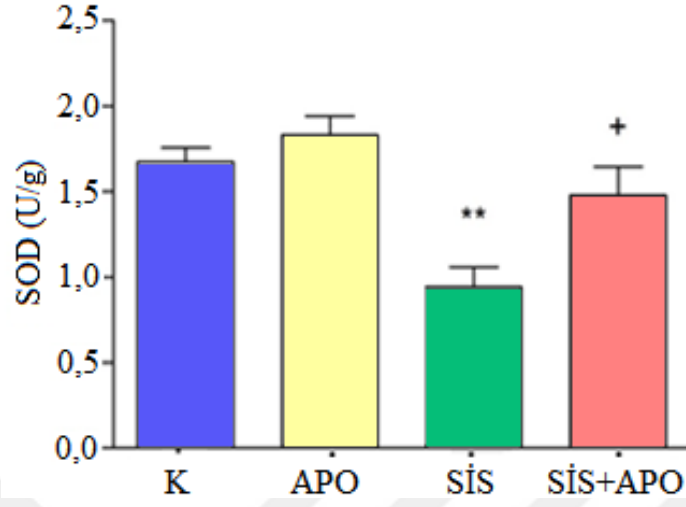
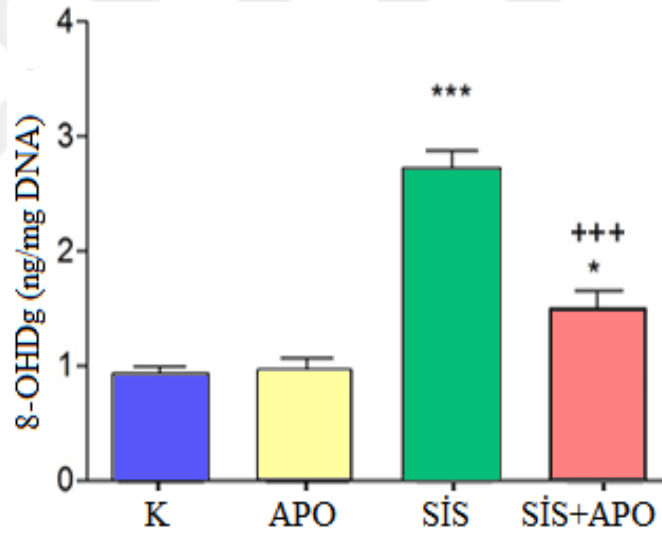
Kontrol grubu ile kıyaslandığında, SİS grubunda GSH düzeyinde anlamlı düşüş ($p<0.05$) gözlenmiştir. SİS+APO grubunda, SİS grubu ile kıyaslandığında GSH düzeyinde anlamlı yükselme ($p<0.05$) gözlenmiştir. (Şekil 15 B).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, SİS grubunda MPO aktivitesinin yükseldiği gözlenmiştir ($p<0.01$). SİS+APO grubunda, SİS grubu ile kıyaslandığında MPO aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 15 C).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, SİS grubunda SOD aktivitesinde anlamlı düşüş ($p<0.01$) gözlenmiştir. SİS+APO grubunda, SİS grubu ile kıyaslandığında SOD aktivitesinde anlamlı yükselme ($p<0.05$) gözlenmiştir. (Şekil 15 D).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında SİS grubunda 8-OHdG aktivitesinde ($p<0.001$) anlamlı artış gözlenmiştir. SİS+APO grubunda, SİS grubu ile kıyaslandığında 8-OHdG aktivitesinin ($p<0.001$) anlamlı düştüğü görülmüş, ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında hala yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 15 E).



D**E**

Şekil 15: Deney gruplarında MDA (A), GSH (B) düzeyleri, MPO (C), SOD (D), 8-OHDg aktivite düzeyi (E). *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. + : $p<0.05$, ++ : $p<0.01$, +++ : $p<0.001$ SİS grubu ile kıyaslandığında.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda SİS'in testis dokusunda oluşturduğu hasar ve APO'nun olası koruyucu rolü histolojik, histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. SİS testislerde seminifer tübül hasarı, hücre proliferasyonunda düşüş, NOX2 ve TUNEL pozitif hücre sayısında artış, hücreler arası sıkı bağlantılarda bozulma ve spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde hasara yol açmıştır. Oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesinin yükselmesine, MPO aktivitesinin artmasına, SOD ve GSH düzeyinin düşüşüne ve oksidan DNA hasarı belirteci olan 8-OHDg aktivitesinin ise artmasına sebep olmuştur. APO'nun uygulamasının SİS'in meydana getirdiği tüm histolojik, histokimyasal ve biyokimyasal parametrelerdeki olumsuz etkilerini iyileştirdiği gözlenmiştir.

