



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN SIÇAN TESTİS HASARI
ÜZERİNE BAİCALİNİN OLASI İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

GÜLSEREN ALTAY AZNAVUR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ESİN AK
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN SIÇAN TESTİS HASARI
ÜZERİNE BAİCALİNİN OLASI İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

GÜLSEREN ALTAY AZNAVUR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ESİN AK
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gülseren Altay Aznavur

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışması sürecimde her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm bilgisini ve zamanını hiçbir zaman benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Esin AK'a ve bilgi ve tecrübesinden hep faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Feriha ERCAN'a,

Tez deneylerimin biyokimyasal aşamalarında her türlü desteği ve bilgisini paylaşan hocam sayın Doç. Dr. Nihal Şehkar OKTAY'a,

Tez çalışmam boyunca ihtiyaç duyduğum anlarda deneysel malzemelerini benimle paylaşarak destek olan ve lisansüstü eğitim sürecimde deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Serap ŞİRVANCI, Prof. Dr. Dilek AKAKIN ve Prof. Dr. Şule Çetinel'e

Çalışmalarım sırasında laboratuvarını açarak desteğini esirgemeyen Prof.Dr.Canan HÜRDAĞ'a ve deneylerimi yaparken zamanını ayırıp bana yardım eden ve doktora eğitimi sürecimde de desteğini hep yanımda hissettiğim çok kıymetli meslektaşım Sezen Gizem AYDOĞAN'a, lisansüstü eğitimde birlikte bu yolda yürüdüğümüz her zaman her konudaki kararlarımda bana destek olan çok sevgili arkadaşım Damla ANIL ÇELEBİ ve BEDİA KARAKAYA'ya,

Lisansüstü eğitimimde histolojiye adım attığım andan itibaren tecrübesiyle ve samimiyetiyle yanımda olan kıdemlim ve meslektaşım Arş.Gör.Nurdan BÜLBÜL AYCI'ya ve bir dönem birlikte aynı odayı paylaştığım desteğini hep yanımda hissettiğim çok kıymetli arkadaşım Uzman Doktor Gizem SUCU'ya,

Bölümümüze yeni katılan, makale ve tez yazım sürecimde ve geldikleri günden itibaren bana manevi destek veren ve ne zaman yardım istesem desteklerini esirgemeyen çok değerli uzmanlık öğrencilerimiz Dr. Nur ÖZKEÇECİ, Dr. Barış UYANIK, Dr. Yasemin CESUR, Dr. Menekşe EMET, Dr. Hilal ÜNLÜ, Dr. Rana BİLGİN TAŞDEMİR, Dr. Rumeysa ÇELEBİ, Dr. Ahmet Furkan OZAN'a, bölümümüzün teknisyenlerinden Belgin TERZİ ve Emre AKMAN'a,

Eğitim hayatım boyunca fedakarlıklarıyla maddi ve manevi her türlü özveriyle beni bugünlere getiren her konuda arkamda olan annem Emine ALTAY'a ve babam Ata ALTAY'a, varlıklarıyla bana güç veren canım anneannem Ayten KORKMAZ ve dedem Cengiz KORKMAZ'a,

Ve her türlü nazımı çeken hayat arkadaşım çok sevgili eşim Mustafa AZNAVUR'a

EN İÇTEN DUYGULARIMLA TEŞEKKÜR EDİYORUM.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından "Siklofosfamid ile oluşturulan sıçan testis hasarı üzerine baicalinin olası iyileştirici etkisinin incelenmesi" başlıklı ve TDK-2022-10413 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
TABLO LİSTESİ.....	vi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Testis Embriyolojisi	5
4.2. Testis Histolojisi.....	7
4.3. Oksidatif Stres	15
4.3.1. Oksidatif stres ve erkek infertilitesi	16
4.4. Antikanser İlaçlar	17
4.4.1. Antikanser ilaçlar ve oksidatif stres	19
4.5. Siklofosfamid	20
4.6. Baicalin.....	22
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Kullanılan Kimyasallar	25
5.2. Deney Hayvanları.....	26
5.3. Deney Grupları.....	26
5.4. Histolojik Analizler	27
5.4.1. Sperm sayımı ve morfolojisi.....	27
5.4.2. Işık mikroskopik preparasyon ve histolojik skorum	27
5.4.3. TUNEL yöntemi	28
5.4.4. PCNA immünohistokimyası	29
5.5. Biyokimyasal Analizler.....	30
5.5.1. Testis dokusunda biyokimyasal analizler	30
5.5.1.1. Doku süperoksid dismutaz aktivitesinin ölçümü.....	30
5.5.1.2. Doku katalaz seviyesinin ölçümü	31
5.5.1.3. Doku glutatyon-s-transferaz aktivitesinin ölçümü	32
5.5.1.4. Doku glutatyon seviyesinin ölçümü	33
5.5.1.5. Doku malondialdehit seviyesinin ölçümü	34
5.5.1.6. Doku total oksidan seviyesi tayini.....	35
5.5.1.7. Doku total antioksidan kapasitesi tayini	36
5.5.1.8. Oksidatif stres indeksi	38
5.5.1.9. Doku siyalik asit tayini	38
5.5.2. Serumda biyokimyasal analizler	40
5.5.2.1. Serumda testosteron, LH ve FSH ölçümü	40
5.6. İstatistiksel Analiz	40

6. BULGULAR	41
6.1. Vücut Ağırlığı Bulguları	41
6.2. Testis Ağırlığı Bulguları.....	41
6.3. Sperm Sayımı ve Morfolojik Değerlendirmesi	42
6.4. Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı, Alanı ve Çapı.....	46
6.5. Morfolojik Bulgular	48
6.6. Seminifer Tübüllerdeki Hasarın Histopatolojik Skor Bulguları	55
6.7. TUNEL Bulguları.....	55
6.8. PCNA İmmunhistokimyası Bulguları	60
6.9. Biyokimyasal Bulgular.....	64
6.9.1. Testiküler SOD aktivitesi bulguları	64
6.9.2. Testiküler CAT aktivitesi bulguları.....	64
6.9.3. Testiküler GST aktivitesi bulguları	65
6.9.4. Testiküler Glutasyon bulguları	66
6.9.5. Testiküler MDA bulguları.....	66
6.9.6. Testiküler TOS, TAC ve OSI bulguları	67
6.9.7. Testiküler SA bulguları	68
6.9.8. Serum testosteron, LH ve FSH bulguları	68
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
8. KAYNAKLAR.....	78
9. ÖZGEÇMİŞ	94
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	94
11.EKLER	95

KISALTMALAR LİSTESİ

- CAT: Katalaz
- CP: Siklofosfamid
- DAB: 3,3'-Diaminobenzidin
- DMSO: Dimetilsülfoksit
- FSH: Folikül stimule edici hormon
- GPX: Glutasyon peroksidaz
- GSH: Glutasyon
- GST: Glutasyon-S-transferaz
- H&E: Hematoksilen Eozin
- LH: Luteinleştirici hormon
- MDA: Malondialdehit
- MPP: 1-methyl-4-phenylpyridinium
- MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
- NLRP3: Leucine-rich repeat and pyrin domain containing 3
- Nrf2: Nuclear-factor-E2-related factor 2
- OSI: Oksidatif stres indeksi
- PAS: Periyodik Asit Schiff
- PBS: Phosphate-buffered saline
- PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
- PLZF: Promyelocytic leukemia zinc finger
- SA: Siyalik asit
- SOD: Süperoksit Dismutaz

- SRY : Sex determining region-Y
- TAC: Total antioksidan kapasitesi
- TCA: Activities of tricarboxylic acid
- TDF: Testis-belirleyici faktör
- TOS: Total oksidan seviyesi
- TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Erkek cinsiyet gelişiminin şematik diyagramı ve gelişen üreme organları üzerindeki hormonal etkisi	6
Şekil 2 : İnsan testisinin sagital kesiti	7
Şekil 3. İnsan testisinin fotomikrografları	8
Şekil 4. İnsan seminifer epitelin şematik çizimi.....	10
Şekil 5. Testisteki seminifer tübüllerin ışık mikrografı.....	11
Şekil 6. Germ hücrelerinin klonal özelliği	12
Şekil 7. İnsanda spermiyogenezin şematik diyagramı	14
Şekil 8. Bir insan spermatozoonunun diyagramı	15
Şekil 9. Alkilleyici ajanların yapısı	18
Şekil 10. Siklofosfamidin metabolik yolu.....	21
Şekil 11. Baicalin ve aglikonu baicalein	23
Şekil 12. Deney gruplarında sıçan vücut ağırlığındaki değişim yüzdesi.	41
Şekil 13. Deney gruplarındaki sıçanların sağ testis ağırlığı	42
Şekil 14. Deney gruplarındaki sıçanların sperm sayıları.....	42
Şekil 15. Deney gruplarının spermatozoalarında morfolojik hasar oranı	43
Şekil 16. Kontrol ve baicalin gruplarına ait Eozin Y ile boyalı spermatozoaların temsili ışık mikrografları.....	44
Şekil 17. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait Eozin Y ile boyalı spermatozoaların temsili ışık mikrografları.....	45
Şekil 18. Deney gruplarındaki sıçanlara ait seminifer tübül epitel kalınlığı.....	46
Şekil 19. Deney gruplarına ait seminifer tübül alanı.....	47
Şekil 20. Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı.....	47
Şekil 21. Kontrol ve baicalin gruplarına ait H&E ile boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları.....	49
Şekil 22. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait H&E ile boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları.....	50
Şekil 23. Kontrol ve baicalin gruplarına ait PAS ile boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları.....	51
Şekil 24. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait PAS ile boyalı testis kesitlerin temsili ışık mikrografları.....	52
Şekil 25. Testis dokusunun kontrol ve baicalin gruplarına ait Masson Trikrom boyası ile boyanmış temsili ışık mikrografları.....	53

Şekil 26. Testis dokusunun CP ve CP+Baicalin gruplarına ait Masson Trikrom boyası ile boyanmış temsili ışık mikrografları.....	54
Şekil 27. Deney gruplarına ait Johnsen histopatolojik skor	55
Şekil 28. Deney gruplarındaki apoptotik indeks	56
Şekil 29. Kontrol ve baicalin gruplarına ait TUNEL boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları.....	57
Şekil 30. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait TUNEL boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları.....	58
Şekil 31. Pozitif kontrole ait TUNEL boyalı doku kesitinin temsili ışık mikrografı.....	59
Şekil 32. Deney gruplarındaki proliferasyon indeksi.....	60
Şekil 33. Kontrol ve baicalin gruplarına ait immünohistokimyasal metod ile PCNA boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları	61
Şekil 34. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait immünohistokimyasal metod ile PCNA boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları.	62
Şekil 35. Pozitif ve negatif kontrole ait kesitlerin temsili ışık mikrografları.....	63
Şekil 36. Deney gruplarının testis dokularında SOD aktivitesi.	64
Şekil 37. Deney gruplarının testis dokularında CAT aktivitesi.	65
Şekil 38. Deney gruplarının testis dokularında GST aktivitesi.	65
Şekil 39. Deney gruplarının testis dokularında GSH seviyesi.	66
Şekil 40. Deney gruplarının testis dokularında MDA seviyesi.	67
Şekil 41. Deney gruplarının testis dokusunda TOS (A), TAC (B) ve OSI (C) seviyeleri.	67
Şekil 42. Deney gruplarının testis dokularında SA seviyesi.	68
Şekil 43. Deney gruplarında testosteron (A), lüteinizan hormon (B) ve folikül uyarıcı hormon (C) seviyeleri	69

TABLO LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Tablo 1. Modifiye edilmiş Johnsen'ın Skarlama Parametreleri	28
Tablo 2. SOD aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler	31
Tablo 3. CAT aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler	32
Tablo 4. GST aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler	33
Tablo 5. GSH seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler	34
Tablo 6. MDA seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler	35
Tablo 7. TOS seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler	36
Tablo 8. TAC seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler	37
Tablo 9. Sialik asit seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler.....	39

1. ÖZET

Tezin başlığı : Siklofosfamid ile Oluşturulan Sıçan Testis Hasarı Üzerine Baicalinin Olası İyileştirici Etkisinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı Soyadı : Gülseren Altay Aznavur

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. Esin Ak

Programın Adı : Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı

Amaç: Bu çalışmanın amacı, siklofosfamid (CP) uygulanan sıçanlarda oluşan testis hasarı üzerinde baicalinin etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Yirmi sekiz Wistar albino sıçan kontrol, baicalin, CP ve CP+Baicalin gruplarına ayrıldı. CP ve CP+Baicalin gruplarında tek doz CP (200 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak indüklendi. Baicalin (100 mg/kg/gün, i.p.), baicalin ve CP+Baicalin gruplarına 6 gün boyunca uygulandı. Testis dokusu genel morfoloji, proliferatif ve apoptotik hücreler açısından incelendi. Testis dokusundaki oksidatif stres parametreleri ve serumdaki hormon seviyeleri biyokimyasal analizlerle incelendi. Sperm analizi epididimden elde edilen yayma örnekleri üzerinde yapıldı.

Bulgular: CP grubunda, anormal spermatozoa sayısında artış ve seminifer tübüllerde dejenerasyon gözlemlendi. Bu seminifer tübüllerde ayrıca apoptotik hücrelerde artış ve proliferatif hücrelerde de azalma tespit edildi. CP grubunda testis dokusunda malondialdehit seviyesinin, toplam oksidan durumunun ve oksidatif stres indeksinde artışın yanı sıra glutatyon ve toplam antioksidan kapasite seviyelerinde ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon s-transferaz (GST) aktivitelerinde azalma saptandı. Ayrıca, serum folikül uyarıcı hormon, lüteinizan hormon ve testosteron seviyelerinde bir azalma tespit edildi. CP + Baicalin grubunda ise GST aktivitesi hariç tüm bu histolojik ve biyokimyasal parametrelerde bir iyileşme görüldü.

Sonuç: CP'nin hormonal ve oksidan/antioksidan dengeyi bozarak, proliferatif indeksi azaltarak ve apoptozu artırarak testis hasarına sebep olduğu görüldü. Baicalin, muhtemelen antioksidan özelliği nedeniyle oksidatif stresi inhibe ederek CP kaynaklı testis hasarını hafifletmektedir. Baicalin'in CP'nin neden olduğu testis hasarına karşı önerilen faydalı etkileri göz önüne alındığında, kemoterapiye bağlı erkek infertilitesi için umut verici bir ajan olma potansiyeline sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, baicalin, testis, histoloji, oksidatif stres

2. SUMMARY

Title of Thesis : Investigation of the Ameliorative Effect of Baicalin on Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage in Rats

Student Name, Surname : Gülseren Altay Aznavur

Supervisor Name : Associate Professor Esin Ak

Program Name : Histology and Embryology PhD Program

Objective : The purpose of this study is to examine the effect of baicalin on cyclophosphamide (CP)-induced testicular damage in rats.

Methods: Twenty-eight Wistar albino rats were assigned to the control, baicalin, CP, and CP+Baicalin groups. A single dose of CP (200 mg/kg) was induced intraperitoneally (i.p.) in the CP and CP+Baicalin groups. Baicalin (100 mg/kg/day, i.p.) was administered in the baicalin and CP+Baicalin groups for 6 days. Testis tissue was investigated for general morphology, proliferating, and apoptotic cells. Oxidative stress parameters in testis tissue and hormone levels in serum were examined by biochemical analysis. Sperm analysis was performed on smear samples obtained from the epididymis.

Results: In the CP group, an increase in the number of abnormal spermatozoa and degeneration of seminiferous tubules were observed. Increased apoptotic cells and decreased proliferative cells were also detected in these seminiferous tubules. In the CP group, the level of malondialdehyde, total oxidant status, and oxidative stress index were increased besides the level of glutathione and total antioxidant capacity, and the activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione s-transferase (GST) were reduced in the testis tissue. In addition, decreased serum levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone were detected. All of these histologic and biochemical parameters were ameliorated in the CP + Baicalin group, except for GST activity.

Conclusion: CP caused testicular damage by disrupting the hormonal and oxidant/antioxidant balance, decreasing the proliferative index, and increasing apoptosis. Baicalin attenuates CP-induced testicular damage by inhibiting oxidative stress possibly due to its antioxidant property. Considering the proposed beneficial effects of Baicalin against testicular damage induced by CP, it might have the potential to be a promising agent for male infertility related to chemotherapy.

Keywords: Cyclophosphamide, baicalin, testis, histology, oxidative stress

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapinin yan etkileri günümüzde önemli bir sağlık sorunudur. Kemoterapide kullanılan ilaçların bir kısmı doğrudan tümöre etkili kemoteropatik biyolojik ajanlardır. Uygulanan ilaçlar kan yoluyla tüm vücuda dağılır ve tümör dokusu ile birlikte aynı zamanda diğer dokuları da etkileyerek hasara neden olur. Kemoterapi özellikle büyüyen ve bölünen hücreleri öldürdüğünden bu tür özellikleri olan başka sistemlere de zarar verebilir. Vücudumuzda kemoterapi tedavisinin yan etkilerinin görüldüğü sistemlerden biri de üreme organlarıdır. Kanser tedavisiyle ilişkili toksisite, tedavi edilmiş hastalarda geç ve uzun dönemli yan etkiler oluşturmaktadır. Bu istenmeyen yan etkilerinden biri de erkek infertilitesidir. Çoğu kemoterapi ilacının erkek üreme sistemine olan yan etkisi, spermatogenezin bozulması ve sperm sayısında ve kalitesinde ciddi bir azalmadır (Dere ve ark., 2013).

Alkilleyici bir antikanser ajanı olan siklofosfamid (CP), çeşitli neoplastik ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak testis hasarı da dahil olmak üzere ciddi yan etkileri vardır (Das ve ark., 2002). Zayıf spermatogenez, azalmış sperm işlevselliği, zayıf testiküler antioksidan kapasite, anormal sperm sayısında artış ve seks hormon seviyesinde düzensizlik CP kaynaklı testiküler toksisite ile ilişkilidir (Ghobadi ve ark., 2017). Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve azalmış glutatyon seviyelerinin gelişimi CP kaynaklı üreme hasarının başlıca nedenleridir (Tripathi ve ark, 2009). İnfertilite, CP tedavisine maruz kalan hastalarda önde gelen komorbidite olmaya devam etmiştir (Robaire ve ark., 2003). CP kaynaklı hasarla mücadele etmek ve olumsuz etkileri önlemek için bazı antioksidan ajanlar önerilmiştir (Ghobadi ve ark., 2017).

Geleneksel bir Çin bitkisi olan *Scutellaria baicalensis* Georgi, çeşitli flavonoidler, polifenoller ve uçucu yağlar içerir. Flavonoidler arasında baicalin (7-glukuronik asit, 5,6-dihidroksiflavon) önemli bir fitokimyasal belirteç ve önemli bir aktif bileşendir. Antioksidan, immünostimülan, antialerjik, antidiyabetik, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antikanser, antiplatelet ve potansiyel hepato ve nöroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkiler sergiler (Zhao ve ark., 2016). Tan ve ark. (2021) baicalinin fibrozisle ilişkili genleri ve inflammatuar tepkileri baskılayarak adriamisin kaynaklı nefrotik sendromu azaltabileceğini bildirmiştir. Baicalinin ayrıca insan eritrositleri üzerinde sisplatin tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Sawicka ve ark., 2013).

Ayrıca, koruyucu Wnt/b-katenin yolunu aktive ederken inflamatuvar TLR4/NF-kB yolunu inhibe ederek doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisteye karşı kardiyoproteksiyonu indüklediği kanıtlanmıştır (El-Ela ve ark., 2022). Potansiyel antikanser etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, baicalinin osteosarkom hücrelerinin büyümesini baskıladığı ve hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Baicalinin bu hücrelerdeki antitümör etkisinin AKT yolağının baskılanmasına ve siklin D1, CDK4 ve Bcl-2/Bax oranının protein seviyelerindeki azalmaya atfedilebileceği öne sürülmüştür (Liu ve ark., 2019). Ayrıca, baicalin, tek başına veya apigalin ile düşük doz kombinasyonunda kullanıldığında, klorokin kaynaklı erkek infertilitesine karşı koruma sağlayabilmiştir. Baicalinin bu korumayı antioksidan ve anti-apoptotik etkilerinin yanı sıra hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenindeki normal hormonal dengeyi yeniden sağlayarak elde ettiği ileri sürülmüştür (Akilah ve ark., 2018). Baicalinin Parkinson hastalığında nöroprotektif etkisini inceleyen güncel bir araştırmada, baicalinin oksidatif stresi, mikrogliya aktivasyonunu ve α -syn/MPP+ ve MPTP'nin neden olduğu inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca dopaminerjik nöron kaybına karşı koruduğu ve motor defisitleri hafiflettiği de saptanmıştır. Baicalinin anti-inflamasyon işlevinin NLRP3 inflamazom aktivasyonunun inhibisyonu ile ilişkili olduğu ve Nrf2 aracılı anti-oksidatif yanıtı bağı olduğu sonucuna varılmıştır (Huang ve ark.,2024). Doğal antioksidanların testis dokusu hasarı üzerindeki faydalı etkisi iyi bilinen bir konudur. Antioksidan olarak melatonin, α - tokoferol ve skualenin oksidatif hasarı ve testiküler histopatolojik değişiklikleri iyileştirmede ve serum testosteron seviyelerini normalleştirmede etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu antioksidanlarla ön tedavi lipid peroksidasyonu ve DNA hasarındaki artışı anlamlı olarak azaltmıştır (Ghobadi ve ark., 2017).