Kanser tedavisinde kemoterapötikler yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak başta nefrotoksisite olmak üzere birçok sistem üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Erkek genital sistemi de kemoterapötiklerden olumsuz yönde etkilenen sistemlerden biridir. Özellikle spermatogenezi olumsuz yönde etkileyerek doz ve kullanım süresine bağlı olarak geri dönüşümsüz azospermiye sebep olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Türk, 2013). En yaygın tek veya kombine kullanılan kemoterapötiklerden biri SİS'dir. SİS'in yan etkilerinden özellikle serbest oksijen radikallerinin oluşumu sorumlu tutulmakta ve bu toksisiteye karşı koruyucu yeni yaklaşımlar geliştirmek amacıyla antioksidan maddeler ile beraber kullanımına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır (Silici ve ark., 2009; Ateşşahin ve ark., 2006; Çiftçi ve ark., 2014; Tohamy ve ark., 2014 Amin ve ark., 2008).

SİS toksisitesinde mekanizma tam olarak anlaşılmış değildir, ancak hipoksi, serbest radikaller, inflamasyon ve apoptoz gibi çeşitli mekanizmaların dahil olduğu düşünülmektedir. SİS'in sperm toksisitesi, DNA hasarı ve kromatin anomalileri üzerine etki ettiği, süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri ve lipid peroksidasyonu oluşumuyla serbest radikallerin aşırı üretimine neden olarak doku hasarı oluşturduğu bilinmektedir (Yuluğ ve ark., 2013). SİS'in testis ağırlığını, seminifer tübül çapını ve alanını, spermatogenik seriyi ait hücreleri ve bu hücrelerin

proliferasyonunu azalttığını ve apoptozunu ise arttırdığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (Anand ve ark., 2014; Ateşşahin ve ark., 2006; Narayana ve ark., 2009).

SİS'in testis dokusundaki hasarın antioksidanlar ile azaltılabilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Kaya ve arkadaşları tek doz 7 mg/kg i.p. SİS uygulanmasının ardından 14 gün boyunca 50 mg/kg hesperidin uygulayarak SİS'in düşürdüğü sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu, artmış sperm anomalilerini ve oluşan histopatolojik hasarı önemli ölçüde düzelttiği gözlenmiştir. Bununla birlikte SİS uygulamasının düşürdüğü SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) düzeylerinin hesperidin uygulaması sonucu arttığını ve SİS'in yükselttiği MDA düzeyinin ise hesperidin uygulanan grupta anlamlı ölçüde düştüğü görülmüştür. (Kaya ve ark. 2014)

Başka bir çalışmada (Türk ve ark., 2008) tek doz 7 mg/kg i.p. SİS uygulamasının ardından 10 gün boyunca oral gavaj ile günde 10 mg/kg ellajik asit uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda SİS'in testis ağırlığını, epididimal sperm konsantrasyonunu ve motiliteyi azalttığını, sperm morfolojisinde anomalileri artırdığı ve bu değişikliklerin ellajik asit uygulanmasının ardından düzeldiği gözlenmiştir. SİS'in testis dokusunda ödem, nekroz ve dejenerasyon oluşturduğu, germinal hücre epitelinde incelmeye ve bazı seminifer tübüllerde spermatogenik aktivitede düşüş meydana getirdiği ve bu histopatolojik bulguların ellajik asit tedavisi ile kısmen geri döndüğü bildirilmiştir. Ayrıca SİS'in artırdığı MDA düzeyinin ellajik asit ile tekrar düştüğü ve azalmış GSH ve CAT aktivitesinin ise ellajik asit tedavisi ile arttığı görülmüştür.

Anand ve arkadaşları çalışmalarında SİS'in oluşturduğu testis hasarına karşı Eugenia jambolana ekstraktı (EJE) ve N-asetil sisteinin (NAC) koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Tek doz 5mg/kg i.p. SİS uygulanmasının ardından 25 mg/kg EJE veya 150 mg/kg NAC 7 gün boyunca uygulanmıştır. SİS grubunda FSH, LH ve testosteron seviyelerinde ciddi bozulmalar görülmekteyken EJE veya NAC uygulanmış gruplarda hormon düzeylerinin kontrole yaklaştığı gözlenmiştir. SİS'in değiştirdiği SOD, CAT ve GSH düzeylerinin EJE veya NAC uygulaması ardından

geri döndüğü gözlenmiştir. Ayrıca SİS'in germ hücreleri ve Leydig hücrelerinde apoptozu indüklediği ve EJE veya NAC uygulaması ile apoptotik hücrelerin azaldığı gösterilmiştir.(Anand ve ark. 2014)

İlbey ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tek doz 100 mg/kg siklofosfamid uygulanmasının ardından 5 gün boyunca 7 mg/kg SİS i.p. olarak uygulamışlardır. Siklofosfamid ve SİS ile aynı anda 10 mg/kg i.p. melatonin uygulanarak testis hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda deney hayvanlarının vücut ve testis ağırlıklarının, epididimal sperm konsantrasyonlarının, sperm motilite ve morfolojisi ile beraber GSH düzeylerinin hem siklofosfamid hem SİS gruplarında düştüğü görülmüştür. Buna karşın her iki grupta da MDA düzeyleri artmıştır. Melatonin uygulanmasının MDA düzeyini düşürdüğü ve GSH düzeyini ise arttırdığı görülmüştür. Siklofosfamid ve SİS gruplarında artmış düzensiz yapıdaki seminifer tübüllerin ve perivasküler fibrozis, seminifer epitelyum dökülmesi gibi histopatolojik değişikliklerin melatonin uygulaması ile önemli ölçüde önlendiği görülmüştür. (İlbey ve ark. 2002)

Bizim çalışmamızda da SİS uygulamasının regresif, dejeneratif ve atrofik tübül sayısının artmasına, spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde hasara sebep olduğu, sperm sayısında azalmaya, sperm morfolojisinde anomalilere yol açtığı ve apoptotik hücre sayısının arttığı gösterilmiştir.

Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır (McDorman ve ark., 2005). Modifiye bir baz olan 8- hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. ROS'un DNA'da yaptığı bu baz hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen 8-OHdG'dir. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen ROS veya ekzojen kaynaklı ROS tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir. OH radikali, guaninin 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluşturur. OH radikalının C-

8'e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali (C8-OH) bir elektron ve proton kaybederek 8- OHGua'e okside olur (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi, 2002; Yokuş ve Çakır, 2002). DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (McDorman ve ark., 2005). Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır (Helbock ve ark., 1999). Colaianna ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sosyal izolasyon stres model uygulamasının 8-OHDg düzeyini yükselttiği, APO uygulaması ile ise düştüğü gözlenmiştir (Colaianna ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda da SİS uygulaması 8-OHdG düzeyinin yükselmesine sebep olmuş, APO uygulaması ise 8-OHdG düzeyinin kontrol seviyesine inmesini sağlamıştır.

Kilerkaje ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 4 gün boyunca uygulanan 1,5 mg/kg bleomisin, 15 mg/kg etopozid ve 3 mg/kg SİS kombinasyonunun (BEP) oluşturduğu testis hasarına karşı α -tokoferol (100 mg/kg), l-askorbik asit (50 mg/kg), çinko (40 mg/l) ve selenyumdan (100 μ g/l) oluşan antioksidan karışımının olası koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Antioksidan karışımı ile tedavi BEP uygulanmasından 7 gün önce başlatılarak BEP uygulanmasının sonuna kadar sürdürülmüştür. BEP uygulanan grupta testis ağırlığının, sperm sayı ve konsantrasyonunun düştüğü, seminifer tübüllerde histopatolojik değişiklikler olduğu, bunun yanı sıra MDA düzeylerinin arttığı ve CAT, SOD ve GPx enzim düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir. Antioksidan karışımı uygulanan grupta testis ağırlığı ile birlikte sperm sayı ve konsantrasyonunun arttığı, seminifer tübül morfolojisinin normaleştiği görülmüştür. Antioksidan enzim seviyelerine bakıldığında kontrol seviyelerine geri döndüğü bildirilmiştir. Apoptotik hücreleri göstermek için TUNEL metodu uygulanmıştır, ayrıca apoptotik hücre belirteçleri olan p53, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin mRNA seviyelerine bakılmıştır. BEP grubunda çok sayıda seminifer tübülde 3 ve daha fazla TUNEL pozitif hücre varlığı görülmüştür. BEP grubunda p53 ve Bax'ın mRNA seviyeleri artmış, Bcl-2'nin mRNA seviyesi ise azalmıştır. Antioksidan karışımı uygulanan gruba ait kesitlerde seminifer tübüllerde TUNEL pozitif hücrelerin anlamlı olarak düştüğü, p53 ve Bax'ın mRNA seviyelerinin

azaldığı, Bcl-2 mRNA seviyesinin ise yükseldiği görülmüştür. (Kilerkaje ve ark., 2013)

Coşkun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada SİS toksisitesine karşı antioksidan olarak asetil-L-karnitin uygulayarak oluşan hasarı ve koruyucu etkileri incelemişlerdir. SİS (13 mg/kg, i.p.) uygulanarak testis hasarı oluşturulmuş, tedavi grubuna ise aynı dozda SİS uygulanmadan 30 dakika önce 200 mg/kg asetil-L-karnitin uygulanmıştır. Deney hayvanları SİS uygulandıktan sonra 72 saat sonra sakrifiye edilmişlerdir. SİS grubunda testis ağırlığında ve seminifer tübül çapında düşüş, seminifer tübüllerde dejeneratif görünüm, spermatogenik hücre serilerinde ayrılma, lümende hücre döküntüsü, sperm morfolojisinde anomaliler ve interstisyel ödem görülmüştür. Seminifer tübüllerde TUNEL pozitif hücrelerin ve aktif kaspaz-pozitif hücrelerin varlığında artış olduğu bildirilmiştir. SİS ile beraber asetil-L-karnitin uygulanmış grupta histopatolojik değişikliklerde iyileşmeler olduğu ve TUNEL pozitif hücreler ile kaspaz-pozitif hücrelerin sayısında anlamlı düşüş olduğu bildirilmiştir. (Coşkun ve ark., 2013)