Literatür taramasında, baicalinin çeşitli modeller ile oluşturulan testis hasarı üzerindeki rolünü inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Fouad ve ark.,2017 ; Guo ve ark.,2015 ; Sui ve ark.,2019 ; Tekeli ve ark.,2023 ; Fan ve ark.,2022). Bunun yanı sıra, baicalinin özellikle CP kaynaklı testis hasarına karşı etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, erişkin erkek sıçanlarda siklofosamid uygulaması ile oluşan testis hasarının ve baicalinin olası iyileştirici etkisinin histopatolojik, immunohistokimyasal, TUNEL ve biyokimsayal yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır.

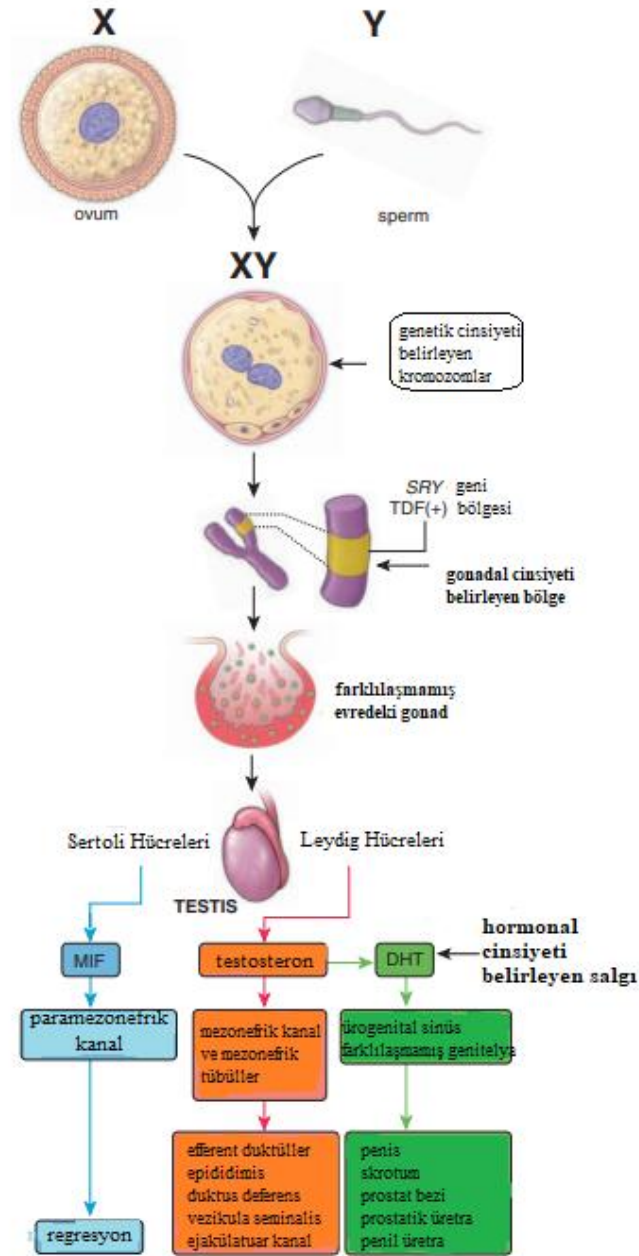
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Testis Embriyolojisi

Erkek üreme sistemi; testis, genital kanallar, aksesuar bezler ve penisten oluşmaktadır. Aksesuar bezler; seminal vezikül, prostat ve bulboüretral bezlerdir. Testisin iki ana görevi spermatogenez (sperm üretimi) ve steroidogenezdır (androjenlerin sentezi) (Ross ve Pawlina, 2016).

Erkek morfolojik karakteristikleri embriyonal gelişimin 7. haftasından itibaren başlar. Genital sistem erken dönemde erkek ve dişide birbirine benzer olduğundan genital sistemin başlangıç dönemi seksüel gelişimin farklanmamış safhası olarak isimlendirilir. Seks hücrelerini (sperm ve oosit) üreten gonadlar, mezotel, mezenkimal doku ve germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alırlar. Primordiyal germ hücreleri genital kabartılara göç ederek mezodermal epitel hücrelerinin çoğalmasını uyararak primer sex kordonlarını oluşturmak üzere indükler. Primitif seks kordlarını içeren genital kabartı korteks ve medulla'dan oluşmaktadır. Genital kabartının dış kısmında korteks iç kısmında medulla yer alır. Farklılaşmamış bu evrede embriyo gelişim potansiyeli açısından hem erkek hem dişi özelliktedir. Sex determining region-Y (SRY) geni Y kromozomunun kısa kolunda yer alıp gonadal cinsiyetten sorumludur. SRY geni ve testis-belirleyici faktörün (TDF) etkisi ile gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlara farklılaşır. Böylelikle korteks gerileyip dejenere olur ve medulla da testise farklanır. Seminiferöz kordonlar TDF'nin indüksiyonu ile medullanın derininde rete testis, tubuli rekti ve seminifer tübüllere farklılanırlar. Seminiferöz tübüller puberteye kadar lümensizdir ve puberteden itibaren lümen gelişerek kanalize olan diğer boşaltım kanallarıyla devamlılık gösterirler. Seminiferöz tübül duvarında bulunan iki tip hücreden biri olan sertoli hücreleri yüzey epitelinden gelişirken, diğeri ise spermatogonia primordiyal germ hücrelerinden farklılanırlar. Sertoli (sustentaküler) hücreleri Müllerian-inhibe edici faktörü (MIF) üretirler. MIF, Müller kanalının (paramesonefrik kanal) hücre bölünmesini engelleyerek dişi üreme organlarının gelişimini önler. Seminifer kordonları ayıran mezenşim, erkek gelişiminin erken aşamalarında farklılaşmamış primordiyumun testise gelişimini uyaran testosteron üreten Leydig (interstisyel) hücrelerini oluşturur. Ek olarak, testosteron mezonefrik Wolff kanallarının gelişiminden ve erkek genital kanalının boşaltım kanallarına farklılaşmasından sorumludur.

Testosteronun dönüşüm ürünü olan dihidrotestesteron ise dış genitalyanın erkek yönünde gelişimi için gerekli olan hormondur (Ross ve Pawlina, 2016) (Şekil 1).

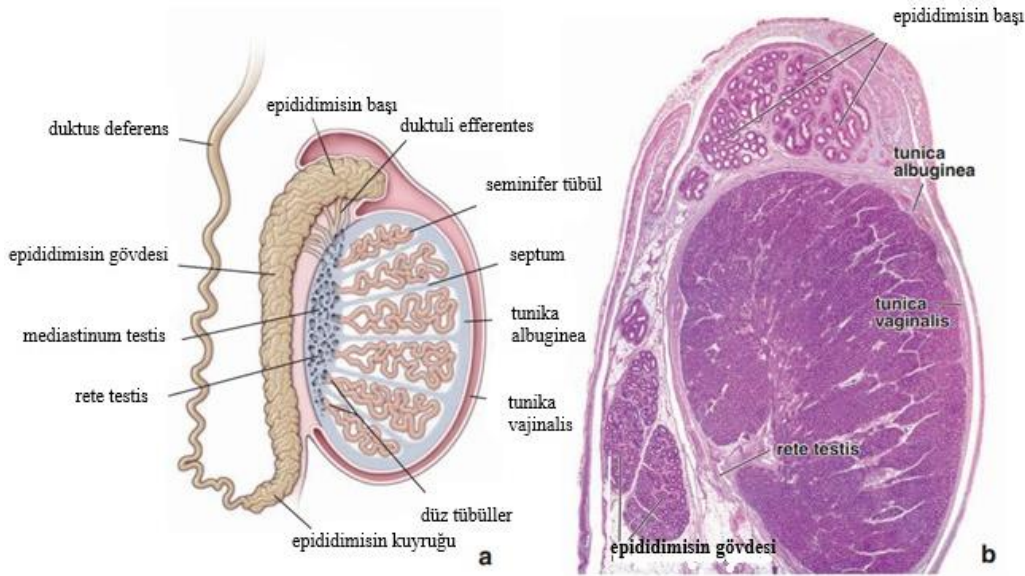


Şekil 1. Erkek cinsiyet gelişiminin şematik diyagramı ve gelişen üreme organları üzerindeki hormonal etkisi (Ross ve Pawlina, 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Gebeliğin 26. haftasında testisler skrotuma inguinal kanaldan geçerek inerler. Testisler kanaldan geçiş esnasında beraberinde kan damarları, lenf damarları, otonomik sinirleri ve abdominal periton uzantısı olan ve testisin yüzeyini kaplayan tunika vajinalisi de sürükler. Testisin skrotum içerisinde yer alması sıcaklığının vücut sıcaklığından 2°C- 3°C daha düşük olmasına neden olur ve böylece normal spermatogenez için ideal bir sıcaklık sağlanır (Ross ve Pawlina, 2016).

4.2. Testis Histolojisi

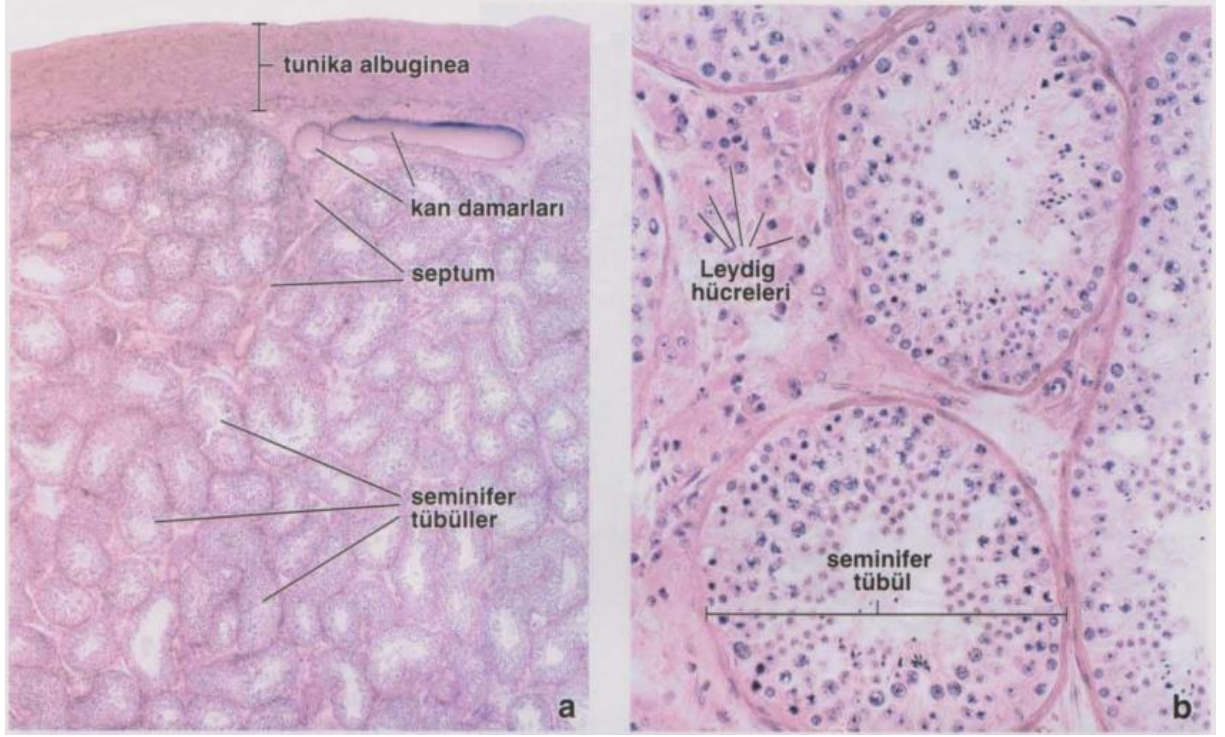
Testis tunika albuginea adındaki kalın ve sıkı bağ dokusu yapısındaki kapsül ile çevrelenmektedir. Gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika vasküloza, kapsülün iç kısmını oluşturmaktadır. Testisin posteriorunda tunika albuginea kalınlaşıp mediastinum testis ismindeki yapıyı oluşturmaktadır. Mediastinum testisin içinden lenf damarları, genital boşaltım kanalları ve kan damarları geçmektedir. Kapsülden uzanan fibröz yapıdaki septumlar testisi yaklaşık 250 kesintisiz ve birbiriyle bağlantılı lobüle ayırır. Her bir lobül gevşek bağ dokusu ile sarılı olan ve içinde sperm üretilen 1-4 seminifer tübülden oluşmaktadır. Gevşek bağ dokusu testis androjenlerini salgılayan Leydig (interstisyel) hücrelerini içerir. Lobülün içindeki tübüller testisin posterior yüzünde mediastinum'a yakın bölgede kısa ve düz bir seyir izler ve burada düz tübül (tubulus rekti) olarak adlandırılır. Düz tübüller mediastinumda anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testis'i oluşturur (Junqueira ve Carneiro, 2021) (Şekil 2).



Şekil 2 : İnsan testisinin sagittal kesiti (Ross ve Pawlina, 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Seminifer tübüllerin her birinin çapı yaklaşık 150-250 μm 'dir ve fibröz bir bağ dokusu olan tunika propriya ile çevrelenmiş seminifer epitelden oluşmaktadır. Bazal lamina üzerine oturan seminifer epiteli çok katlı bir epitel olup *Sertoli hücreleri* ve *spermatogenik hücreler*'den meydana gelmektedir. Tunika propriyanın iç katmanında bol miktarda aktin filament içeren ve bu nedenle düz kas özelliği gösteren *miyoid hücreler* (peritübüler kontraktıl hücreler) yer alır. Bu hücreler belirgin bir miktarda granüllü endoplazmik retikulumu içermeleri sebebi ile fibroblast yokluğunda kollajen sentezinde görev almaktadır.

Seminifer tübüllerin arasındaki aralıkları dolduran interstisyel dokuda ise kan ve lenf damarlarının yanı sıra eozinofilik yapıdaki *Leydig hücreleri* (interstisyel hücre) bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2016) (Şekil 3-4).



Şekil 3. İnsan testisinin fotomikrografları (Ross ve Pawlina, 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Seminifer tübül epitelini oluşturan hücreler;

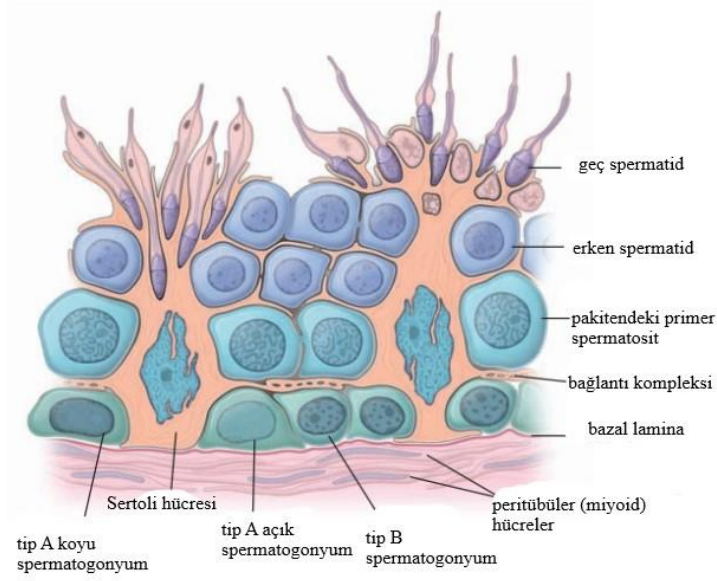
Sertoli hücreleri: Seminifer tübüllerde bazal laminadan lümene kadar uzanan destek ya da sustentaküler hücre olarak da isimlendirilen piramidal hücrelerdir. Spermatogenik hücrelerin arasındaki boşluğu dolduran bu hücreler tübüllere yapısal düzen vermekle birlikte testisin işlevi açısından oldukça önem arz ederler. Çok sayıda lateral uzantılardan dolayı hücre sınırları belirgin olmamakla birlikte rutin hematoksil-eozin (H&E) ile boyalı preparatlarda gözlenmesi zordur (Junqueira ve Carneiro, 2021) (Şekil 4). Elektron mikroskobu düzeyinde Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında çok sayıda düz endoplazmik retikulum, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bol miktarda mitokondri ve lizozomların bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca, nukleusu belirgin nukleolus ve az miktarda heterokromatin içermektedir. Puberteden sonra bölünme kabiliyeti olmayan bu hücreler, kendi aralarında alt yan yüzeylerinde sıkı bağlantılara sahip olup kan-testis bariyerinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Başlıca görevleri (Junqueira ve Carneiro, 2021);

- Spermatogenik hücrelerin beslenmesi, korunması ve desteklenmesini sağlamak
- Fagositoz: Spermiyogenez esnasında oluşan sitoplazma parçacıklarının sindirilmesi işlevi
- Salgilama: Spermilerin taşınmasında kullanılan sıvıyı salgılama ve folikül uyarıcı hormon (FSH) üretimi
- Anti-Müllerian hormon üretimi
- Kan-testis bariyeri
- İnhibin B üretimi

Spermatogenik hücreler: Seminifer tübüllerde bazal lamina ile lümen arasında 4-8 tabaka halinde dizilen, mitoz ve mayoz bölünmeler ile düzenli olarak çoğalan ve olgun spermatozoonlara farklılaşan hücrelerdir. Seminifer epitelde en immatür spermatogenik hücre olan spermatogonyum bazal lamina üzerine otururken, en matür spermatogenik hücre olan spermatid Sertoli hücresinin apikal kısmına tutunarak lümenin sınırını belirler (Şekil 4).

Seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel alanda;

Leydig hücreleri: Merkezi bir nukleus ve eozinofilik sitoplazma içeren büyük, yuvarlak ya da poligonal hücrelerdir. Sitoplazmasında tipik olarak lipid damlacıkları içermesinin yanı sıra lipofiksin pigmenti ve yapısı ve fonksiyonu net olarak bilinmeyen ancak hücrenin protein ürünü olduğu düşünülen Reinke kristalleri bulunmaktadır. Steroid salgı yapan hücrelerin karakteristik bir özelliği olarak sitoplazmasında bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulum içermektedir ve bu durum hücreye eozinofilik özellik kazandırmaktadır. Mitokondrilerinin tübüloveziküler yapıda olması da, steroid salgı yapan hücrelerin diğer bir karakteristik göstergesidir (Ross ve Pawlina, 2016). Erken fetal dönemde erkek genital sistemin gelişimini sağlayan testosteron üretiminden sorumlu hücrelerdir. Puberteye kadar inaktif olup, pubertede gonadotropik uyarılarla androjen salgılamaya başlayarak yaşam boyu aktif hale gelirler. Bu fizyoloji spermatogenez, cinsel gelişimin kontrol edilmesi ve ikincil cinsel özelliklerin ve davranışların sürdürülmesi de dahil olmak üzere erkeklerde birçok hayati süreçte önemli bir rol oynamalarına olanak tanır (Zhou ve ark.,2019) (Şekil 3).

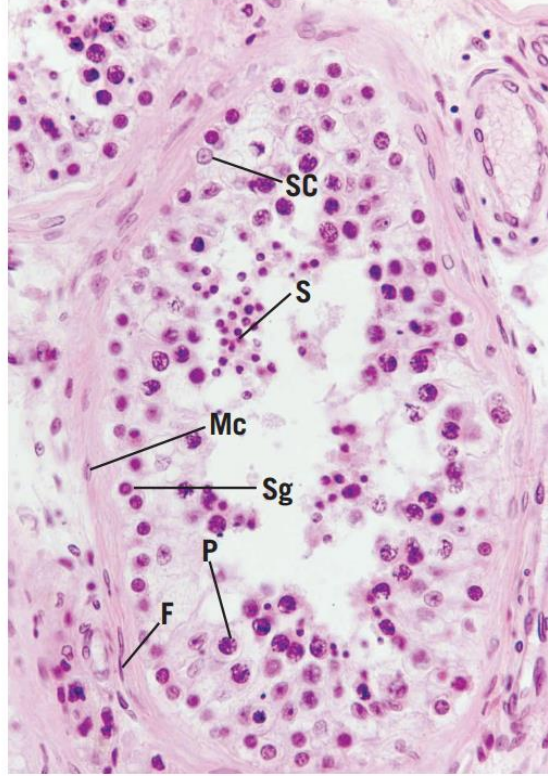


Şekil 4. İnsan seminifer epitelin şematik çizimi (Ross ve Pawlina, 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Spermatogenez, spermatogenik progenitör hücrelerin çoğalmasıyla başlayarak spermatozoon oluşum sürecinin tümünü kapsar. Puberteden başlayarak yaşam boyu devam eden bir süreçtir. Bu süreç, tüm seminifer tübüllerde eş zamanlı veya senkronize olarak gerçekleşmez, bunun yerine seminifer epitel döngüleri olarak adlandırılan diziler şeklinde gerçekleşir. Spermatogenez sırasında yavru hücreler hücreler arası köprüler yoluyla birbirlerine bağlı kalır. Ortaya çıkan sinsityum, herhangi bir seminifer tübül boyunca germ hücrelerinin senkronize gelişiminden sorumlu olabilir (Gartner ve ark., 2011). İnsanlarda spermatogenez süresi yaklaşık olarak 74 gündür. Üç aşamaya ayrılır;

1. Spermatositogenez: Spermatogonia'nın primer spermatositlere farklılaşmasıdır. **Spermatogonia** gelişiminin farklı aşamaları, nukleuslarının şekil ve boyanma özelliklerindeki değişikliklerle tanınabilir (Şekil 5). Spermatogonia, seminifer epitelin bazal lamina'sına bitişik diploid germ hücreleridir. Ergenlik çağında testosteron bu hücreleri hücre döngüsüne girmeleri için etkiler (Gartner ve ark., 2011). **Tip A koyu spermatogonyum**, mitotik olarak inaktif hücreleri temsil eder, koyu renkli nukleusları vardır; mitoz ile tip A açık spermatogonyumlara bölünme potansiyeline sahiptirler. **Tip A açık spermatogonyum**, soluk boyanan bir nukleusa, sferik mitokondriye, küçük bir Golgi kompleksine ve bol miktarda serbest ribozoma sahiptir. Mitotik olarak aktiftirler (ergenlikten itibaren) ve aynı tipte daha fazla hücreye ya da B tipi spermatogoniaya bölünürler.

Tip B spermatogonyum mitoz bölünme geçirerek primer spermatositleri meydana getirirler (Gartner ve ark., 2011).

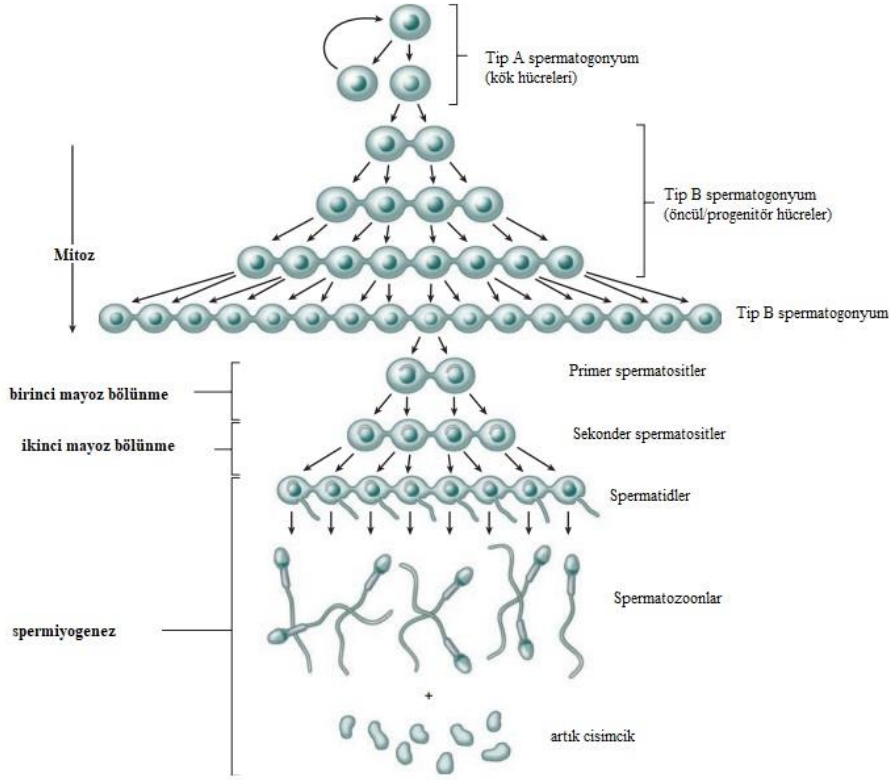


Şekil 5. Testisteki seminifer tübüllerin ışık mikrografı. Miyoid hücreleri (Mc), fibroblastları (F) oluşturan seminifer tübüllerin duvarı. Spermatogonyum (Sg) ve Sertoli hücreleri (SC) bazalde yer alır. Bunun hemen üstünde primer spermatositler (P) ve lümen yakınında spermatidler (S) bulunur (Gartner ve ark., 2011’den yararlanılarak hazırlanmıştır).

2. Mayoz: Haploid spermatidler oluşturmak üzere primer spermatositlerin kromozom sayısını ve DNA miktarlarını azaltmasıdır. **Primer spermatosit** 46 (44 + XY) kromozoma, diploid sayıya ve 4c DNA içeriğine sahiptir. Oluşumlarından kısa bir süre sonra bu hücreler yaklaşık 3 hafta süren ilk mayotik profaza girerler. Testis kesitlerinde görülen spermatositlerin çoğu mayoz bölünmenin bu evresindedir. Primer spermatositler spermatojenik soyun en büyük hücreleridir. Sinapsis ve rekombinasyonun bazı evrelerinde yoğunlaşmış kromozomların varlığı ile karakterize edilirler (Junqueira ve Carneiro, 2021). **Sekonder spermatositler**, spermatidleri oluşturmak için araya S fazı girmeden hızlı bir şekilde ikinci mayotik bölünmeye uğrayan 2c DNA’lı haploid hücrelerdir (Gartner ve ark., 2011). Sekonder spermatositlerin ömrü çok kısa olduğundan, testis kesitlerinde nadir görülürler, interfazda sadece kısa bir süre kalır ve hızla ikinci mayotik bölünmeye uğrarlar (Junqueira ve Carneiro, 2021).

3. Spermiyogenez: Spermatidlerin spermatozoaya (olgun sperme) dönüşümüdür. Her sekonder spermatosit, **spermatid** olarak bilinen ve her birinde bir c DNA ipliği ve 23 kromozom bulunan

iki haploid hücreye bölünür (Junqueira ve Carneiro, 2021). Seminifer tübül lümeninin yakınında bulunurlar. Nukleusları genellikle yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içerir. Bir çift sentriyol, mitokondri, serbest ribozomlar, düz endoplazmik retikulum ve iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine sahiptirler (Gartner ve ark., 2011) (Şekil 6).



Şekil 6. Germ hücrelerinin klonal özelliği (Junqueira ve Carneiro, 2021’den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Spermatidlerin sitoplazmalarının çoğundan ayrılarak, sıcaklığa duyarlı oldukça özelleşmiş bir sitodiferansiyasyon sürecine spermiyogenez adı verilir. Bu işlem sırasında hücre bölünmesi meydana gelmez ve spermatogenezde olduğu gibi hücreler Sertoli hücreleriyle ilişkili kalır (Junqueira ve Carneiro, 2021).

Spermiyogenez akrozom oluşumunu, nukleusun yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişimini ve sitoplazmanın çoğunun kaybını içerir. Sonuçta Sertoli hücre yüzeyinden tübül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur (Gartner ve ark., 2011). Bu yeniden şekillenme süreci dört fazda gerçekleşmektedir.

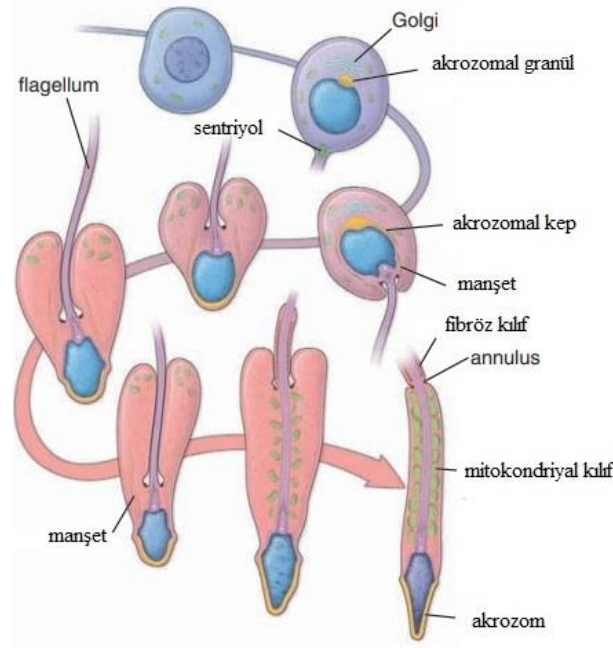
Golgi fazı, bir akrozomal vezikül içinde yer alan akrozomal granül oluşumu ile karakterize edilir ve spermatidin nükleer zarının bir parçasıdır (Gartner ve ark., 2011). Golgi fazında sitoplazma, nukleusun yakınında belirgin bir Golgi aparatı, mitokondri, eşleşmiş sentriyoller ve serbest ribozomlar içerir (Junqueira ve Carneiro, 2021).

Bu aşamada, sentriyoller flagellar aksonemi oluşturmak için nukleustan uzaklaşır. Sentriyoller daha sonra kuyrukla ilişkili bağlantı parçasının oluşmasına yardımcı olmak için nukleusa doğru geri göç eder (Gartner ve ark., 2011). Akrozomal granülün pozisyonu gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler (Ross ve Pawlina, 2016) (Şekil 7).

Kep fazında, akrozomal başlık yoğunlaşan nukleusun yaklaşık yarısı üzerine yayılır. Bu yeniden şekillenen yapıya akrozomal kep denir (Ross ve Pawlina, 2016). Akrozom, hidrolitik enzimler, özellikle hyaluronidaz ve tripsin benzeri bir proteaz olan akrozin içeren bir tür lizozomdur. Bir spermatozoon bir oosit ile temas ettiğinde, akrozomal membran spermin plazma membranı ile birleşerek bu enzimleri serbest bırakır (Junqueira ve Carneiro, 2021) (Şekil 7).

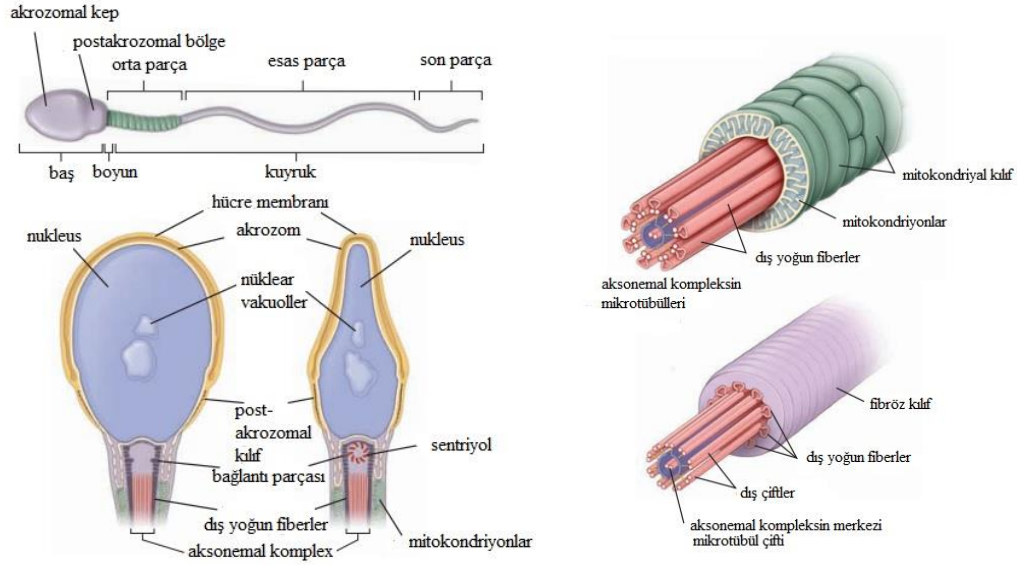
Akrozomal faz, mitokondri proksimal olarak flagellar hareketler için ATP'nin üretildiği kalınlaşmış bir orta parça etrafında toplanır. Nukleus daha yoğun ve daha uzun hale gelir ve protaminler (küçük bazik peptitler) nükleozomlardaki histonların yerini alır. Flagellum büyümesi kuyrukta distal olarak devam eder (Junqueira ve Carneiro, 2021). Spermatid uzar; bu sürece manşet adı verilen geçici bir mikrotübül silindiri yardımcı olur. Bu faz, spermatidin akrozomu seminifer tübülün tabanına doğru bakacak şekilde yönlendirilmesiyle sona erer (Gartner ve ark., 2011) (Şekil 7).

Olgunlaşma fazı, fazla sitoplazma ve spermatidleri bir sınıya bağlayan hücreler arası köprüler kaybolur. Atılan sitoplazma (residual cisimcik) Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Motil olmayan spermatozoa seminifer tübülün lümenine salındığında olgunlaşma fazı sona erer. Spermatozoa epididimi terk edene kadar hareketsiz kalır. Dişi üreme sisteminde ancak dölleme yeteneğine sahip olurlar (Gartner ve ark., 2011) (Şekil 7).



Şekil 7. İnsanda spermiyogenezin şematik diyagramı (Ross ve Pawlina, 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Spermatozoon yassı bir baş ve kuyruktan oluşmaktadır. 60 µm uzunluğunda olup, 23 kromozomlu nukleus (22+Y kromozomu veya 22+X kromozomu) içermektedir. Spermin baş kısmı akrozom reaksiyonu için korona radiata ve zona pellusidaya nüfuz etmesini sağlayan hidrolitik enzimler (örn. asit fosfataz, nöraminidaz, hyaluronidaz ve proteazlar) içerir. Spermatozoonun kuyruğu ise boyun, orta parça, ana parça ve son parçadan oluşur. Boyun, sentriyolleri ve kuyruğun geri kalan kısmının dokuz dış kaba lifine bağlı olan bağlantı parçasını içerir. Orta parça boyundan annulusa kadar uzanır ve aksonem, dokuz dış kaba lif ve spiral olarak düzenlenmiş mitokondri kılıfı içerir. Ana parça annulustan son parçaya kadar uzanır ve aksonemi çevreleyen yoğun lifler içerir, bunlar da fibröz bir kılıfla çevrelenir. Son parça ise aksonem ve onu çevreleyen plazma zarından oluşur (Gartner ve ark., 2011; Ross ve Pawlina, 2016) (Şekil 8).



Şekil 8. Bir insan spermatozoonunun diyagramı (Ross ve Pawlina, 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

4.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunma sistemlerinin dengesizliğinden kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile oluşmaktadır. ROS uygun konsantrasyonlarda hücre işlevini sürdürmek için fizyolojik seviyelerde gereklidir, ancak kontrol edilmezse hızla yıkıcı hale gelir (Makker ve ark., 2009). ROS hem endojen hem de eksojen formlarda bulunur. Endojenler arasında mitokondriyal redoks reaksiyonları yoluyla üretilen süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali bulunmaktadır. Mitokondriyal işlev bozukluğu bu ürünlerin aşırı birikimine neden olur (Hayyan ve ark., 2016). Ayrıca, bağışıklık hücreleri redoks reaksiyonlarını anti-patojen araçlar olarak kullanır ve bu süreçte ROS üretir (Sies, 1993). Nitrik oksit, peroksinitrit, nitroksil ve nitrozil bileşiklerini de içeren reaktif nitrojen türleri (RNS) koleksiyonunun bir tanesidir (Doshi ve ark., 2012). Nitrik oksit ve süperoksit arasındaki reaksiyonun ürünü olan peroksinitrit, doğrudan moleküler hasara ve kilit sinyal yollarına müdahale yoluyla dokularda oksidatif strese neden olur (Rosselli ve ark., 1998).

ROS'un eksojen kaynakları arasında tütün dumanı, ağır metaller ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi faktörler bulunmaktadır. DNA hasarı, lipidlerin ve amino asitlerin oksidasyonu ve enzim deaktivasyonu yoluyla ROS, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklardan Alzheimer demansı ve kansere kadar çok sayıda hastalık durumunun patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Birben ve ark., 2012).

4.3.1. Oksidatif stres ve erkek infertilitesi

Oksidatif stres, sperm hücresi işlev bozukluğunun önemli bir nedenidir ve spermatozoanın hem yapısal hem de işlevsel bütünlüğünün bozulması nedeniyle erkek infertilitesinin etiyolojisine önemli bir katkıda bulunur (Aitken ve Baker,2006 ; Venkatesh, 2011). Oksidatif stresin sperm olgunlaşması, hareketliliği ve işlevi üzerindeki etki mekanizmalarını araştıran çalışmalar, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, DNA hasarı ve apoptozun rollerinin önemini vurgulamıştır (Ritchie ve ark., 2021). Oksidatif strese bağlı sperm fonksiyonunun azalmasının kesin mekanizması bilinmemekle beraber aksonemde peroksidatif hasara ve hücre içi ATP seviyelerinin tükenmesine, lipid membran bileşenlerinin oksidasyonuna ve hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'nın parçalanması nedeniyle 4-hidroksinonenal ve malondialdehit oluşumunun neden olduğu düşünülmektedir (Aitken ve ark., 2012 ; de Lamirand ve Gagnon, 1992). ROS'un aşırı miktarda bulunduğu, DNA hasarını, organel parçalanmasını ve hücre ölümünü teşvik ederek bir sperm yıkım yolu geliştirdiğine inanılmaktadır. Oksidatif stresin aracılık ettiği spermatozoa içindeki DNA hasarı ile döllenme oranlarının azalması ve yenidoğan morbidite ve mortalite oranlarının artması arasındaki bağlantılar bu teoriyi genişletmiştir (Zini ve Sigman,2009). DNA bazlarının ROS aracılığı ile uzaklaştırılması ve ardından DNA iplikçiklerinin kırılması, DNA hasarına ve spermatozoanın apoptotik yolağa girişini sağlamaktadır. Redoks reaksiyonları ve bunların oksidatif substratları ve ürünleri böylelikle DNA ve hücresel yıkımın birincil failleri olarak kabul edilmektedir (Koppers ve ark., 2011).

Testiküler oksidatif stres, erkek fertilitesi için zararlı olduğu bilinen bir dizi durumda rol oynamaktadır. Antioksidan ajanların testis fonksiyonunu korumadaki rolüne rağmen spermatogenez süreci boyunca, çok çeşitli faktörler antioksidan savunmada bozulmaya neden olabilir ve daha sonra oksidatif stresi indükler. Bu faktörlerden bazıları, yüksek testis sıcaklığı, varikozel, diyabet, enfeksiyon, hipertiroidizm, üreme hormonları arasındaki dengesizlik, toksinlere maruz kalmak, iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapötik ilaçlar ve yaşlılıktır. Serbest radikallerle savaşan ana enzimlere güvenmenin yanı sıra, testisler oksidatif stres kaynaklı komplikasyonlarla savaşmak için düşük moleküler ağırlıklı antioksidan ajanlara büyük ölçüde bağımlıdır. Doğası gereği bu faktörler serbest radikallerin temizleyicileri olarak kabul edilir (Asadi ve ark.,2017).

Testis dokusu, yüksek hücre bölünme hızı, oksijen oranı için hücre rekabeti, zayıflamış damarlar nedeniyle düşük oksijen basıncı ve yüksek doymamış yağ asitleri seviyeleri gibi çeşitli nedenlerden dolayı serbest radikallerin aktivitesine ve oksidatif strese oldukça yatkındır. Ayrıca, vücutta üretilen süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazlar gibi antioksidan enzimler de dahil olmak üzere vücudun antioksidan sistemi tüm serbest radikalleri

nötralize edemediğinden, oksidatif stresin olumsuz etkileriyle mücadele etmek, spermatogenezi geliştirmek ve doğurganlığı artırmak için antioksidan takviyelerin kullanılması önerilmektedir (Asadi ve ark.,2017).

4.4. Antikanser İlaçlar

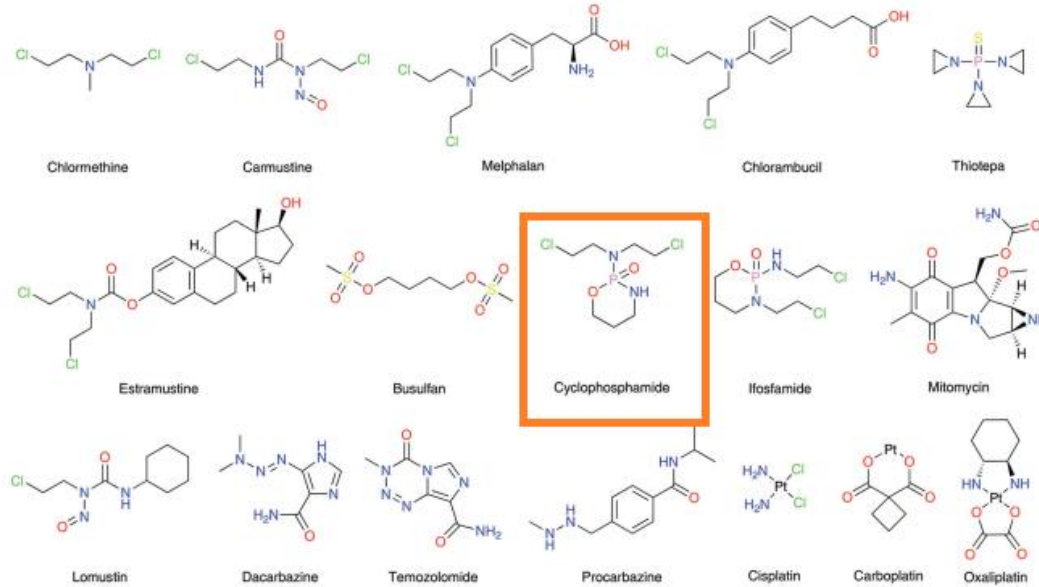
Antineoplastik ilaçlar kanser tedavilerinde kullanılır ve bunların birçoğu sitotoksik, genotoksik, mutajenik ve teratojenik olarak karakterize edilir. Bu ilaçlar sadece hedef tümör hücreleri üzerinde değil, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerinde de etkilidir (Besse ve ark., 2012 ; Białk-Bielinska ve ark., 2017 ; Filipi ve ark., 2020). Geleneksel antikanser molekülleri normal ve tümör hücreleri arasında ayırım yapmadan etki etmesinin neden olduğu özgüllük eksikliği, bu antikanser tedavilerinde şimdiye kadar tanımlanan neredeyse tüm olumsuz etkilerinden sorumludur (Guichard ve ark., 2017). Antineoplastik ilaçların etki mekanizması, DNA transkripsiyonunun inhibisyonu, doğrudan DNA sentezine müdahale edilmesi, hücresel proliferasyonu bozmak ya da kontrol etmek için hücrelerin biyolojik süreçlerini düzenleyen proteinlerle etkileşimini içerir (Besse ve ark., 2012 ; Gomez-Canela ve ark., 2020) Deoksiribonükleik asit (DNA) üzerindeki etkilerine göre üç farklı geleneksel antineoplastik ilaç ailesi ayırt edilebilir (Guichard ve ark., 2017) :

- DNA sentezine etki eden moleküller (antimetabolitler)
- DNA üzerinde doğrudan etkisi olan ve DNA-interaktif ajanlar olarak adlandırılan moleküller (alkilleyici ajanlar, interkalasyon ajanları ve topoizomeraz inhibitörleri)
- Mitoz üzerinde etkisi olan moleküller (antitubulin ajanlar)

Antimetabolitler, antineoplastik ilaçların en eski ailelerinden birine aittir. Metotreksat gibi molekülleri ve gemsitabin gibi daha yeni bileşikler içerirler. Bu bileşiklerin etki mekanizması DNA replikasyonunu önlemektir. Bunlar pürin ve pirimidin bazlarının yapısal analogları (benzer nükleobazlar veya nükleozitler) ve folik analoglarıdır (folik asitlerin inhibisyonu nükleik asit sentezi). *Pürin ve pirimidin analogları* hücre bileşenlerine dahil olarak nükleik asitlerin sentezini bozar. Pürin Analogları; Azathioprin, Cladribin, Fludarabin, Mercaptopurin ve Thioguanindir. Pirimidin Analogları; Azacitidin, Capecitabin, Cytarabin, Decitabin, Floxuridin, Fluorourasil, Gemsitabin ve Trifluridin/Tiprasildir. *Folik analoglar* ise azotlu bazların sentezinde yer alan folik koenzimleri hedef alır. Folik analogları; Metotreksat, Pemetreksed, Pralatreksat ve Trimetreksattır (Guichard ve ark., 2017).