Bizim çalışmamızda da yukarıdaki belirtilen çalışmalardakilerle benzer şekilde SİS uygulaması TUNEL pozitif hücrelerin sayısında artışa sebep olmuştur. APO uygulanan sitotoksosite grubunda ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının kontrol grubundan yüksek olmakla beraber SİS grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür. Oksidatif stres belirteçlerinde artışa paralel olarak apoptotik hücrelerde artış olduğu ve APO uygulaması ile oksidatif stresin azalmasına bağlı olarak apoptozun engellendiği düşünülmektedir.

APO güçlü bir NOX2 inhibitörüdür. Daha önceki çalışmalar ROS'un esas kaynağının NOX2 olduğunu göstermektedir, çünkü aktive olmuş NOX2, elektronları oksijene taşıyarak superoksid radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) oluşumuna sebep olur (Connell ve ark., 2011; Bedard ve ark., 2007). Bu enzimin inhibe olması oksidatif hasara karşı organların korunmasında rol oynayabilir. Hipoksi ile indüklenmiş testis hasarında NOX2 aktivasyonunun arttığı, MDA düzeyinin yükseldiği, GSH peroksidaz seviyesinin düştüğü görülmüştür. APO uygulamasının ise bu değerleri kontrol seviyesine getirdiği gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2007). Ayrıca, APO'nun NOX2

oluşumunun inhibisyonu üzerinden ROS oluşumunu inhibe eder, bunun yanısıra, g-glutamil sistein sentetaz enzimini de stimüle eder, bu enzimin de GSH sentezi üzerine etkisi vardır (Lapperre ve ark., 1999). İskemi reperfüzyon ile indüklenmiş testis hasarında MDA düzeyinin, total oksidatif kapasitenin ve oksidatif stres indeksinin yükseldiği SOD, GSH ve GSH peroksidaz aktivitesinin düştüğü, histolojik hasar meydana getirdiği gösterilmiştir, APO uygulamasının ise bu oksidatif stres parametrelerini ve histolojik hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir (Ozbek ve ark., 2014). Bu çalışmada da SİS ile oluşmuş ROS seviyesindeki artış APO uygulaması ile düşmüştür. SİS uygulaması ile artan NOX2 pozitif hücre sayısının APO uygulaması ile düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca SİS uygulaması ile testis dokusunda GSH seviyesinin düştüğü ancak APO uygulaması ile GSH seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar, APO'nun oksidan hasarı oluşumunu engellediğini ve antioksidanların sürekliliğinde önemli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara ek olarak elektron mikroskopik incelemelerde SİS uygulamasının hücreler arası alanlarda açılmaları, bazal laminada lümene doğru parmaklı uzantıların oluşmasına sebep olduğu, APO uygulaması ile de ultrastrüktürel hasarın gerilediği gözlenmiştir. Hücre içi oksidan hasarın artmasına paralel olarak hücre ve doku ince yapısının da bozulduğu gözlenmiştir.

Daha önce SİS uygulanmış sıçanların testisinde enflamatuvar cevabın serbest radikal oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Amin ve ark., 2012). Zararlı stimülasyondan sonra aktive olan nötrofillerde, oksijen metabolitlerinin oluşumu ile birlikte MPO gibi sitotoksik enzimler de aktive olur (Reiter ve ark., 2001). Ayrıca iskemi/reperfüzyon ile indüklenmiş testis hasarında da benzer şekilde MPO seviyesinde artış olduğu gösterilmiş, APO uygulaması ile MPO seviyesinin düştüğü gösterilmiştir. (Şener ve ark., 2014). Bu çalışmada da APO'nun antienflamatuvar ve antioksidan mekanizmaları aktive ederek testis hasarını iyileştirdiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, SİS uygulaması seminifer tübüllerde, spermatogenik hücre sırasında azalmaya, hücreler arası sıkı bağlantılarda açılmaya, hem Sertoli hem de spermatogenik seriye ait hücrelerin sitoplazmasında vaküol oluşumunun artmasına, sperm sayısında azalmaya, sperm morfolojisinde anomalilere, epididimis dokusunda enflamatuvar hücre infiltrasyonuna, testiste NOX2 ve TUNEL pozitif hücre sayısında artışa, spermatogenik seriye ait hücrelerde proliferasyonun düşmesine, MDA, 8-OHDg düzeyinin ve MPO aktivitesinin yükselmesine, GSH ile SOD düzeyinin ise düşmesine sebep olmuştur. SİS uygulaması ile artan oksidatif stresin, azalan endojen antioksidan seviyesinin, apoptozun, hücre hasarının ve proliferatif hücre sayısının, APO uygulaması ile NOX2 aktivasyonunu engelleyerek, antioksidan GSH ve SOD restorasyonunu sağlayarak ve oksidatif stres ile ilişkili nötrofil inhibisyonunu engelleyerek testis dokusunu koruduğu gözlenmiştir.