DNA etkileşimli ajanlar grubuna giren *alkilleyici ajanlar*, 40'lı yılların sonlarında klormetin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte en eski antineoplastik ilaç ailesini temsil etmektedir.

I. Dünya Savaşı sırasında kimyasal silahlardan kaynaklanan ölümlerin çoğu hardal gazından kaynaklanmıştır. Maruziyetten birkaç gün sonra, ciddi yanıklarla ortaya çıkan bir aplastik aneminin gözlemlenmesi, yan etkileri azaltılmış antikanser ilaçların araştırılması için başlangıç noktası olmuştur. Alkilleyici ajanlar, çift sarmal veya proteinlerdeki DNA nükleobazlarının nükleofilik gruplarıyla alkil gruplarını kovalent olarak birleştirerek reaksiyona giren ve böylece replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini değiştiren bir veya daha fazla elektrofilik gruba sahip organik bileşiklerdir. Günümüzde yedi alkilleyici ajan sınıfı ayırt edilebilmektedir. Bunlar; azot hardalı analogları, oksazofosforinler, etilen iminler, nitrozoüreazlar, alkilsülfonatlar, triazenler ve hidrazinler son olarak da platin türevleridir. Oksazofosforinlerin iki öncüsü, çok sayıda uygulamaya sahip olan siklofosfamid ve ifosfamid (Şekil 9). Diğer grup olan *interkalasyon ajanları*, DNA'nın bitişik baz çiftleri arasına dahil edilebilen düzlemsel polisiklik moleküllerdir. DNA replikasyonu ve transkripsiyonu daha sonra inhibe edilir. Topoizomera II ve I üzerinde doğrudan etki veya serbest radikal oluşumu, bu interkalasyon ajanlarının önerilen iki etki şeklidir. Doksorubisin, Epirubisin, Daunorubisin, İdarubisin, Mitoksantron ve Aktinomisin D bu gruba girmektedir. *Topoizomera inhibitörleri* ise, DNA'nın bölünmesi ve topolojik durumundan sorumlu enzimlerdir. Topoizomera I DNA'nın bir ipliği üzerinde etki gösterirken, topoizomera II DNA'nın her iki ipliği üzerinde etki gösterir. Bu enzimlerin inhibitörleri öncelikle antikanser ajanlar olarak kullanılır. İrinotekan, topotekan ve etopozid bu gruba dahildir (Guichard ve ark., 2017).



Şekil 9. Alkilleyici ajanların yapısı (Guichard ve ark., 2017'den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Antitubulin ajanları ise, mikrotübül dinamiklerine müdahale eder (örn, iğ oluşumu veya ayrılması), bölünmeyi engeller ve hücre ölümüne yol açar.

Bu grubun ana üyelerine vinka alkaloidleri ve taksanlar dahildir. *Vinka alkaloidleri*, Madagaskar Cezayir menekşesi alkaloidlerinin (*Catharanthus roseus*) antineoplastik özelliklerinin Malgaş halkı tarafından antidiyabetik olarak kullanımı üzerine yapılan araştırmalar sırasında keşfedilmiştir. Bitkinin yapraklarından elde edilen ilk antikanser alkaloidler 1958 yılında vinblastin ve üç yıl sonra da vinkristin olmuştur. Vindezin, Vinorelbin ve Vinflunin de bu gruba dahildir. *Taksanlar* ise, aslen Pasifik Porsuk Ağacı *Taxus Brevifolia*'nın kabuğundan elde edilen bir diterpendir. Meme ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılan Dosetaxel ve yumurtalık kanseri tedavisinde kullanılan Paklitaksel bu grubu dahil ajanlardır (Guichard ve ark., 2017).

Geleneksel antikanser ilaçlarının yanı sıra tirozin kinaz inhibitörleri, proteozom inhibitörleri ve mTOR inhibitörleri gibi etkisi özellikle tümör hücrelerini hedef alan moleküllerin ortaya çıkması ise kemoterapiye yeni bir soluk ve bazı kanserlerin tedavisinde yeni bir umut getirmiştir.

4.4.1. Antikanser ilaçlar ve oksidatif stres

Antineoplastik ajanlar, kanser kemoterapisi sırasında bu ilaçları alan hastalarda oksidatif stres oluşturmaktadır (Faber ve ark., 1995 ; Subramaniam ve ark., 1993). Bu durum lipid peroksidasyon ürünlerinin yükselmesi; kan plazmasının toplam radikal yakalama kapasitesinin azalması; E vitamini, C vitamini ve β -karoten gibi antioksidanların plazma seviyelerinin düşmesi ve kemoterapi sırasında doku glutatyon seviyelerinde meydana gelen belirgin azalma ile kendini göstermektedir. Yüksek düzeyde ROS üreten ajanlar arasında antrasiklinler (örn. doksorubisin, epirubisin ve daunorubisin), alkilleyici ajanlar (bisülfan, siklofosfamid), platin koordinasyon kompleksleri (örn. sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin), epipodofilotoksinler (örn. etoposid ve teniposid) ve kamptotesinler bulunur. Antrasiklinler açık ara en yüksek oksidatif stres seviyelerini oluşturur. Bunun nedeni, diğer hücresel bölgelerde ROS oluşturma yanısıra süperoksit radikallerinin oluşumuyla sonuçlanan kardiyak mitokondrinin elektron taşıma sisteminden elektronları yönlendirme yetenekleridir (Gille ve Nohl, 1997). Yukarıdaki antineoplastik grupların aksine, taksanlar (örn. paklitaksel ve dosetaksel), vinka alkaloidler (örn. vinkristin ve vinblastin), antifolatlar gibi antimetabolitler ve nükleozid ve nükleotid analogları sadece düşük seviyelerde oksidatif stres oluşturur. Bununla birlikte, tüm antineoplastik ajanlar kanser hücrelerinde apoptozu indüklerken bir miktar ROS üretir. Bunun nedeni, ilaca bağlı apoptoz yollarından birinin mitokondriden sitokrom c salınımını içermesidir (Kaufmann ve Earnshaw, 2000).

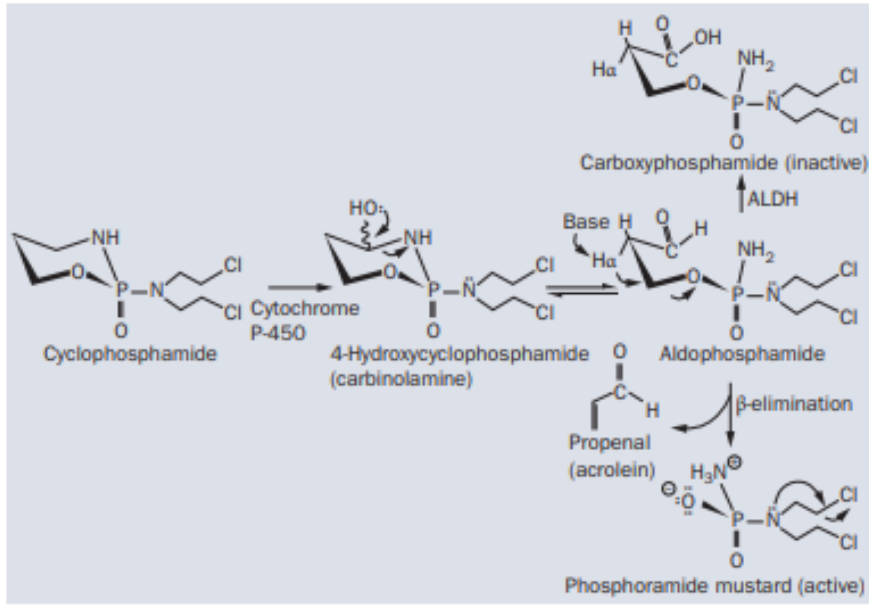
Bu gerçekleştiğinde, elektronlar NADH dehidrojenaz ve indirgenmiş koenzim Q10 tarafından elektron taşıma sisteminden oksijene yönlendirilir ve süperoksit radikallerinin oluşmasına neden olur (Conklin,2004).

Oksidatif stres, antineoplastik ajanların kanser hücreleri üzerinde optimal sitotoksisitelerini göstermeleri için gerekli olan hücresel süreçlere müdahale eder ve orta düzey oksidatif stres seviyelerinin antikanser ilaçların sitotoksisitesini azalttığı gösterilmiştir (Shacter ve ark., 2000 ; Lee ve ark., 1999). Dolayısıyla, antikanser ilaçlar uygulandığında ortaya çıkan ROS oluşumu tedavinin etkinliğini azaltabilir. Buna ek olarak, antineoplastik ajanların neden olduğu bazı yan etkilerin belirli antioksidanlar tarafından önlendiği görüldüğünden, kemoterapi sırasında bu takviyelerin uygulanması yan etkilerin gelişimini azaltabilir ve tedaviye yanıtı iyileştirebilir (Conklin,2004).

4.5. Siklofosfamid

Siklik fosforamid esteri olan siklofosfamid, antineoplastik ve immünosupresif olarak yaygın şekilde kullanılan oral aktif bir alkilleyici ajandır. CP, fosforamid hardal ve akrolein üreten, enzimatik aktivasyon gerektiren inaktif bir n ilaçtır (Ghobadi ve ark., 2017). Malign lenfomalar, lösemiler, miyeloblastom, meme kanseri ve yumurtalık karsinomunun tedavisinde sıklıkla diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte uygulanır. Ayrıca, bir immünosupresan olarak, greft reddinin önlenmesinde ve romatoid artrit, myastenia gravis, multiple skleroz ve lupus eritromatz gibi kronik otoimmün bozuklukların tedavisinde ağızdan verilir. Alkilleyici ajanların temel farmakolojik aktivitesi, esas olarak DNA iplikçiklerini çapraz bağlayarak hücre büyümesinin, mitotik aktivitenin, farklılaşmanın ve fonksiyonun bozulmasıdır (Vernet ve ark., 2004). CP'nin hızla çoğalan dokulara müdahale etme yeteneği, terapötik etkilerinin ve toksik özelliklerinin çoğunun temelidir.

Siklofosfamid, hepatik sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından aktive edilerek 4-hidroksisiklofosfamid ve açık halka tautomeri aldofosfamid ile denge halindedir. Bu iki ara metabolit hücrelere kolayca yayılır ancak sitotoksik değildir. Hücrenin türüne bağlı olarak aldofosfamid, β -eliminasyon adı verilen kimyasal bir süreçle sitotoksik fosforamid hardal ve yan ürün akrolein oluşturmak üzere ayrırır. Alternatif olarak aldofosfamid, aldehit dehidrojenaz tarafından inaktif metabolit karboksifosfamide oksitlenir. Bu son reaksiyon hematopoetik kök hücrelerde gerçekleşir çünkü bu hücreler yüksek düzeyde aldehit dehidrojenaz eksprese ederler (Vernet ve ark., 2004) (şekil 10).



Şekil 10. Siklofosfamidin metabolik yolu (Emadi ve ark., 2009'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).

Hızlı bölünen hücrelerin varlığı nedeniyle üreme sistemi bu ilaca karşı oldukça hassastır (Aguilar-Mahecha ve ark., 2001). CP ile tedavi edilen erkek deneklerde oligospermi ve azosperminin (Trasler ve ark., 1987) yanı sıra testis ve epididimisin biyokimyası ve histolojisinde değişiklikler görülmektedir (Trasler ve ark., 1988 ve Trasler ve Robaire, 1988). CP ile tedavi edilen erkek hastalarda gonadotropin salgılanmasında bozulma ve testis hasarıyla ilişkili olarak düşük kan testosteron seviyeleri görülmüştür. Yetişkin erkek sıçanlara kronik CP uygulaması testis ağırlığını ve serum testosteron seviyelerini azaltmakta ve kısırlığa yol açmaktadır.

Ayrıca, akut ve kronik maruziyetlerin ardından stres tepki genlerinin ifadesinin değiştiği gösterilmiştir. CP ile tedavi serum testosteron, luteinize edici hormon (LH) ve foliküler uyarıcı hormon (FSH) seviyelerini düşürür ve 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz, 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz, P450_{scc} enzimi ve aromataz gibi testiküler steroidojenik enzimlerin aktivitelerini azaltır (Ghosh ve ark., 2002). Bunun nedeni muhtemelen Leydig hücrelerinde CP tarafından indüklenen oksidatif hasar ve gen ekspresyon modellerindeki değişikliklerdir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, siklofosfamidin erkek üreme potansiyelini olumsuz yönde etkileyip infertiliteden sorumlu olabileceğini göstermektedir (Ghobadi ve ark., 2017). Bu nedenle siklofosfamidin testis üzerindeki toksik etkilerini ve mekanizmalarını tanımlamak önemlidir. Testisteki spermatogenik hücrelerin yüksek mitotik aktiviteye sahip olmaları ve kemoterapötik ajanların da daha çok hızlı proliferasyon gösteren hücrelerde toksik yan etki

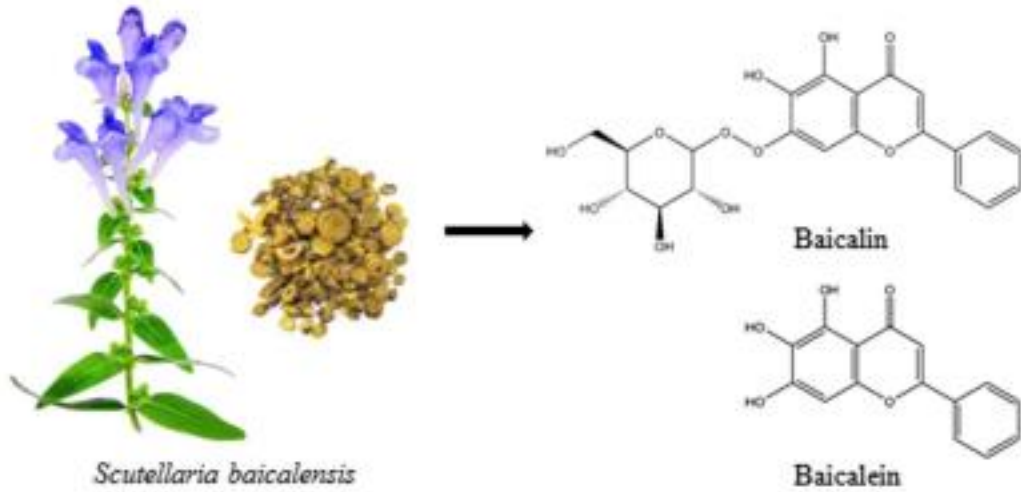
göstermelerinden dolayı bu toksik yan etkilerin azaltılması veya önlenmesine yönelik koruyucu stratejiler belirlenmesi gerekmektedir.

4.6. Baicalin

Çin takkesi veya Huangqin olarak da bilinen *Scutellaria baicalensis* Georgi, Lamiaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir ve kökü geleneksel Çin tıbbında kullanılan en popüler temel bitkiden biridir. İlk olarak M.Ö. 100 yıllarında Shennong Bencao Jing'de belgelenmiştir (Wang ve ark., 2018).

Çin herbolojisinde, ısıyı temizleme, nemi kurutma, toksinleri giderme etkileri gösterir ve kökü Çin'de 2000 yıldan fazla bir süredir sarılık, hepatit, ishal ve solunum ve gastrointestinal sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kabul görmüştür. *S. baicalensis*'in anti-tümör, anti-bakteriyal, anti-viral etkilerinin yanı sıra anti-oksidan, ROS tutucu ve anti-konvülsan olarak da etki gösterebildiği bildirilmiştir. Son zamanlarda nörodejeneratif hastalıklarda *S. baicalensis* ve bileşeni flavonların hem in vitro hem de in vivo çalışmalarındaki nöroprotektif etkisi umut verici bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Zhao ve ark., 2016) (Şekil 11).

Bugüne kadar *S. baicalensis* Georgi'den toplam 126 küçük moleküllü bileşik ve 6 polisakkarit izole edilmiştir. Bu bileşiklerin çoğu bitkinin köklerinden elde edilmiştir. Bu kimyasal bileşenler; küçük moleküller, serbest flavonoidler, flavonoid glikozitler, feniletanoid glikozitler ve diğer küçük moleküller olmak üzere sınıflandırılabilir. Bunlar arasında flavonoidler ve glikozitler başlıca bileşiklerdir (Wang ve ark., 2018). *S. baicalensis*'ten 40'tan fazla flavonoid ayrılmış ve tanımlanmıştır. Daha yoğun olarak çalışılan substratlar arasında baicalein, baicalin, wogonin, wogonosid ve oroxylin A bulunmaktadır. *S. baicalensis*'in sıcak su kullanılarak ekstrakte edilen geleneksel dekoksiyonu yaklaşık %26 baicalin, %10 wogonin-glukuronid, %2 baicalein ve %0,2 wogonin verirken, ham bitki kökünün alkol-su ekstraksiyonu kullanılarak yapılan ticari dekoksiyonlar daha fazla baicalin ve daha fazla baicalein ve wogonin verir (Zhao ve ark., 2019).



Şekil 11. Baicalin ve aglikonu baicalein, *Scutellaria baicalensis*'in kurutulmuş kökünden elde edilir (Wang ve ark., 2022'den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Baicalin ve baicalein tüm *S. baicalensis*'in flavonoidleri arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve baicaleinin bu açıdan neredeyse üç kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Wozniak ve ark., 2015). Bununla birlikte, başka araştırmacılar ise, baicalinin ksantin oksidazın inhibisyonu da dahil olmak üzere diğer radikal temizleme yollarında daha güçlü bir bileşik olduğunu öne sürmüşlerdir (Shieh ve ark., 2000). Bu durum hem baicalinin hem de baicaleinin kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda kullanımı için potansiyel adaylar haline getirmektedir (Huang ve ark., 2005).

Baicalin'in antioksidan etkilerini araştıran ilk çalışmalara bakıldığında, Gabrielska ve ark. (1997) *Scutellaria baicalensis* ekstraktlarının UV kaynaklı oksidasyon üzerindeki antioksidasyon etkisini incelemiş ve *Scutellaria baicalensis* ekstraktlarının serbest radikalleri temizleme ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma yeteneği sayesinde güneş radyasyonunun neden olduğu cilt hastalıkları başta olmak üzere çeşitli hastalıklara aracılık edebileceğini bulmuştur. Gao ve ark. (1999) baicalein ve baicalin'in serbest radikal saldırısıyla ilişkili kraniyoserebral hasarın tedavisinde iyi bir serbest radikal temizleyiciler olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Başka bir araştırmada ise, *Scutellaria baicalensis*'ten elde edilen üç hekzan, aseton ve metanol ekstraktında, *Scutellaria baicalensis*'in aseton ekstraktının doza bağlı bir şekilde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2000).

Emamektin benzoat kaynaklı toksisiteye karşı baicalin ve chrysin'in koruyucu etkilerini karaciğer, böbrek, beyin, testis ve kalp dokuları üzerinde histopatolojik ve oksidatif stres parametreleri düzeyinde inceleyen bir araştırmada, emamektin benzoat ve baicalinin birlikte verildiği grubun hasar grubuna kıyasla iyileştiği ve değerlerin kontrol grubununkilere yaklaştığı

tespit edilmiştir (Tekeli ve ark., 2023). Testis dokusunda yapılan çalışmalar, ısı stresinin farelerin testis dokusunda makroskopik/apoptotik ve oksidatif değişikliklerin baicalin tarafından antioksidatif enzim aktivitelerini artırarak ve muhtemelen Fas/FasL yolunu bloke ederek hafifletilmekte olduğunu göstermektedir (Sui ve ark., 2019). Ayrıca torsiyon/detorsiyona maruz bırakılan sıçan testislerinde, baicalinin histopatolojik testis dokusu hasarını iyileştirdiği ve Fas ligandının ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde azalttığı görülmektedir. Baicalinin, antioksidan, antinitrozatif, anti-enflamatuar ve anti-apoptotik etkileri yoluyla torsiyon/detorsiyonun neden olduğu testis hasarını doza bağlı olarak iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (Fouad ve ark., 2017).

Kanser tedavilerinde hastalığın kontrol altına alınması kadar ortaya çıkan yan etkilerin de iyi bir şekilde yönetilmesi oldukça önemlidir. Baicalinin son on yılda antioksidan etkisinin yanı sıra anti-inflamatuar, antikanser etkileri de birçok çalışmada gösterilmiştir. Fakat literatür taramasında CP ile oluşturulan testis dokusu hasarı üzerine baicalinin etkisine bakan bir çalışmaya rastlanamadı. Bu çalışmamızda CP ile indüklenen testis hasarı modelinde baicalinin olası iyileştirici etkisinin histolojik ve biyokimyasal yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır. Hipotezimiz, CP uygulanması ile oluşan testis hasarında ekzojen olarak uygulanan baicalinin bu hasarı hafifleterek infertiliteyi önleyici bir etki göstermesidir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasallar

Siklofosfamid (Baxter Oncology)

Baicalin (CAS numarası: 21967-41-9, saflık $\geq$ %95, Cayman Chemical Company)

ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, S7101)

Anti-PCNA monoklonal antikor (Bioss, Bsm-33035M)

HRP Anti-Polyvalent Lab Pack (ScyTek, SHP125)

Proteinaz K (Sigma, P2308)

DAB Chromogen / Substrate kit (Scytek, ACK125)

Rat Testosteron ELISA Kit (BT Lab, E0259Ra)

Rat Luteinleştirici hormon, LH ELISA Kit (BT Lab, E0179Ra)

Rat Folikül stimüle edici hormon, FSH ELISA Kit (Elabsience, E-EL-R0391)

Masson'un trikrom boyası kiti (Bio-Optica, 04-010802)

Ethanol (Merck, 100983.2511)

Hidrojen Peroksit (Merck, 7722-84-1)

Formaldehit %10 (Tekkim, TK.060161.05000)

Sodyum Karbonat (Merck, 106392)

Bakır sülfat (Merck, 102791)

Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat (Merck, 1.08085)

Sodyum tungstat (Merck, 106673)

Sodyum molibdat (Merck, 106521)

HCl (Merck, 1.00317)

NaCl (Merck, 106404)

CaCl₂ (Sigma, 12022)

Sodyum sitrat (Sigma, S1804)

NaOH (Merck, 106498)

TCA (Triklorasetik asit) (Merck, 100810)

n-butanol (Merck, 101988)

Meta-fosforik asit (%85 H₃PO₄) (Merck, 100546)

EDTA-Na (Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu) (Sigma, ED2P)

KH₂PO₄ (Merck, 104873)

Albumin (Sigma-A, 2153)
DTNB (5-5'-ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) (Sigma, D8130)
CDNB (1-kloro-2,4-dinitro-benzenin) (Fluka, 24440)
GSH (Glutasyon) (Sigma-G-6529)
Riboflavin (Sigma-R0508)
O-dianisin (Mp-Biomedisis, 195136)
SOD (120 IU/ml) stok standardı (Sigma S-2515-3000 U)
H₂O₂ (Hidrojen peroksit) (Merck-641-85198900)
TBA (Tiobarbitürik asit) (Merck 108180-00252)
Sodium meta periodate (Alfa Asear A13U004)
Sodium m-Arsenite (Sigma S-7400)
Siklohegzanon (Merck 109666)
H₂SO₄ (Merck 100713)
FeCl₃ (Merck 803945)
Lityum sülfat (Sigma Aldrich 238031)
Folin Reagent (Sigma Aldrich F9252)

5.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alınarak yapıldı (Onay kodu : 23.2021.mar, Tarih : 25.02.2021). Çalışmamız için İstanbul Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden iki aylık erkek Wistar Albino sıçanlar (200-250g, n=28) temin edildi. Sıçanlar 12 saatlik gündüz/gece döngüsünde ve 22 ± 2°C sıcaklığındaki standart laboratuvar koşullarında tutuldu ve ticari sıçan yem ve musluk suyu ile ad libitum olarak beslendi.

5.3. Deney Grupları

Sıçanlar Kontrol, Baicalin, CP ve CP+Baicalin olarak rasgele dört gruba ayrıldı.

Siklofosfamid CP ve CP + Baicalin gruplarına dozu literatüre dayanarak dozu 200mg/kg olarak uygulandı (Alkhalaf ve ark., 2020). Baicalin salin ile seyreltilmiş %0,1 dimetilsülfoksit (DMSO) çözeltisi içinde çözdürüldü ve Baicalin ve CP + Baicalin gruplarına literatüre dayanarak dozu 100mg/kg olarak verildi (Fouad ve ark., 2017). Baicalin içermeyen eşit hacimdeki %0,1 DMSO (salin ile seyreltilmiş) çözeltisi kontrol ve CP gruplarına verildi.

Kontrol grubu (n=6) : %0,1 DMSO çözeltisi 6 gün boyunca her gün intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Baicalin grubu (n=6) : Baicalin 6 gün boyunca her gün i.p olarak uygulandı.

CP grubu (n=8) : İlk gün tek doz Siklofosamid ve 6 gün boyunca her gün %0,1 DMSO çözeltisi i.p olarak uygulandı.

CP + Baicalin grubu (n=8) : İlk gün tek doz Siklofosamid ve 6 gün boyunca her gün Baicalin i.p olarak uygulandı.

Tüm sıçanlar araştırmanın başında ve sonunda tartıldı. Her bir hayvanın vücut ağırlığı kazanımı veya kaybı için kilo kaybı veya kazanımı yüzdesi (ağırlık değişimi/ilk ağırlık x100) hesaplandı. Ayrıca deney sonunda sağ testislerin ağırlığı ölçüldü. Deneyin 7.gününde tüm hayvanlar dekapite edildi. Biyokimyasal analizler için kan ve sağ testis dokusu alındı. Histolojik analizler için de sol testis ve epididimis dokusu alındı. Ayrıca, epididimis ile birlikte sol testis sperm ve histopatolojik analiz için çıkarıldı.

5.4. Histolojik Analizler

5.4.1. Sperm sayımı ve morfolojisi

Epididimisin kaudal kısmı sol testisten ayrıldı ve 37°C'ye ayarlanmış bir ısıtıcı üzerindeki bir petri kabında 10 ml PBS solüsyonu içine ekstrakte edilene kadar küçük parçalar halinde kesildi. Elde edilen homojen süspansiyonun 0,5 ml'si 15 dakika inkübasyonun ardından 2 ml PBS ile karıştırıldı. 1000g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 1 ml PBS ile seyreltildi. Son olarak, hazırlanan örneklerden on mikrolitre, literatürde belirtildiği gibi sperm sayımı için Thoma lamına aktarıldı (Wang Y., 2002).

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için sperm yaymalar hazırlandı ve %1 Eosin-Y ile boyandı. İki yüz spermatozoa baş, boyun ve kuyruk morfolojisi açısından fotomikroskop altında x100 objektifte yağ immersiyonu ile incelendi (Sziva ve ark., 2022 ; Gozen ve ark., 2013).

5.4.2. Işık mikroskopik preparasyon ve histolojik skorlama

Deney sonunda alınan sol testis %10 nötral tamponlu formalin solüsyonunda yetmiş iki saat fikse edildi, yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100 alkol) geçirilerek dehidrate edildi, 2x20dk ksilende şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Dört mikrometre kalınlığındaki parafin kesitler genel morfoloji için H&E, bazal membrandaki değişikliği saptamak için Periyodik Asit Schiff (PAS) ile ve bağ dokudaki değişiklikleri göstermek için de Masson'un trikrom kiti ile boyandı. Apoptotik hücrelerin gösterilmesinde TUNEL yöntemi ve proliferatif hücrelerin gösterilmesinde ise PCNA immünohistokimyasal boyaması yapıldı. Boyanan tüm kesitler ışık mikroskobu (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) altında incelendi ve bağlı bir kamera (Olympus DP22, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

Her bir örneğe ait H&E boyalı kesitlerde Image J programı kullanılarak 100 adet seminifer tübül tübülün epitel kalınlığı, çapı ve alanı ölçüldü. Tübülün epitel kalınlığı ve çapı dört farklı tarafın ölçülmesiyle belirlendi. Bu 100 tübüldeki seminifer tübül hasarı ayrıca 1'den (seminifer tübülün germinal epitelinin yokluğu) 10'a (tam spermatogenez) kadar bir ölçeği olan modifiye bir Johnsen skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (Gozen ve ark., 2013 ; Johnsen,1970) (Tablo 1).

Tablo 1 : Modifiye edilmiş Johnsen'ın Skorlama Parametreleri (Johnsen, 1970'den yararlanılarak hazırlanmıştır).

Skor	Histolojik Kriter
10	Tam spermatogenez
9	Hafif bozulmuş spermatogenez, çok sayıda geç spermatid, düzensiz epitel
8	Tübül başına beşten az spermatozoa, az sayıda geç spermatid
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
5	Spermatozoa veya spermatid yok, çok sayıda spermatosit
4	Spermatozoa veya spermatid yok, az sayıda spermatosit
3	Sadece spermatogonyum
2	Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yok

5.4.3. TUNEL yöntemi

Apoptotik DNA fragmentasyonunu tanımlayan terminal dUTP nick-end etiketleme yöntemi üretici firmanın prosedürüne göre uygulandı. Üç µm kalınlığındaki doku kesitleri ksilen ile deparafinize edildikten sonra alkol serilerinden geçirilerek (2x5 dk %100 alkol, 3 dk %95 alkol, 3 dk %70 alkol) PBS ile yıkandı. Kesitler sonrasında Proteinaz K ile inkübe edildi, distile suda yıkandı ve PBS içinde %3 hidrojen peroksit ile muamele edildi. Bir PBS yıkamasının ardından, bir dengeleme tamponuna yerleştirildi, tekrar PBS ile yıkandı ve 36-37 °C'de rekombinant terminal transferaz TdT enzimi ile muamele edildi.

Kesitler yıkama tampon çözeltisi ve distile su ile yıkandıktan sonra anti-digoksinin konjugatı ile inkübe edildi. Kesitler tekrar PBS'de yıkandı ve rengi görselleştirmek için 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ile muamele edildi. Ardından distile suyla yıkandıktan sonra Mayer'in hematoksiyeniyle boyandı, %96'lık etanolden geçirilerek dehidrate edildi, ksilenle ile şeffaflandırıldı ve son olarak entellan ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak seçilen meme dokusuna ait kesite yukarıda belirtilen boyama yöntemi uygulandı.

Apoptotik indeks için her kesitte toplam 20 seminifer tübül incelendi ve üç veya daha fazla TUNEL-pozitif hücreye sahip seminifer tübül sayısının toplam seminifer tübül sayısına oranı olarak hesaplandı (Köroğlu ve ark., 2019).

5.4.4. PCNA immünohistokimyası

Üç µm kalınlığındaki kesitler 37°C'de etüvde bir gece süren inkübasyondan sonra ksilende deparafinize edildi. %100 alkol ve %96 alkolde bekletildikten sonra, kesitler endojen enzim aktivitesini bloke etmek için metanolde hazırlanmış %3 hidrojen peroksit içinde tutuldu. Antijen geri kazanımı için kesitler 20 dakika boyunca sitrat tampon çözeltisi (10 mM, pH 6.0) içinde mikrodalgada inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra, antikorların spesifik olmayan bağlanması için kesitlere protein bloke edici bir solüsyon uygulandı. Nemlendirilmiş bir ortamda, kesitler anti-proliferating cell nuclear antigen (anti-PCNA) primer monoklonal antikorunda (dilüsyon 1: 400) 4°C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübe edildi. PBS ile yıkamanın ardından kesitler anti-polivalent sekonder antikor ile muamele edildi. Kesitler tekrar PBS ile yıkandı ve ardından streptavidin peroksidaz ile inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra lamlara DAB kromojen uygulandı. Mayer'in hematoksiyen zıt boyamasını takiben, %96'lık etanolden geçirilerek dehidrate edilen kesitler ksilenden geçirildi ve son olarak entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın pozitif kontrolünde hiç bir değişiklik yapılmadan yukarıda belirtilen boyama yöntemi ince barsak dokusuna ait kesite uygulandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın negatif kontrolünde primer antikor ile inkübasyon aşamasında antikor yerine diluent solüsyonunda tutulması dışında testis dokusuna ait kesite yukarıda belirtilen aynı boyama yöntemi uygulandı.

Proliferasyon indeks için her kesitte toplam 20 seminifer tübül incelendi ve her bir seminifer tübüldeki PCNA-pozitif hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı olarak hesaplandı (Köroğlu ve ark., 2019).

5.5. Biyokimyasal Analizler

5.5.1. Testis dokusunda biyokimyasal analizler

Deney sonunda çıkarılan sağ testis dokusu, PBS tamponu ile yıkanarak tartıldı ve ölçümler yapılana kadar -80° C’de saklandı. Biyokimyasal ölçümler yapılacağı gün -80’den çıkarılan dokular soğuk 150 mM KCl çözeltisiyle homojenize edilerek %10’luk doku homojenatı hazırlandı.

5.5.1.1. Doku süperoksid dismutaz aktivitesinin ölçümü

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin foto-oksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD’un etkisiyle hidrojen peroksite (H₂O₂) dönüşür. H₂O₂ ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Mylroie ve ark.,1986).

Gerekli Çözeltiler:

Fosfat Tamponu (50 mM, pH = 7,8): 0.136 gram KH₂PO₄ ve 0,697 gram K₂HPO₄ tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülüp, birleştirildi ve hacmi distile su ile 100 ml’ye tamamlandı. Hacim 100 ml’ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilip, pH 7,8’e ayarlandı. 2°C de saklandı.

Fosfat tamponu + 0,1 mM lık Na-EDTA: 0,0037 gram Na-EDTA tartıldı biraz 50 mM’lık fosfat tamponunda çözüldü ve hacmi 50 mM’lık fosfat tamponu ile 100 ml’ye tamamlandı.

Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7,5): 0,041 gram KH₂PO₄ ve 0,122 gram K₂HPO₄ tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülüp birleştirildi ve hacmi distile su ile 100 ml’ye tamamlandı. Hacim 100 ml’ye tamamlanmadan önce pH kontrol edildi, pH 7,5’a ayarlandı. 2°C de saklandı.

Riboflavin (0,2 mM): 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10 mM’lık, pH = 7,5) çözüldü.

o-dianisin (6 mM): 19 mg o-dianisinx2HCl 10 ml distile suda çözüldü. HCl’li o-dianisin kullanılmalı ya da HCl ile birlikte çözülmelidir.

SOD (120 IU /ml) stok standardı (Sigma S-2515-3000 U): Liofilize SOD standardı 120 IU /ml olacak şekilde soğuk distile su ile çözüldü. Daha sonra bu stok standarttan uygun hacimler alınarak deney ortamında 3, 6, 9, 12 ünite SOD olması sağlandı.

Deneyin Yapılışı:

%10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant alındı, tam veya 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışıldı. Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alındı.

Tablo 2. SOD aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune	Standart 3 U	Standart 6 U	Standart 9 U	Standart 12 U	Kör
Fosfat Tamponu (pH = 7.8)	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
o-dianisidin	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Distile Su	--	0,075 ml	0,05 ml	0,025 ml	--	0,1 ml
Stok standart (120 U/ml)	--	0,025 ml	0,05 ml	0,075ml	0,1ml	--
Dilue süpernetant	0,1 ml	--	--	--	--	--
Her tüpe 30 sn ara ile 0,2 ml riboflavin konup, karıştırıldı. 460 nm ‘de abs okundu.						
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edildi. 460 nm’de abs okundu. Lamba 20’ önceden açıldı ve ısınması sağlandı.						

5.5.1.2. Doku katalaz seviyesinin ölçümü

Katalaz (CAT) enzimi; H_2O_2 ’nin, H_2O ’ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm’de absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk’da absorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir (Aebi, 1974).

Gerekli Çözeltiler:

- **Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0):** a) 6,81 g KH_2PO_4 ve b) 8,90 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ tartılıp ayrı ayrı biraz distile suda çözüldükten sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml’ye

tamamlandı. Kullanılacağı vakit a'dan 1 hacim b'den 1.5 hacim alınarak karıştırıldı (pH=7,0 olmalı). 2°C'de saklandı. Fosfat tamponu bakteriyal kontaminasyon olmadığı sürece stabildir, kullanılabilir.

➤ **H₂O₂ çözeltisi (30 mM) + Fosfat tamponu:** Yoğunluğu d=1,11 g/ml olan %30 g'lık H₂O₂ çözeltisinden 0,31 ml alındı ve 50 mM'lık fosfat tamponu (pH=7,0) ile 100 ml'ye seyreltildi.

➤ **Doku homojenatı:** Doku serum fizyolojik ile homojenize edildi.

Deneyin Yapılışı:

%10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 1/10, 1/20 veya 1/50 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışıldı. Aşağıdaki gibi çalışıldı.

Tablo 3. CAT aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune	Kör
Fosfat tamponu	-	0,2 ml
Dilue süpernatant	0,4 ml	0,4
H ₂ O ₂ çözeltisi + fosfat tamponu	0,2 ml	--

İlave edilip, karıştırıldı. 1 dk. sonra 240 nm de absorbansları okunarak kaydedildi. Sonuçlar bu deney için ekstinksiyon katsayısı 0,004 (0,00394) mM⁻¹/ mm⁻¹ göz önüne alınarak hesaplandı.

5.5.1.3. Doku glutatyon-s-transferaz aktivitesinin ölçümü

Glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi tayini, glutatyon (GSH) ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

Gerekli çözeltiler:

➤ **Sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH= 6.5):** 0,534gram Na₂HPO₄.2H₂O ve 2,3 gram KH₂PO₄ ayrı ayrı biraz distile suda çözüldü ve birbirine karıştırıldı ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilip, pH 6,5 'e ayarlandı. 2°C'de saklandı.

➤ **GSH (60 mM):** 1,84 gram glutatyon biraz distile suda çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Taze hazırlandı.

➤ **1-klor-2,4-dinitro-benzen (CDNB) (60 mM):** Absolü etanolde taze hazırlandı. 1,22 gram CDNB tartıldı ve biraz etanolde çözüldü. Sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Taze hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

%10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant alınıp ve 1/300 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışıldı. Numune ve kör olarak işaretlenmiş iki tüp alındı ve aşağıdaki gibi çalışıldı.

Tablo 4. GST aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune	Kör
Dilue süpernatant	0,5 ml	--
SF veya Distile Su	--	0,5 ml
Fosfat Tamponu	1,5 ml	1,5 ml
GSH çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
CDNB çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
Distile su	0,90 ml	0,90 ml
Toplam Hacim	3 ml	3 ml

Karıştırıldı ve 3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm'de (25 °C) absorbansları izlenip, kaydedildi. Absorbans artışı hesaplandı.

Glutasyon ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstrinksiyon katsayısı $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar hesaplandı. Enzimsel konjugasyon sonucundan, enzimsel olmayan konjugasyon değerleri çıkarıldı.

5.5.1.4. Doku glutasyon seviyesinin ölçümü

Testis örneklerinin GSH düzeylerini belirlemek için Beutler'in (1975) yöntemi kullanıldı. Protein çökeltmesi için metafosforik asit ve sarımsı renk vermesi için 5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik kullanılarak oluşan rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması esasına dayanır.

Gerekli Çözeltiler:

- %10'luk triklor asetik asit
- %1'lik trisodyum sitrat
- %0,4'lük 5,5'-DTNB
- 0,3 M disodyum hidrojen fosfat

Tablo 5. GSH seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune	Kör
%10'luk doku homojenatı	500µl	-
Na ₂ HPO ₄ (0,3M)	4mL	4 mL
DTNB	500µL	500µL
Distile su	-----	500µL

Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta %10'luk triklor asetik asit çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar 3000 rpm'de, 4 °C'de, 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Açık renkli süpernatant numuneleri GSH analizinde kullanıldı. Hesaplama için $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılmış ve sonuçlar mg GSH/g protein olarak ifade edildi.

5.5.1.5. Doku malondialdehit seviyesinin ölçümü

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır (Ledwozyw ve ark., 1986).

Gerekli Çözeltiler:

TBA çözeltisi (0,047 M): 500 mg TBA ile 6 ml 1 M'lık NaOH ile karıştırıldı. Üzerine 69 ml distile su ilave edildi.

NaOH (1 M): 4 gram NaOH tartılıp, biraz distile suda çözüldü, hacmi 100 ml ye distile su ile tamamlandı.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1,22 M, 0,6 M HCl deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HC (%37 glık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırıldı ve hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

n-bütanol : Orijinal şişesinden kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlendi ve aşağıdaki gibi çalışıldı:

Tablo 6. MDA seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0,25 ml	-
Distile su	-	0,25 ml
TCA	1,25 ml	1,25 ml
Vortekste karıştırıldı ve 15 dk bekletildi.		
TBA	0,75 ml	0,75 ml
Vorteks ile karıştırıldı ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi.		
n-butanol	2 ml	2 ml

İlave edildi. Vortekslenip ve 10 dk. 3000 rpm’de santrifüj edildi. Bütanol fazı alınarak 532 nm’de köre karşı absorbanlar kaydedildi. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplandı.

5.5.1.6. Doku total oksidan seviyesi tayini

Erel’in yöntemine dayanan total oksidan seviyesi (TOS) tayini, 2,2-Azino-bis 3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonik asidin (ABTS) ayırt edici rengini ağartılmasına dayanır. Numunenin antioksidanları, konsantrasyonlarına göre ağartma işlemini hızlandırmaya yardımcı olur. Ağartma oranı numunenin TAC değeriyle ters orantılıdır ve bu reaksiyon spektrofotometrik olarak değerlendirilebilir (Erel, 2004).

Gerekli Çözeltiler:

Reaktif 1 (Asetat tamponu (0,4 M pH=5,8)): 5 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 0,188 ml CH_3COOH bir miktar distile suda çözüldü. Daha sonra hacimleri distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.

Asetat tamponu (30 mM pH=3,6): 0,027 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 0,16 ml CH_3COOH bir miktar distile suda çözüldü. Daha sonra hacimleri distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.

Fosfat tamponu (30 mM, pH 7.4): 0,34 g Na_2HPO_4 ve 0,091 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartıldı, ayrı ayrı bir miktar distile suda çözüldü, birleştirildi ve distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

H_2O_2 çözeltisi (2 mM): %30 g'lık yoğunluğu $d=1,11 \text{ g/mL}$ olan H_2O_2 çözeltisinden 0,204 mL alınarak hacim asetat tamponu (30 mM, pH 3,6) ile 1 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 3 defa 1/10 oranında asetat tamponu (30 mM, pH 3,6) ile seyreltilti.

Reaktif 2 (ABTS) (10 mM): 5 g ABTS tartılarak 10 mL H_2O_2 çözeltisi (2 mM) içinde çözüldü.