Ayrıca

didimal kanalda sperm artımına ve morfolojik anomalide düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Düşük toksisitesi ve bilinen yan etkilerinin olmaması nedeniyle (Stefanskave ark., 2008) APO , SİS'in oluşturduğu hasardan testis dokusunu koruyucu ajan olarak kullanılabilir. SİS'in neden olduğu testis hasarının önlenmesi amaçlandığına göre tedaviye antioksidan katılması sonuçların daha başarılı olmasını sağlayacaktır. Yapılan çalışmalar ve çalışmamızın sonuçları doğrultusunda SİS'in APO ile birlikte kullanılmasının, SİS'e bağlı olarak gelişen testis hasarında serbest radikaller aracılığı ile meydana gelen yapısal ve oksidatif hasarı önleyerek, ilaca bağlı gelişen infertiliteyi önleyebileceği düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

Ahmad A, Mondello S, Di Paola R, Mazzon E, Esposito E, Catania MA, et al. Protective effect of apocynin, a NADPH-oxidase inhibitor, against contrast-induced nephropathy in the diabetic rats: a comparison with n-acetylcysteine. *Eur J Pharmacol* 2012;674:397-406

Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*.1. baskı: 1995, 1-15.

Amin A, Abraham C, Hamza AA, Abdalla ZA, Al-Shamsi SB, Harethi SS, Daoud S. A standardized extract of Ginkgo biloba neutralizes cisplatin-mediated reproductive toxicity in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:362049.

Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl*. 2008;10: 291-7.

Anand H, Misro MM, Sharma SB, Prakash S. Protective effects of Eugenia jambolana extract versus N-acetyl cysteine against cisplatin-induced damage in rat testis. *Andrologia*. 2014;47(2): 194-208.

Anthony L. Mesher. Junquera's Basic Histology. Çeviren: Seyhun Solakoğlu, Aslı Erdoğan, Hasan Serdar Mutlu. Junquera's Temel histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015, s.407-422.

Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod. Toxicol*. 2006;21(1): 42-7.

Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, et al. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(2):156–165.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87:245–313.

Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymol*. 1978;52:302-311.

Beutler E. Glutathione in red blood cell metabolism. *A Manual of Biochemical Methods*, New York, Grune & Stratton, 1975, p. 112-114.

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*. 2014;46(10): 1161-8.

Colaiana M, Schiavone S, Zotti M, Tucci P, Morgese MG, Bäckdahl L, Holmdahl R, Krause KH, Cuomo V, Trabace L. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal*. 2013 20;18(12):1385-99.

Connell BJ, Saleh MC, Khan BV, et al. Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. *Food Chem. Toxicol*. 2011;49:3063–9.

Coşkun N, Hatipoğlu MT, Ozoğul C, Korkmaz C, Akyol SN, Mıcılı SC, Arık GS, Erdoğan D. The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced by Cisplatin in rats. *Balkan Med J*. 2013;30(2): 235-41.

Daryosh M, Abedelahi A, Rasthbar M. Protective Role of GnRH Antagonist on Chemotherapy-induced Spermatogenesis Disorder: A Morphological Study. *Adv Pharm Bull*. 2013;3(2): 323–328.

De Martinis BS, De Lourdes Pires Bianchi M (2002). Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. *Pharmacol Res.* 46 (2): 129-31.

Erkanlı Şentürk G, Ersoy Çanilloğlu Y, Umay C, Demiralp-Eksioglu E, and Ercan F. Distribution of Zonula Occludens-1 and Occludin and alterations of testicular morphology after in utero radiation and postnatal hyperthermia in rats. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(6): 438-49.

Guo-Lin Z, De-Zai D, Can Z, Yin D. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3 β -HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. *Reprod Toxicol.* 36 (2013) 60– 70

Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* 300, 156-66.

Hess RA, Linder RE, Strader LF, Perreault SD. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat II. Quantitative and Qualitative Histopathology of the Testis. *J Androl.* 1988;9: 327–342.

Hillegass LM, Griswold DE, Brickson B, Albrightson-Winslow C. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Meth.* 1990;24: 285-295.

Hougee S, Hartog A, Sanders A, et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;531(1–3):264–269.

İlbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril*. 2009;92(3): 1124-32.

Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*. 2002;9(3):191–203.

Kaya K, Ciftci O, Cetin A, Doğan H, Başak N. Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats. *Andrologia*. 2014;13: 1011.

Kayaalp O. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 8. Baskı. Güneş Kitabevi; Ankara, 1998; s:376-390.

Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji*. 5. Baskı. Güneş Kitabevi; Ankara, 1994, s: 1047.

Kelland L. The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7: 573-584.

Kılarkaje N, Mousa AM, Al-Bader MM, Khan KM. Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. *Fertil Steril*. 2013;100(4): 1151-9.

Lafeber FPJG, Beukelman CJ, van den Worm E, et al. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 1999;38(11):1088–1093.

Lapperre TS, Jimenez LA, Antonicelli F, et al. Apocynin increases glutathione synthesis and activates AP-1 in alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1999; 422 443:235–9.

Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem*. 2008;56(2):301–306.

Li M, Liu Z, Zhuan L, Wang T, Guo S, Wang S, Liu J, Ye Z. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Mol Med Rep*. 2013 Jan;7(1):47-52.

Mccord JM. Human Disease, Free Radicals And The Oxidant/Antioxidant Balance. *J Clin Biochem*. 1993;26: 351-357.

McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in long-evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chem Biol Interact*, (2005) 152 (2-3): 107-17.

Mohammadnejad D, Abedelahi A, Rashtbar M. Protective Role of GnRH Antagonist on Chemotherapy-induced Spermatogenesis Disorder: A Morphological Study *Adv Pharm Bull*. 2013;3(2): 323-8.

Moore K, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* Çeviren: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H. İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara; 2002, s:323-333.

Muijsers RBR, van den Worm E, Folkerts G, et al. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *Br J Pharmacol* 2000;130(4):932–936.

Müller AA, Reiter SA, Heider KG, Wagner H. Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. *Planta Medica*.1999;65(7):590–594.

Myloie AA, Collins H, UmblesC, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;82: 512–20

Narayana K, Verghese S, Jacob SS. L-Ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy-induced testis damage and oligo-astheno-teratospermia in a mouse model. *Exp Toxicol Pathol*. 2009;61(6): 553-63

Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy OA. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*. 2004;195: 221-230.

Ozbek O, Altintas R, Polat A, Vardi N, Parlakpınar H, Sagır M, Duran ZR, Yıldız A. The protective effect of apocynin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol*. 2015 Apr;193(4):1417-22. doi: 10.1016/j.juro.2014.11.086.

Park JM. Normal Development of the Urogenital System. *Campbell-Walsh Urology*, 9th ed. Washington DC: Saunders; 2007, p. 657-684.

Peters EA, Hiltermann JTN, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(11):1442–1447.

Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11): 1439–1452.

Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, et al. Free radical-mediated molecular damage. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:200–15.

Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin

abnormality by selenium nano-particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;266(3): 356-65.

Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol*. 2014; 191(5):1578-84.

Ross HM, Pawlina JL. *Histology: a text and atlas*. Çeviren: Baykal B. *Histoloji Honu Anlatımı ve Atlas*. 6. Basım. Palme Yayıncılık, İstanbul; 2014, s.603-625.

Salem EA, Salem NA, Maarouf AM, Serefoglu EC, Hellstrom WJ. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology*. 2012;79(5): 1184.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* 2008; 2008:106507.

Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology*. 2009;74(3): 545-51.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec JL. Free radicals and antioxidant systems in health and diseases. *British J Hosp Med*. 1990;43: 334-344.

Simons JM, 't Hart BA, Ip Vai Ching TRAM, Van Dijk H, Labadie RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(3):251–258.

Smit HF, Kroes BH, van den Berg AJJ, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *J Ethnopharmacol*. 2000;73(1-2):101–109.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* 2008;2008:106507

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(1):95–102.

Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;451: 203–8.

Şener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, Keyer-Uysal M. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol.* 2000; 14(6): 553-60.

Şener TE, Yüksel M, Özyılmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Şimşek F, Şener G. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2014.11.033

't Hart BA, Copray S, Philippens I. Apocynin, a low molecular oral treatment for neurodegenerative disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:298020.

Tohamy AA, Abdella EM, Ahmed RR, Ahmed YK. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology.* 2014;66(2): 283-97.

Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharm J.* 2013;17: 73-92.

Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Ceribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril.* 2008;89(5): 1474-81.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1): 1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1): 44-84.

Yokuş B, Çakır DÜ (2002). İn vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *T Klin J Med Sci*, 22, 535-543.

Yuluğ E, Turedi S, Alver A, Turedi S, Kahraman C. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity DNA damage and chromatin abnormality by selenium nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;266(3): 356-365.