Stok standart (6 mM): 15 mg Trolox tartılarak 10 mL fosfat tamponunda (30 mM, pH:7,4) çözüldü.

Çalışma Standartları: 6 mM'lik stok Trolox çözeltisinden fosfat tamponu ile (30 mM, pH:7,4) uygun seyreltmelerle 0,5, 1, 2 ve 3 mM'lik çalışma standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

%10 g'lık doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant alındı ve aşağıdaki gibi çalışıldı.

Tablo 7. TOS seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune körü	Numune
Reaktif 1	200 μl	200 μl
Standart / Süpernatant	5 μl	5 μl
Reaktif 2	-	20 μl
	Karıştırılır, 660 nm'de ilk absorban okundu.	Karıştırılır, 5 dk inkübe edildikten sonra 660 nm'de son absorban okundu.
Son okunan absorbanstan ilk okunan absorban değeri çıkarıldı. Çizilen standart grafiği yardımıyla total antioksidan seviyesi mmol Trolox equiv/L olarak hesaplandı.		

5.5.1.7. Doku total antioksidan kapasitesi tayini

Total antioksidan kapasitesi (TAC) Erel'in yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Numunedeki demir iyonu-o-dianisidin kompleksi, oksidanlar tarafından ferrik iyonlara oksitlenir. Reaksiyon ortamındaki gliserol moleküllerinin varlığı oksidasyonu hızlandırır.

Asidik bir ortamda, ferrik iyon ve xinolol turuncusu birleşerek renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğunun spektrofotometrik ölçümü numunedeki toplam oksidan molekül miktarı ile ilişkilidir (Erel, 2005).

Gerekli Çözeltiler:

Gliserol çözeltisi (25 mM): %98'lik yoğunluğu 1,23 g/mL olan gliserol çözeltisinden 11,4 mL alınarak hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

H₂SO₄ çözeltisi (25 mM): Bir miktar distile su üzerine %98'lik yoğunluğu 1,84 g/mL olan H₂SO₄ çözeltisinden 0,136 mL ilave edildi. Daha sonra hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Reaktif 1: 0,818 g NaCl ve 11,41 mg xyhenol orange ayrı ayrı bir miktar H₂SO₄ çözeltisinde (25 mM) çözüldü. Daha sonra birbirine karıştırıldı. %98'lik yoğunluğu 1,23 g/mL olan gliserol çözeltisinden 11,4 mL alınarak çözeltiye eklendi ve hacim H₂SO₄ çözeltisi (25 mM) ile 100 mL'ye tamamlandı.

Çalışma Standartları: %30'luk yoğunluğu 1,11 g/mL olan H₂O₂ çözeltisinden distile su ile uygun seyreltmelerle 12,5, 25 ve 50 µM'lık çalışma standartları hazırlanır.

Reaktif 2: 0,317 g o-dianisidin-HCL ve 0,196 g ferroz amonyum sülfat ayrı ayrı bir miktar H₂SO₄ çözeltisinde (25 mM) çözüldü. Daha sonra birbirine karıştırıldı ve hacim H₂SO₄ çözeltisi (25 mM) ile 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

%10 g'lık doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant alındı ve aşağıdaki gibi çalışıldı.

Tablo 8. TAC seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune körü	Numune
Reaktif 1	225 µl	225 µl
Standart / Süpernatant	35 µl	35 µl
Reaktif 2	-	11 µl

Tablo 8. TAC seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler (devam)

	Karıştırılır, 560 nm’de ilk absorbans okundu.	Karıştırıldı, 3-4 dk inkübe edildikten sonra 560 nm’de son absorbans okundu.
Son okunan absorbanstan ilk okunan absorbans değeri çıkarıldı. Çizilen standart grafiği yardımıyla total oksidan seviyesi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ olarak hesaplandı.		

5.5.1.8. Oksidatif stres indeksi

TOS’un TAC seviyesine yüzde oranı oksidatif stres indexi (OSI) olarak kabul edilmiştir. OSI’nin hesaplanması için elde edilen TAC birimi mmol/L olarak değiştirilmiş ve OSI değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Harma ve Erel, 2003).

OSI (Oksidatif stres indexi) : TOS (mol hidrojen peroksit Eq/L) / TAC (mmol Trolox Eq/L)

5.5.1.9. Doku siyalik asit tayini

Siyalik asit (SA), periyodik asit oksidasyonuna uğrayarak, β -formilpürivik asit oluşur. Bu bileşik 2 mol tiyobarbütirik asit ile reaksiyonlaşarak, 549 nm’de maksimum absorbans veren renkli bir bileşik oluşturur. Bu ürün stabil değildir, bu nedenle siklohegzanon fazına çekilir. Oluşan rengin şiddeti 549 nm’de maksimum absorbansa sahiptir (Warren, 1959).

Gerekli Çözeltiler:

1 N H₂SO₄: 1 L’lik bir ölçü distile su ilave ettikten sonra üzerine 5,42 ml derişik kabına bir miktar sülfürik asit konur ve hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

0,2 M Sodyum meta periyodat (9 M Fosforik asit içerisinde): 250 ml’lik balona belli bir miktar distile su ilave edilir. Suyun üzerine ml 151,7 mg fosforik asit ilave edilip karıştırılır. Bu karışımın üzerine 10,695 gram sodyum- metaperiyodat ilave edilir, karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacim, distile su ile 250 ml’ye tamamlanır.

0,5 M sodyum sülfat (0,1 N H₂SO₄ içerisinde) :500 ml’lik bir balon jojeye 35,51g sodyum sülfat bir miktar 0,1N sülfürik asit içinde çözüldükten sonra hacim 500 ml’ye 0,1N sülfürik asit ile tamamlanır.

%10 g Sodyum arsenit (0,1N sülfürik asitte hazırlanan 0,5 M sodyum sülfat içerisinde): 10 g sodyum arsenit tartılır bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözülür, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 ml’ye tamamlanır.

%0,6 g TBA (0,1N sülfürik asitte hazırlanan 0,5 M sodyum sülfat içerisinde): 0,6 g TBA tartılır bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözülür, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 ml'ye tamamlanır (Kullanılacağı zaman taze hazırlanır).

Sikloheksanon: Direk olarak orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

%10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 3000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant ayrılır. 180 µl 0,1 N H₂SO₄ ile 20 µl süpernatant karıştırılır, tüplerin ağzı kapatılarak 1 saat 80 °C'de etüvde hidroliz edilir. Elde edilen hidrolizat numune olarak işaretlenmiş bir deney tüpüne koyularak aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 9. Siyalik asit seviyesi tayininde kullanılan çözeltiler

	Numune	Kör
Hidrolizat	0,2 mL	-
0,2 M sodyum metaperiyodat	0,1 mL	-
20 dakika oda sıcaklığında bekletilir.		
%10 sodyum arsenit	1 mL	
Meydana gelen sarı renk kayboluncaya kadar çalkalanır.		
% 0,6 g TBA	3 mL	-
100 C° 'lık su banyosunda 15 dakika bekletilir. Bu süre sonunda tüpler su banyosundan alınarak buzlu su içinde oda ısısına soğutulur.		
Sikloheksanon	-	4,3 mL

Kör olarak sigloheksanon kullanılır. Organik fazın renk şiddeti 549 nm de okunur. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı (57000/m⁻¹cm⁻¹) kullanılarak mg siyalik asit/g protein cinsinden hesaplanır.

5.5.2. Serumda biyokimyasal analizler

5.5.2.1. Serumda testosteron, LH ve FSH ölçümü

Deney sonunda alınan kan örnekleri 3000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildi ve ayrılan serum örnekleri çalışma yapılncaya kadar -20°C’de saklandı. Sıçan serumundaki testosteron (BT Lab, E0259Ra), luteinleştirici hormon (LH) (BT Lab, E0179Ra) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) (Elabscience, E-EL-R0391) seviyeleri, üretici firmanın prosedürüne göre enzime bağlı immünosorbent analizleri (ELISA) yöntemi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar testosteron için ng/L olarak ; FSH ve LH için ise mU/L olarak hesaplandı.

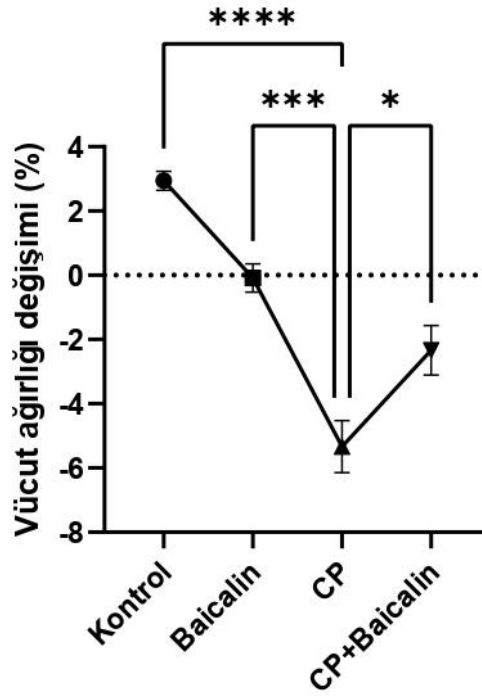
5.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalar GraphPad 9.0 yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Shapiro-Wilk testi ile verilerin normal dağılımı doğrulandıktan sonra, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verildi. $P < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

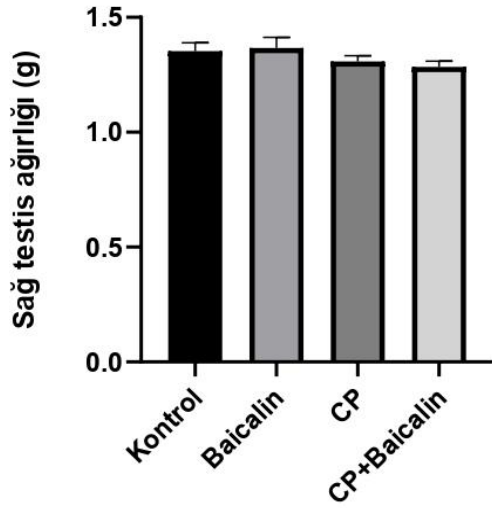
Sıçan vücut ağırlığındaki değişim yüzdesi kontrol grubunda $2,940 \pm 0,29$, baicalin grubunda $0,083 \pm 0,44$, CP grubunda $-5,333 \pm 0,81$ ve CP+Baicalin grubunda $-2,338 \pm 0,77$ 'dir. CP grubunun sıçan vücut ağırlığındaki değişim yüzdesinde kontrol ve baicalin grupları ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,001$). CP+Baicalin grubunun sıçan vücut ağırlığındaki değişim yüzdesinde CP grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$) (Şekil 12).



Şekil 12. Deney gruplarında sıçan vücut ağırlığındaki değişim yüzdesi. *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$.

6.2. Testis Ağırlığı Bulguları

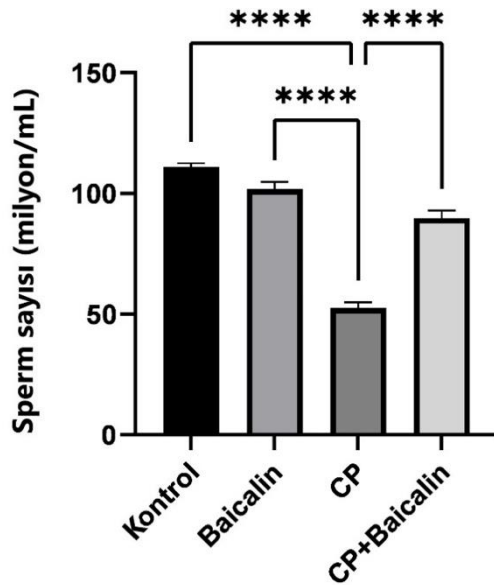
Kontrol grubunda testis ağırlığı $1,354 \pm 0,036$ gr, baicalin grubunda $1,367 \pm 0,045$ gr, CP grubunda $1,308 \pm 0,024$ gr ve CP+Baicalin grubunda $1,285 \pm 0,025$ gr'dır. Tüm gruplar arasında testis ağırlığında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 13).



Şekil 13. Deney gruplarındaki sıçanların sağ testis ağırlığı

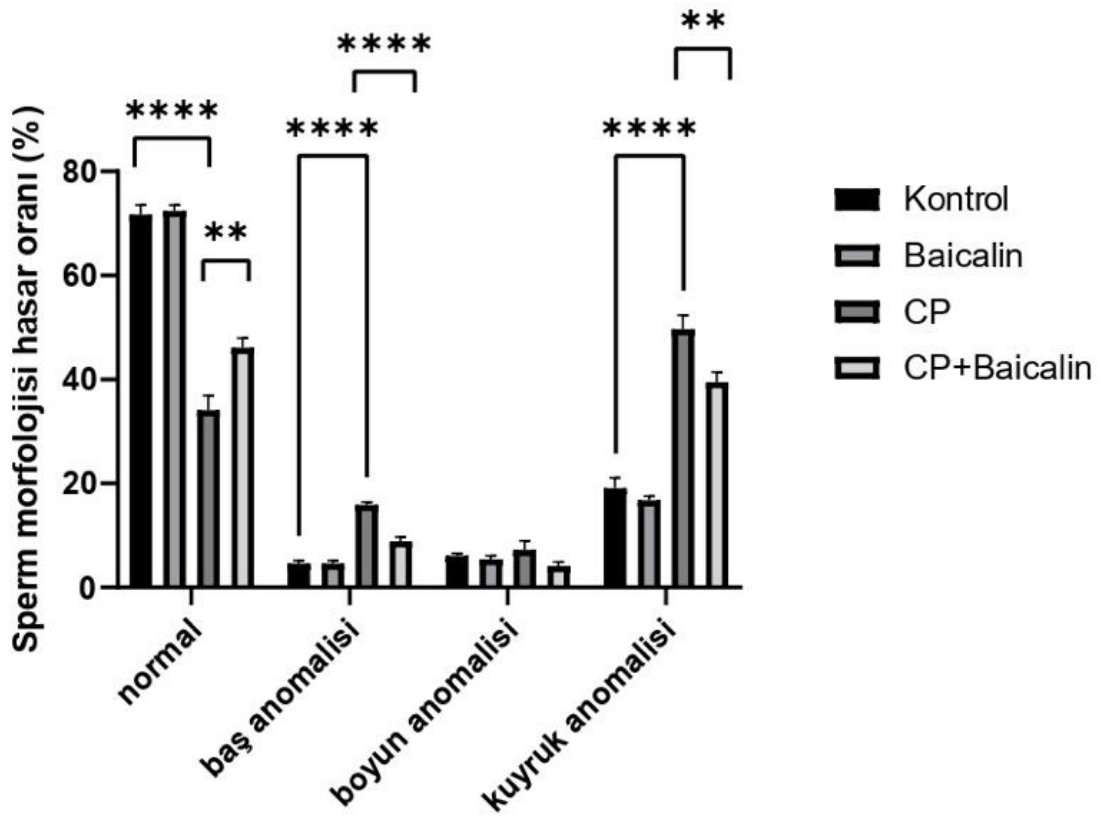
6.3. Sperm Sayımı ve Morfolojik Değerlendirmesi

Epididimal sperm sayısı kontrol grubunda $111 \pm 3,8$ milyon/mL, baicalin grubunda $101 \pm 7,1$ milyon/mL, CP grubunda 52 ± 7 milyon/mL ve CP+Baicalin grubunda $89,7 \pm 8,9$ milyon/mL'dir. CP grubundaki sperm sayının kontrol ve baicalin gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ($p < 0,0001$). CP+Baicalin grubunda ise CP grubuna kıyasla sperm sayısında anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 14).

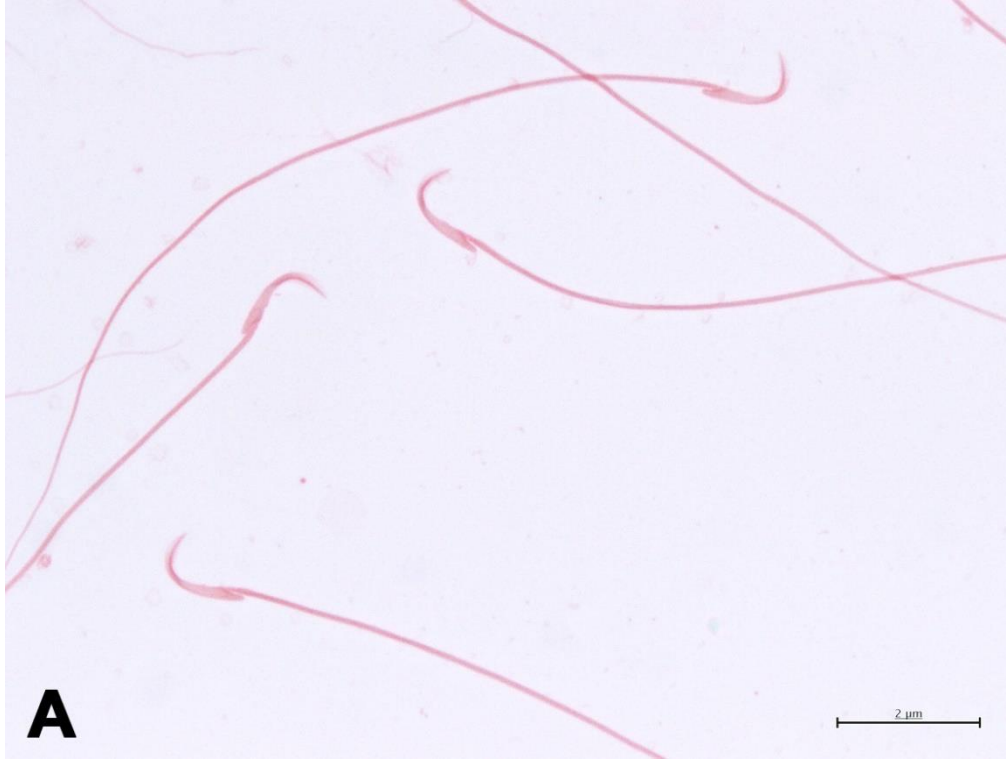


Şekil 14. Deney gruplarındaki sıçanların sperm sayıları. ****: $p < 0,0001$.

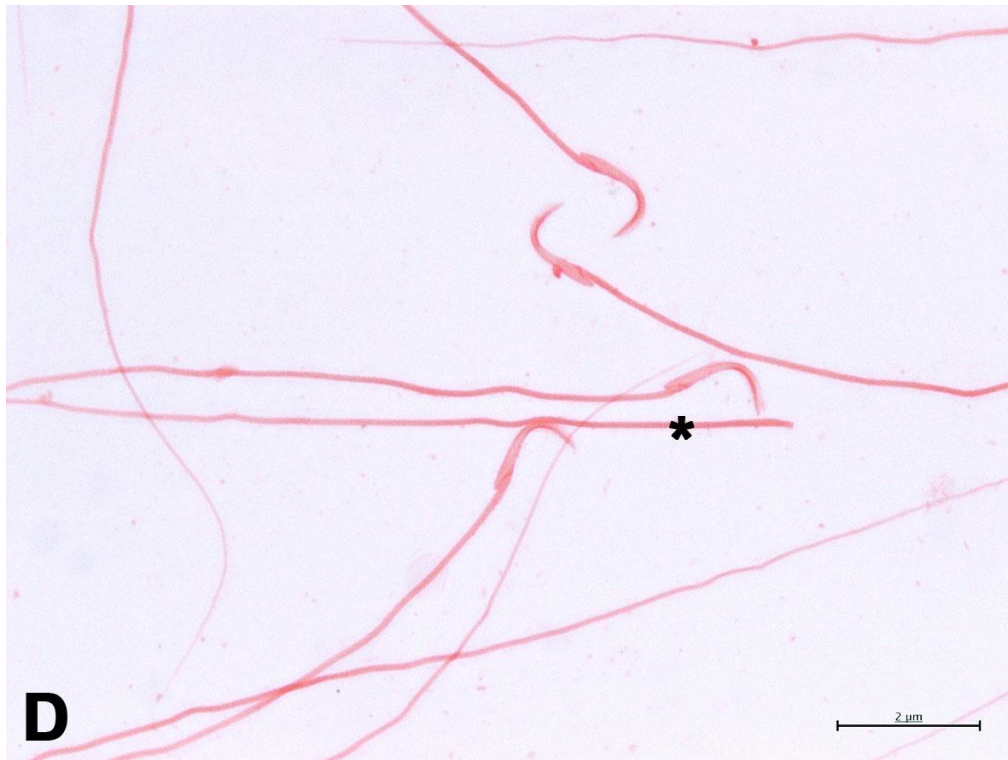
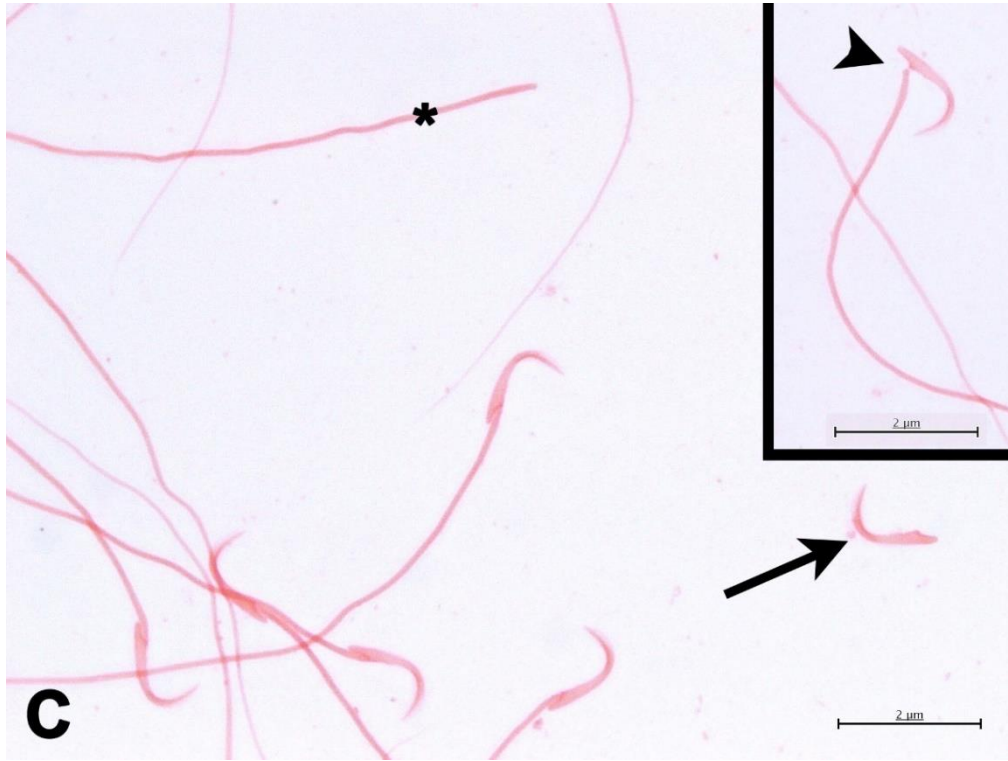
Kontrol ve baicalin gruplarında normal morfolojiye sahip spermelerin yanı sıra az sayıda baş, boyun ve kuyruk anomalisine sahip spermeler gözlemlendi. Kontrol ve baicalin grupları ile karşılaştırıldığında, CP grubunda normal morfolojiye sahip sperm oranında anlamlı bir azalma ($p<0,0001$), baş anomali ($p<0,0001$) ve kuyruk anomali ($p<0,0001$) oranlarında ise anlamlı bir artış tespit edildi. CP+Baicalin grubunda ise CP grubuna göre normal morfolojiye sahip sperm oranında anlamlı bir artış ($p<0,01$), baş anomali ($p<0,0001$) ve kuyruk anomali ($p<0,01$) oranlarında anlamlı bir azalma saptandı (Şekil 17).