Zhao YM, Gao LP, Zhang HL, Guo JX, Guo PP. Grape seed proanthocyanidin extract prevents DDP-induced testicular toxicity in rats. *Food Funct.* 2014;5(3): 605-11.

Zhang GL, Dai DZ, Zhang C, Dai Y. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3 β -HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. *Reprod Toxicol.* 2013 Apr;36:60-70.

Wright NA. Cell proliferation in carcinogenesis. In: *The Cancer Handbook*. Nature Publishing Group, London. 2002, pp. 114-25.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Mustafa Kutay	Soyadı	Köroğlu
Doğum Yeri	Karabük	Doğum Tarihi	03.09.1988
Uyruğu	T.C	Tel	05063518241
E-mail	kutaykoroglu@hotmail.com	Adres	Hasırcıbaşı cad. Tevfikgelenbe sok. Şenay apt. No:11 D:2 Kadıköy/ İstanbul

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	50. Yıl Tahrir Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Laborant	Kadıköy Şifa Hastanesi Biyokimya Lab.	2012-2013
Androloji Labratuvar Sorumlusu	Kadıköy Şifa Hastanesi IVF Lab.	2013-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu ☐

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,987	71,418	68,663
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

KURSLAR

1. Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşım, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, DEHAMER, 2013

PROJELER

1. Sisplatin ile Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Aposininin Olası İyileştirici Etkisinin Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi
Destekleyen kurum: Marmara Üniversitesi, BAPKO, 2015

KATILDIĞI KONGRELER

1. 2. Uluslararası Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi Türkiye, Antalya 23-25 Eylül 2011
2. 18th International Microscopy Congress (IMC 2014) Prag, Çek Cumhuriyeti, 07-12 Eylül 2014.
3. 22nd National Electron Microscopy Congress (EMK 2015), Istanbul, Turkey, 02-03 Eylül 2015.

ULUSLARASI KONGRE BİLDİRİLERİ

1. Macit Ç., Çadırcı S., **Köroğlu M.K.**, Ercan F., Şener G. Protective effects of exercise and caloric restriction on cardiovascular system in aged rats: Morphological and biochemical. Poster Sunumu, 18th International Microscopy Congress (IMC 2014) Prag, Çek Cumhuriyeti, 07-12 Eylül 2014.
2. Çadırcı S., **Köroğlu M.K.**, Ercan F., Şener G. Protective Effects of Quercetin in Cisplatin Induced Urinary Bladder Damage in Rats. Poster Sunumu, 18th International Microscopy Congress (IMC 2014) Prag, Çek Cumhuriyeti, 07-12 Eylül 2014.

ULUSAL KONGRE BİLDİRİLERİ

1. **Köroğlu M.K.**, Çevik Ö., Şener G., Ercan F. Sisplatin ile Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Aposininin Olası İyileştirici Etkisinin Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi. Poster Sunumu, 22nd National Electron Microscopy Congress (EMK 2015), Istanbul, Turkey, 02-03 Eylül 2015.

10. ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	84.2014.mar	Çalışma: Yüksek lisans tezi	
	PROJE ADI	Sisplatin ile oluşturulan testis hasarına karşı aposininin olası iyileştirici etkisinin morfolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr. Feriha ERCAN		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER- M.Ü Histoloji ve Embriyoloji ABD laboratuvarı		
	DESTEKLEYİCİ	BAPKO		

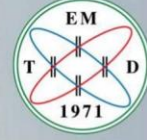
KARAR BİLGİLERİ	Tarih <u>26.11.2014</u>
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI					
Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.					
ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeligi	Onaylanan Proje ile ilişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	Var Yok	Evet Hayır	Araştırmacı
Prof.Dr. İnci ALİCAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	Var Yok	Evet Hayır	<i>Gün</i>
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	<i>Saul</i>
Doç.Dr. Rezzan AKER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	Var Yok	EVET HAYIR	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	Var Yok	Evet Hayır	<i>Gürkan</i>
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	Var Yok	Evet Hayır	<i>Dilek</i>
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	



Sabancı
Üniversitesi

SU|NUM



22. Elektron Mikroskopi Kongresi
22nd Electron Microscopy Congress

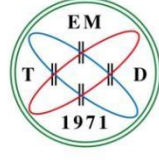
EMK 2015

BİLDİRİ ÖZETLERİ KİTABI

ABSTRACT BOOK

02-04 Eylül/September 2015

emk2015.sabanciuniv.edu



Sayın Mustafa Kutay Köroğlu,

02-04 Eylül 2015 tarihleri arasında Sabancı Üniversitesi Kampüsü'nde gerçekleştirilecek olan 22. Elektron Mikroskopi (EMK 2015) kongresine başvuru yaptığınız ID: 120 numaralı bildiri özetiniz kongrenin içeriğine uygun bulunup **poster sunumu** olarak kabul edilmiştir. Bilimsel programı <http://emk2015.sabanciuniv.edu/tr> kongre sitesinden takip edebilirsiniz.