Şekil 15. Deney gruplarının spermelerinde morfolojik hasar oranı (%). **: $p<0,01$, ****: $p<0,0001$.



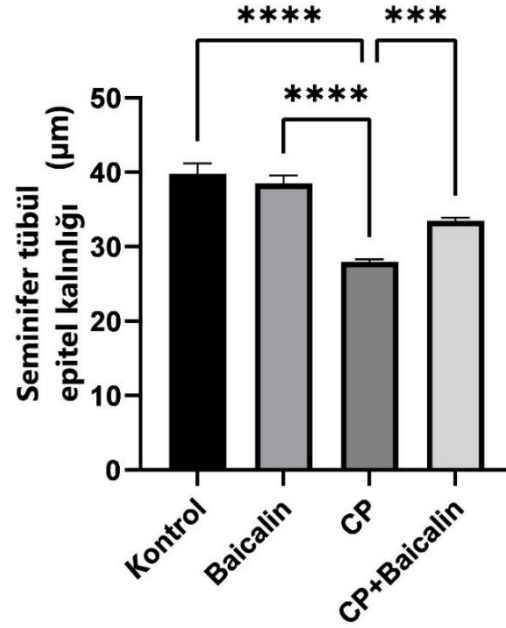
Şekil 16. Kontrol ve baicalin gruplarına ait Eozin Y ile boyalı spermatozoaların temsili ışık mikrogramları. Kontrol **(A)** ve baicalin **(B)** grubunda normal morfolojide spermatozoalar görülmektedir. Orijinal büyütme: x1000.



Şekil 17. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait Eozin Y ile boyalı spermatozoaların temsili ışık mikrografları. CP (**C**) grubunda baş (*), boyun (**ok başı**) ve kuyruk (**ok**) anomalisine sahip spermatozoa görülmektedir. CP+Baicalin (**D**) grubunda normal morfolojide olan spermatozoalar ve baş (*) anomali olan spermatozoa görülmektedir. Orijinal büyütme: x1000, İncet C: x1000.

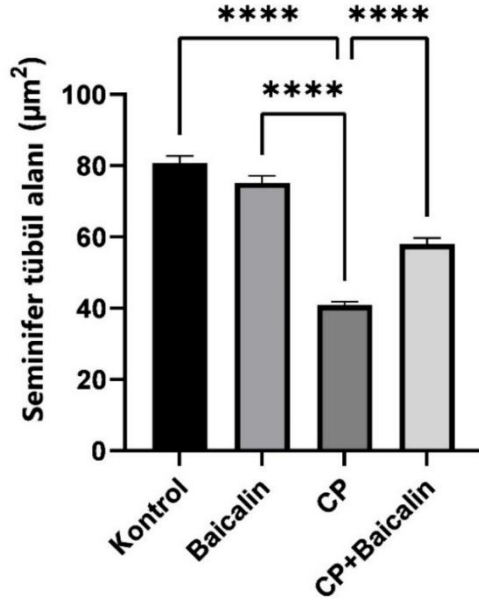
6.4. Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı, Alanı ve Çapı

Kontrol grubunda seminifer tübül epitel kalınlığı $39,78 \pm 1,39 \mu\text{m}$ iken baicalin grubunda $38,47 \pm 1,07 \mu\text{m}$, CP grubunda $27,99 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ve CP+Baicalin grubunda $33,47 \pm 0,42 \mu\text{m}$ 'dir. Kontrol ve baicalin gruplarına kıyasla CP grubunda seminifer tübül epitel kalınlığında anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,0001$). CP+Baicalin grubunda ise CP grubuna kıyasla seminifer tübül epitel kalınlığında anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil 18).



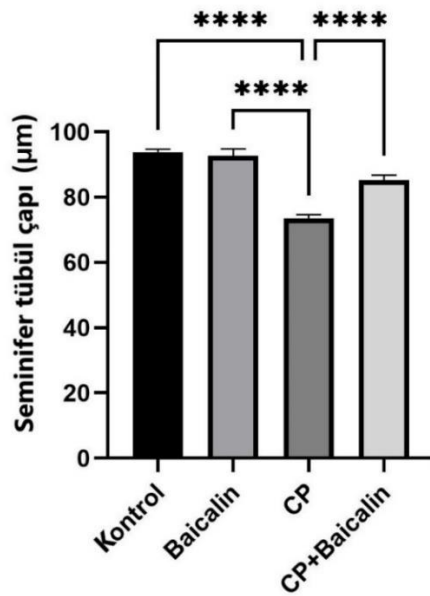
Şekil 18. Deney gruplarındaki sıçanlara ait seminifer tübül epitel kalınlığı. ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$.

Kontrol grubunda testis seminifer tübül alanı $80,67 \pm 2,02 \text{ mm}^2$ iken baicalin grubunda $75,17 \pm 1,95 \text{ mm}^2$, CP grubunda $40,88 \pm 0,87 \text{ mm}^2$, ve CP+Baicalin grubunda $58,00 \pm 1,71 \text{ mm}^2$ dir. Kontrol ve baicalin grupları ile kıyaslandığında CP grubunda seminifer tübül alanında anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,0001$). CP+Baicalin grubunda ise CP grubuna göre seminifer tübül alanında anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,0001$) (Şekil 19).



Şekil 19. Deney gruplarına ait seminifer tübül alanı. ****: $p < 0,0001$

Kontrol grubunda seminifer tübül çapı $93,83 \pm 0,89 \mu\text{m}$ iken, baicalin grubunda $92,67 \pm 2,08 \mu\text{m}$, CP grubunda $73,50 \pm 1,11 \mu\text{m}$ ve CP+Baicalin grubunda $85,24 \pm 1,55 \mu\text{m}$ 'dir. Kontrol ve baicalin grupları ile kıyaslandığında CP grubunda seminifer tübül çapında anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0,0001$). CP+Baicalin grubunda ise CP grubuna kıyasla seminifer tübül çapında anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 20).



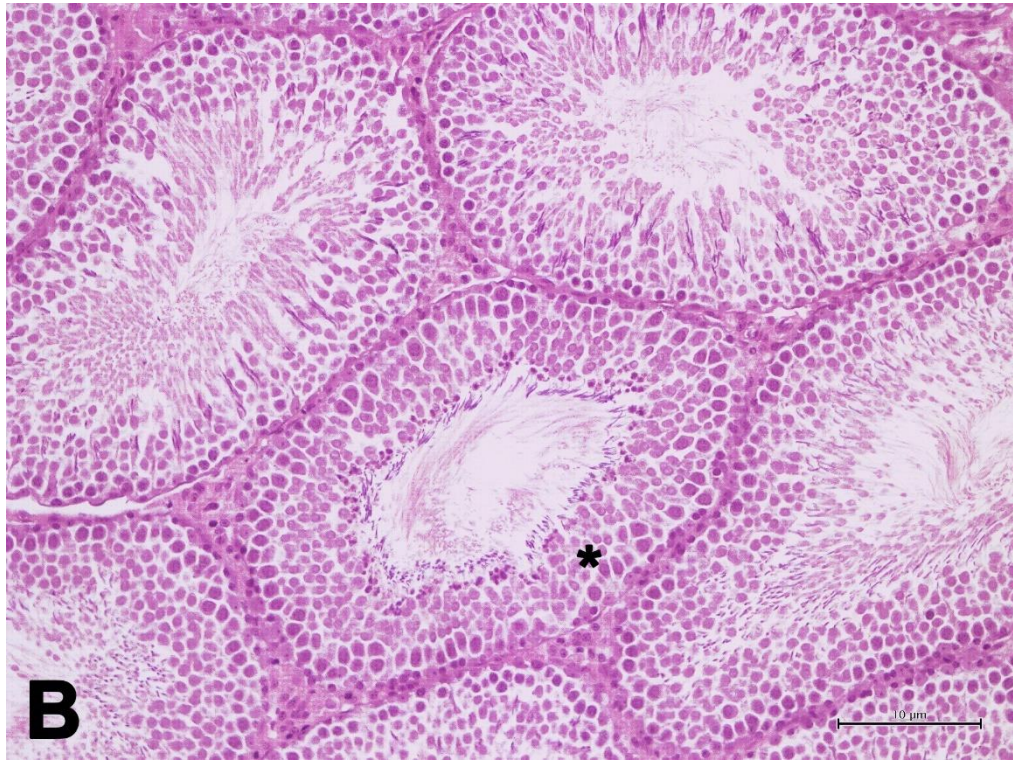
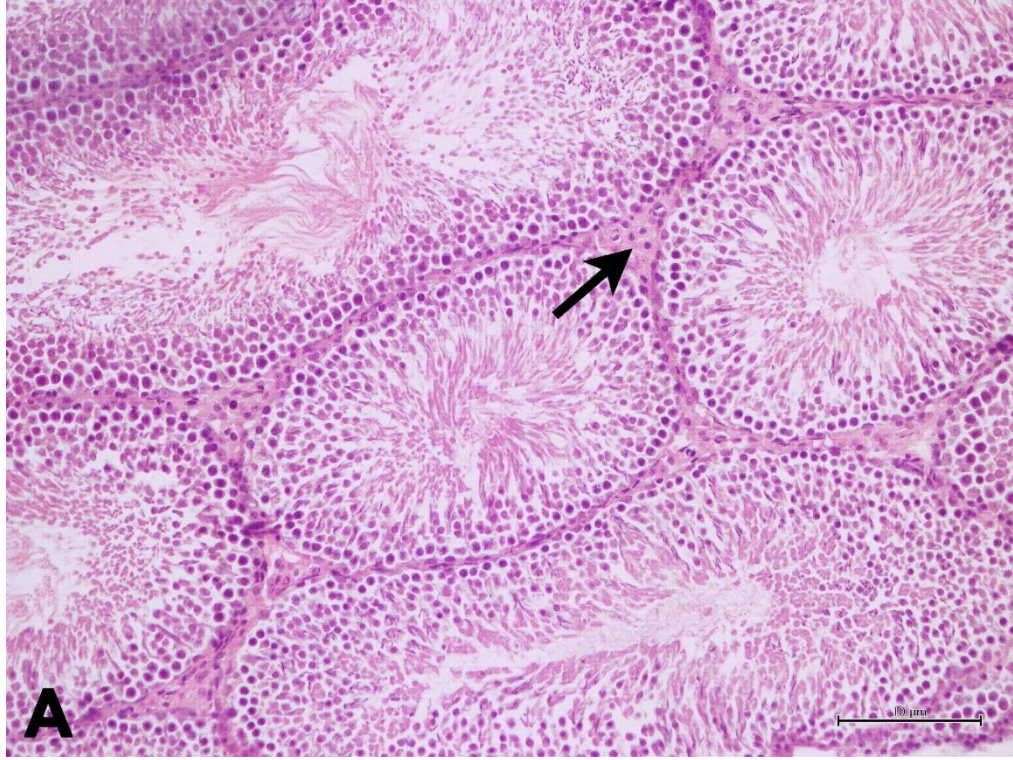
Şekil 20. Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı. ****: $p < 0,0001$

6.5. Morfolojik Bulgular

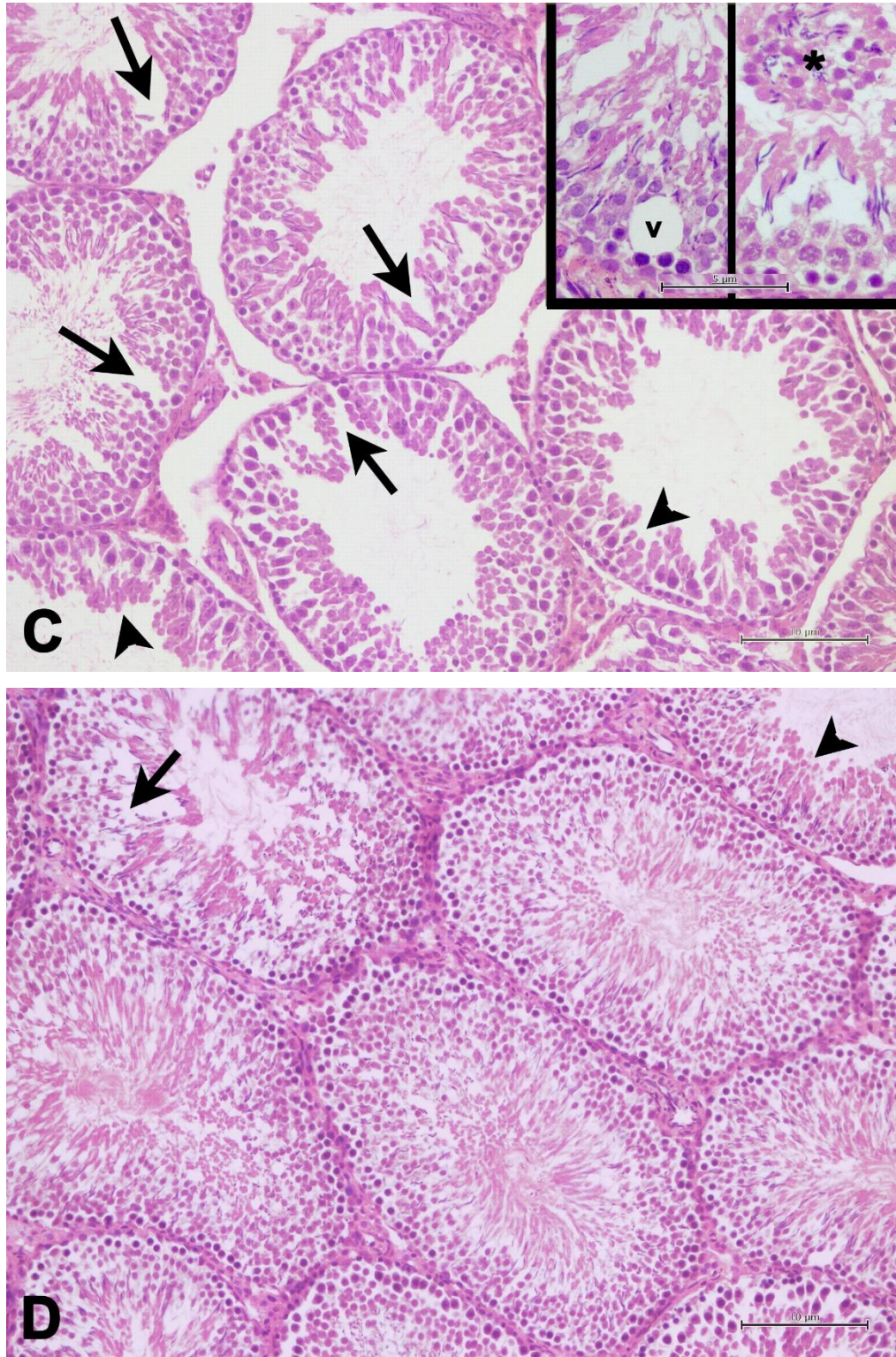
Testis dokusunun genel morfolojisini değerlendirmek için H&E ile boyalı kesitler incelendiğinde kontrol grubunda düzenli seminifer tübül yapısı içeren içeren normal testis morfolojisi izlendi. Seminifer tübüllerin spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatid şeklinde düzenli bir şekilde sıralanan spermatogenik seri hücreleri ve Sertoli hücrelerinden oluşan düzgün bir germinal epitel içerdigi ve bir çoğunun da lümeninde spermilerin olduğu gözlemlendi. Baicalin grubunda kontrol grubuna benzer bir şekilde normal morfolojiye sahip testis dokusu izlendi (Şekil 21, A ve B). CP grubunda ise bir çok alanda seminifer tübüllerde dejenerasyon tespit edildi. Seminifer tübüllerde spermatogenik serideki hücre sayısında azalma ile birlikte düzensiz bir germinal epitel gözlemlendi. Germinal epitel hücreleri arasında dilatasyon ve vakuol oluşumu yanı sıra lümeninde germ hücre döküntülerine rastlanıldı (Şekil 22, C). CP+Baicalin grubunda oldukça düzenli morfolojiye sahip seminifer tübüllerin yanı sıra bazı tübüllerde hafif derecede bir dejenerasyon izlendi. (Şekil 22, D).

Bazal membran yapısını değerlendirmek için PAS ile boyalı kesitler incelendiğinde kontrol grubunda seminifer tübülleri düzgün ve kesintisiz olarak çevreleyen düzenli bir bazal membran yapısı izlendi (Şekil 23, A ve B). Baicalin grubunda kontrol grubuna benzer bir şekilde bazal membranın düzenli yapısı izlendi. CP grubunda ise birçok alanda seminifer tübüllerin yer yer kesintili ve ondülasyon gösteren düzensiz bazal membran yapısı ile çevrelendiği tespit edildi. (Şekil 24, C). CP+Baicalin grubunda seminifer tübüllerin oldukça düzenli bir bazal membran ile çevrelenmesinin yanı sıra bazı tübüllerde yer yer düzensiz bazal membran yapısı izlendi (Şekil 24, D).

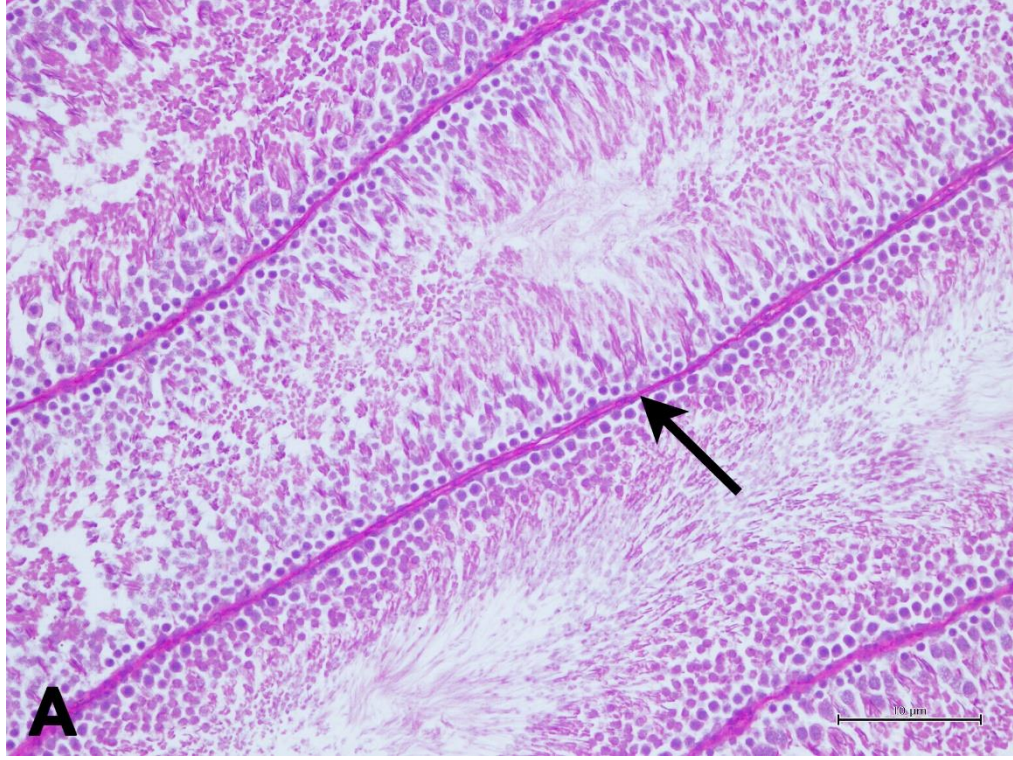
Masson'un üçlü boyası testis dokusundaki bağ dokusu yapısını incelemek için kesitlere uygulandı (Şekil 25 ve Şekil 26). Tüm gruplara ait testis dokularında normal bağ dokusu yapısı izlendi.