EMK 2015 Organizasyon Komitesi Adına,

Dr. Feray Bakan

Sabancı University Nanotechnology Research and Application Center
Orhanlı, Tuzla
34956 Istanbul Turkey

Phone: +90 216 4839000-2406
Fax: +90 216 4839550
E-mail: feraybakan@sabanciuniv.edu

Sisplatin ile Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Aposininin Olası İyileştirici Etkisi: Morfolojik ve Biyokimyasal Değerlendirme

M.K. Köroğlu¹, F. Ercan¹, Ö. Çevik² ve G. Şener³

1 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AbD, İstanbul, Türkiye, kutaykoroglu@hotmail.com

2 Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AbD, ocevik@cumhuriyet.edu.tr

3 Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD, İstanbul, Türkiye, gsener@marmara.edu.tr

Sisplatin çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik bir ajandır [1]. Sisplatin metabolizması sırasında oluşan reaktif oksijen metabolitleri gerek kan gerekse doku harabiyetine neden olmaktadır [2]. Sisplatinin testis toksisitesinde serbest radikallerin hasardaki rolü nedeniyle, antioksidan ajanlarla koruyucu tedavi protokolleri araştırılmaya devam etmektedir. Aposinin (4-hydroxy-3methoxy-acetophenone), doğal yolla metoksi ile yer değiştirmiş katekol meydana getiren, iyi bilinen bir NADPH oksidase (NOX) inhibitörüdür. Aposininin antioksidan aktivitesi sonucunda serumdaki testosteron seviyesini arttırdığı ve testisteki morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri engellemeye çalıştığı bildirilmiştir [3]. Bu çalışmada sisplatin ile oluşturulmuş testis hasarına karşı aposininin olası koruyucu rolü ışık ve elektron mikroskopik düzeyde morfolojik olarak ve oksidatif stres belirteçleri biyokimyasal olarak incelenmiştir. Sprague Dawley yetişkin erkek sıçanlar (n= 8) kullanılmıştır. Dört deney grubu oluşturulmuştur: 1) Kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara sadece çözücü ajan, dimetilsülfoksit (DMSO) verilmiştir. 2) Aposinin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara sadece aposinin (10 mg/kg) uygulanmıştır. 3) Sisplatin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara tek doz 7mg/kg sisplatin i.p uygulanmış ve 5 gün boyunca DMSO verilmiştir. 4) Sisplatin + aposinin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara tek doz 7mg/kg sisplatin i.p uygulanmasından sonra 5 gün boyunca eter anestezisi altında oral olarak gavaj ile 10 mg/kg aposinin uygulanmıştır. Dekapitasyon ile sıçanlar öldürüldükten sonra, ayrılan testis dokuları histopatolojik ve ince yapısal değişiklikleri inceleme, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü değerlendirmesi için hazırlanmıştır. Malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), glutatyon (GSH), süperoksitdismutaz (SOD) ve oksidan DNA hasarı için 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHDg)

düzeylerine biyokimyasal teknikler ile bakılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmiştir. Sisplatin uygulanan grupta dejeneratif tübül sayısında ve apoptotik indekste artış, proliferatif indekste ise azalma gözlenmiştir. Sisplatin + aposinin uygulanan grupta ise dejeneratif tübül sayısı ve apoptotik indeks düşmüş, proliferatif indeks ise yükselmiştir. Sisplatin grubunda MDA düzeyi, MPO ve 8-OHDg aktivitesi artmış, GSH ve SOD düzeyi ise düşmüştür. Sisplatin + aposinin grubunda ise MDA düzeyi, MPO ve 8-OHDg aktivetelerinde düşüş, GSH ve SOD düzeylerinde ise artış gözlenmiştir. Sonuç olarak sisplatinin oksidatif stres oluşturarak testiste hasar meydana getirdiği, seminifer tübüllerde spermatogenik hücre serilerinde azalmaya yol açtığı, spermatogenik hücrelerde apoptozu arttırdığı ve aposininin ise antioksidan etkileri ile oluşan hasarı önlediği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: testis, sisplatin, aposinin, apoptoz, hücre proliferasyonu

Teşekkür: Bu çalışma Marmara Üniversitesi, BAPKO (SAG-C-YLP- 110215-0022) tarafından desteklenmiştir.

Referanslar

- [1] Osanto S, Bukman A, Van Hoek F, Sterk PJ, De Laat JA, Hermans J. Longterm effects of chemotherapy in patients with testicular cancer. J Clin Oncol.;10(4):574–9, 1992.
- [2] Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol.;72(11):1439–1452, 2006
- [3] Guo-Lin Z, De-Zai D, Can Z, Yin D. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3β-HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. Reproductive Toxicology 36: 60– 70, 2013