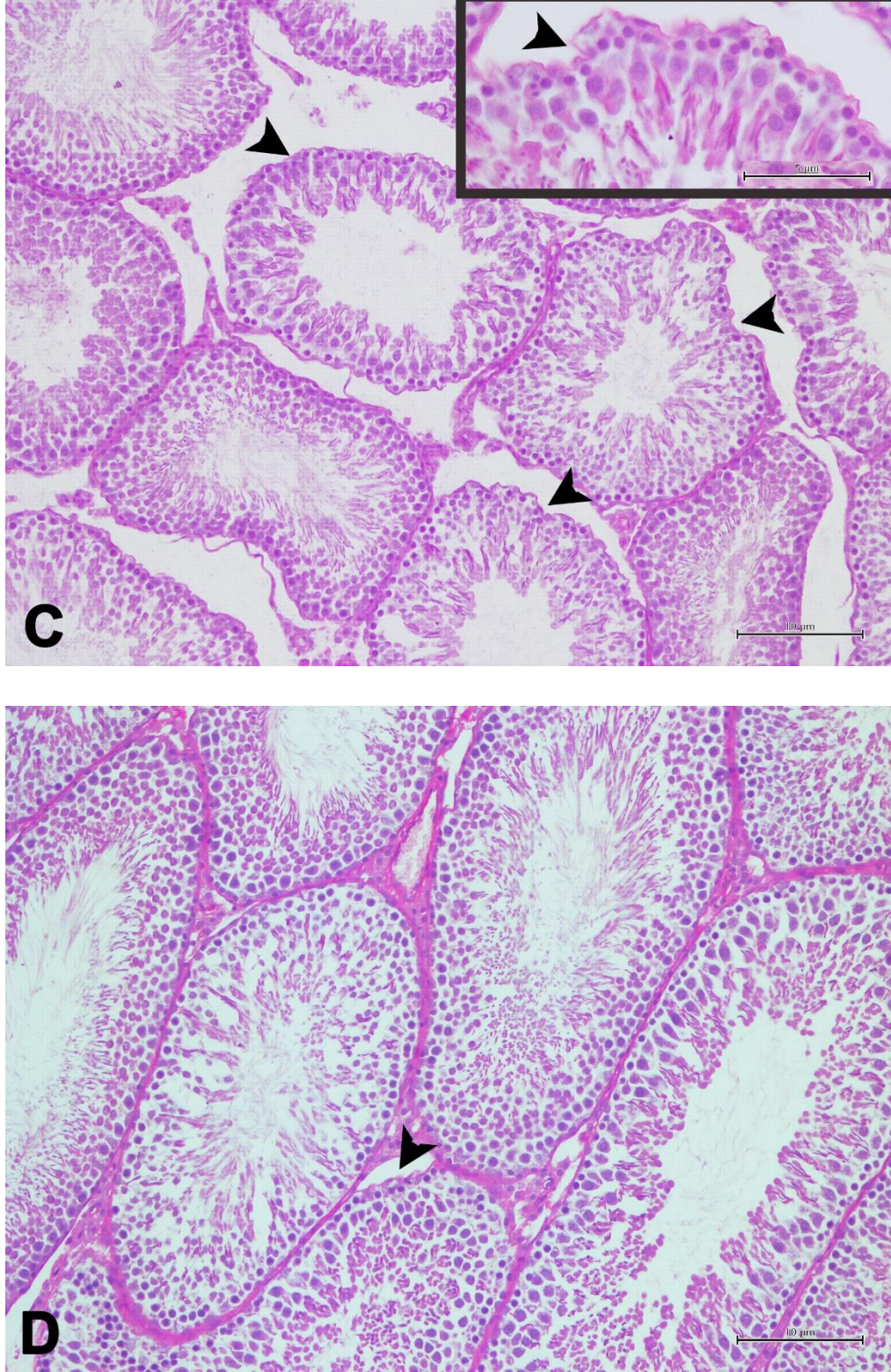
Şekil 21. Kontrol ve baicalin gruplarına ait H&E ile boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları. Kontrol (**A**) ve baicalin (**B**) gruplarında spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid, spermatozoa ve Sertoli hücrelerden oluşan germinal epitelin (*****, **B**) ve Leydig hücrelerin (**ok**, **A**) düzenli yapısı görülmektedir. Orijinal büyütme: x200.



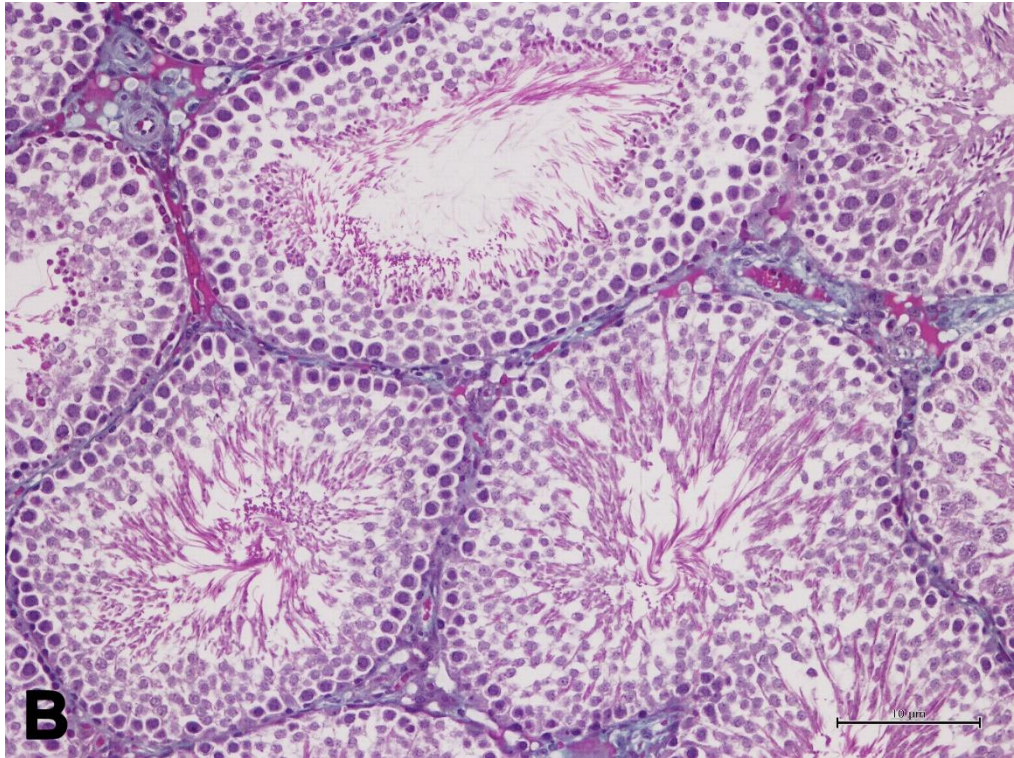
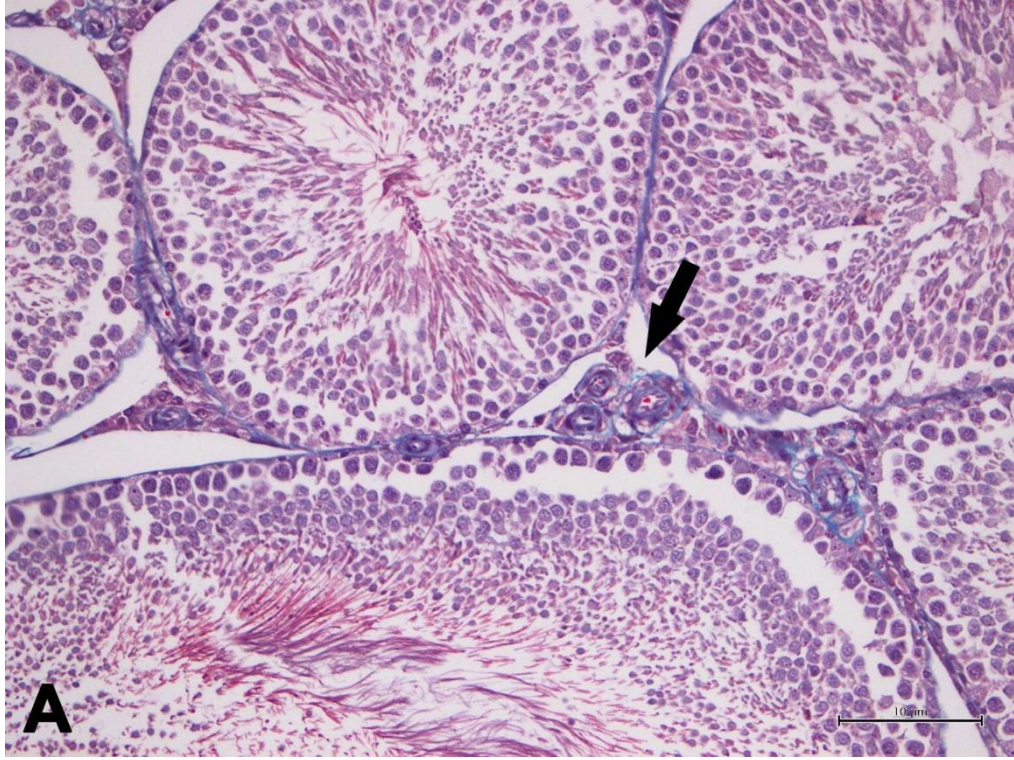
Şekil 22. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait H&E ile boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikroyrafları. CP grubunda germinal epitel hücreleri arasında geniş dilatasyon (**oklar**, C) ve vakuoller (**v**, C), germinal epitel kalınlığında azalma (**ok başları**, C) ve lümende germ hücre döküntüleri (*, C) içeren dejenere seminifer tübüller tespit edildi. CP+Baicalin grubunda, seminifer tübüllerin oldukça düzenli morfolojisinin yanı sıra bazı tübüllerde germinal epitel hücreleri arasında dilatasyon (**ok**, D) ve germinal epitel kalınlığında azalma (**ok başı**, D) gözlenmiştir. Orijinal büyütme: x200, İnset C₂: x400.



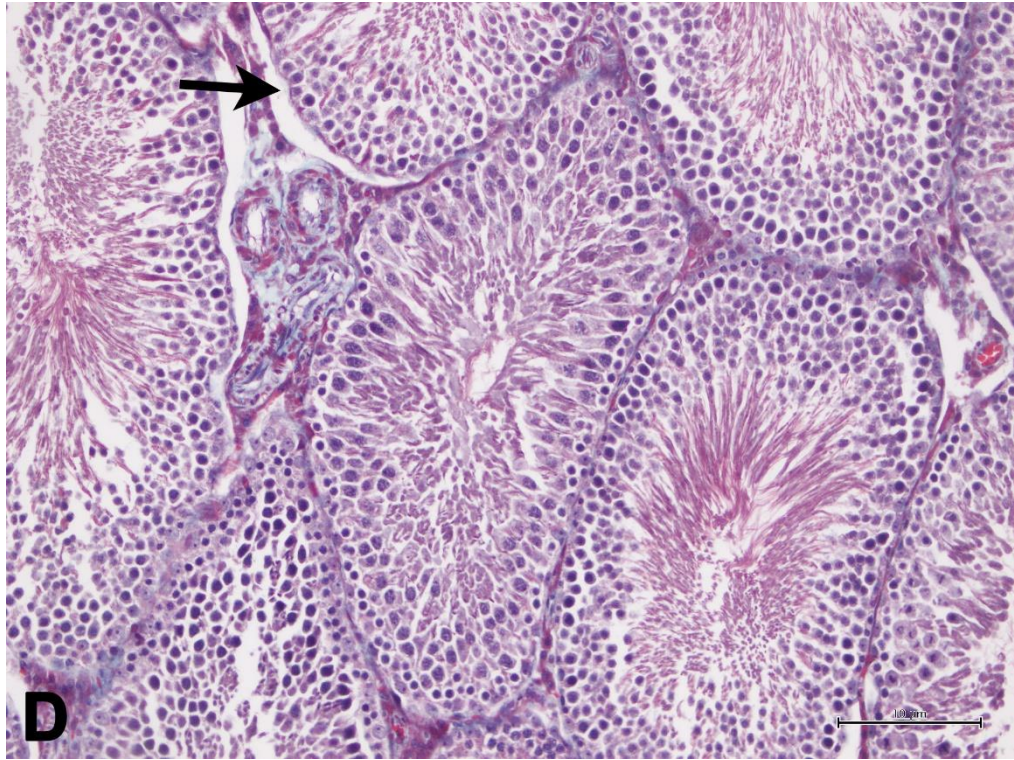
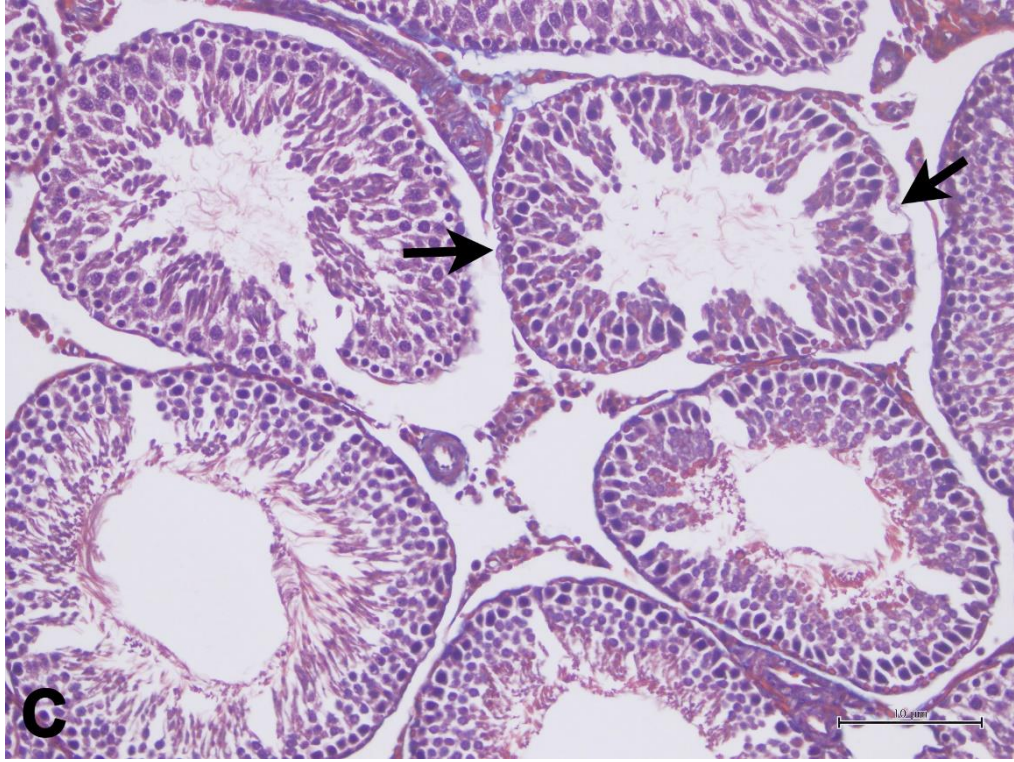
Şekil 23. Kontrol ve baicalin gruplarına ait PAS ile boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları. Kontrol **(A)** ve baicalin **(B)** gruplarında seminifer tübülü çevreleyen bazal membranların düzenli yapısı (**ok**) görülmektedir. PAS reaksiyonu. Orijinal büyütme: x200.



Şekil 24. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait PAS ile boyalı testis kesitlerin temsili ışık mikroyrafları. CP (C) grubunda seminifer tübülü çevreleyen bazal membranda düzensizlik (**ok başları**) görölmektedir. CP+Baicalin (D) grubunda düzgün bir bazal membran ile çevrili seminifer tübüllerin yanı sıra bazı seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda düzensizlik (**ok başı**) görölmektedir. PAS reaksiyonu. Orijinal büyütmeye: x200, İnset C₁: x400.



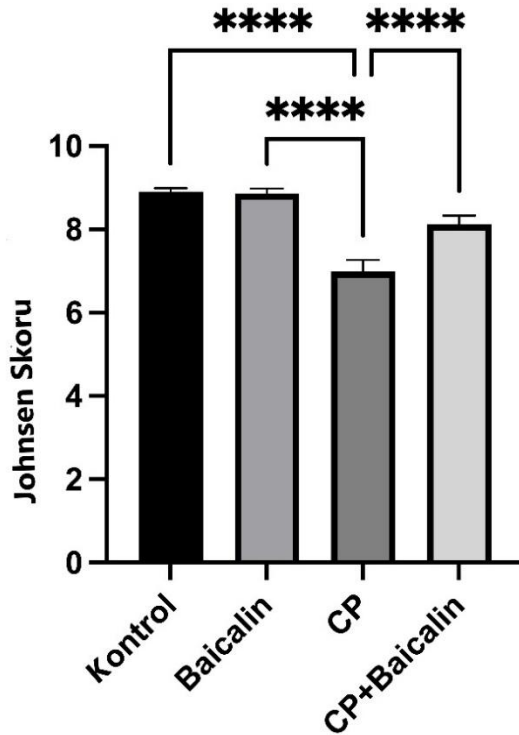
Şekil 25. Testis dokusunun kontrol ve baicalin gruplarına ait Masson Trikrom boyası ile boyanmış temsili ışık mikroyrafları. Kontrol (A) ve baicalin (B) gruplarındaki normal interstisyel bağ dokusu yapısı (ok) görölmektedir. Masson'un Trikrom boyası. Orijinal büyüme: x200



Şekil 26. Testis dokusunun CP ve CP+Baicalin gruplarına ait Masson Trikrom boyası ile boyanmış temsili ışık mikrogramları. CP (C) grubunda seminifer tübüllerin kontürlerinde düzensizlikler (**oklar**), germinal epitel hücreleri arasında dilatasyon ve normal interstisyel bağ dokusu yapısı görülmekte, CP+Baicalin (D) grubunda ise bazı seminifer tübüllerin kontörlerinde yer yer düzensizlikler (**ok**) ve normal interstisyel bağ dokusu yapısı görülmektedir. Masson'un Trikrom boyası. Orijinal büyütme: x200

6.6. Seminifer Tübüllerdeki Hasarın Histopatolojik Skor Bulguları

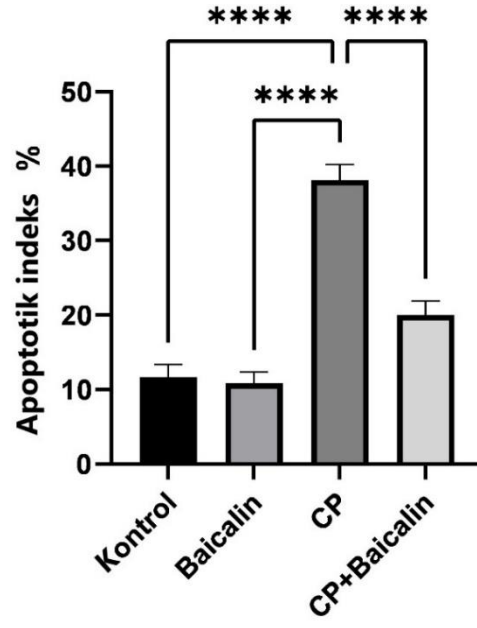
Seminifer tübüllerin Johnsen skorlaması kontrol grubunda $8,9 \pm 0,03$, baicalin grubunda $8,8 \pm 0,04$, CP grubunda $6,9 \pm 0,09$ ve CP+Baicalin grubundanda ise $8,1 \pm 0,07$ olarak belirlendi. Johnsen skoru CP grubunda kontrol ve baicalin gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0,0001$). CP + Baicalin grubunda ise CP grubuna kıyasla Johnsen skorunda anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 27).



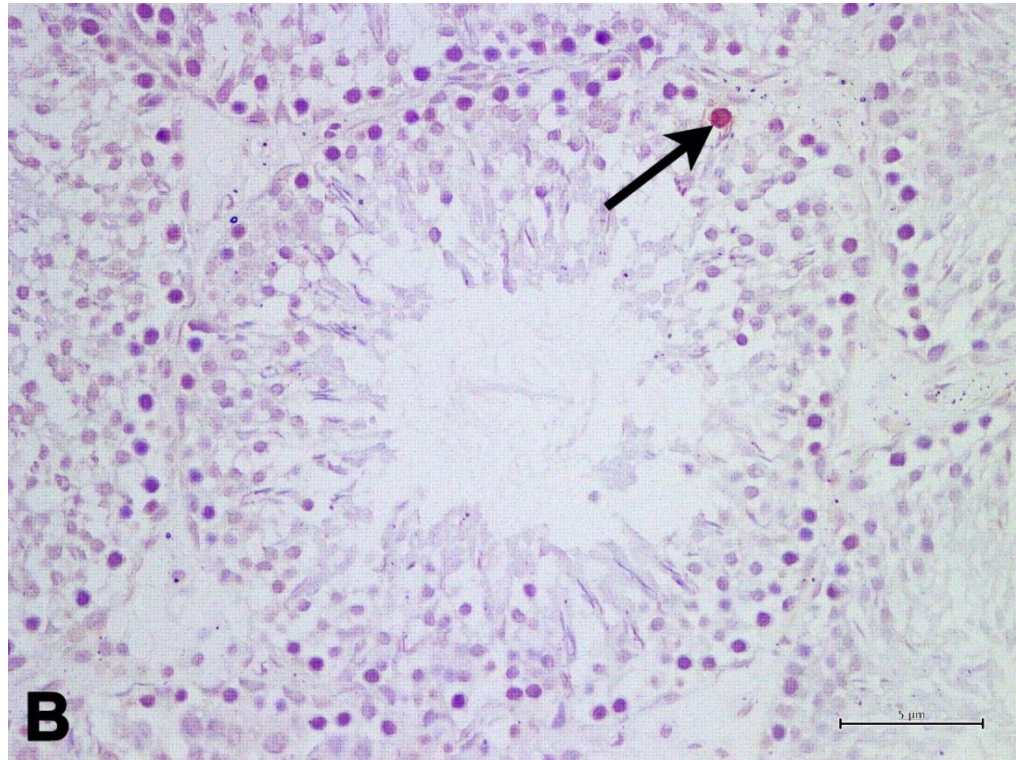
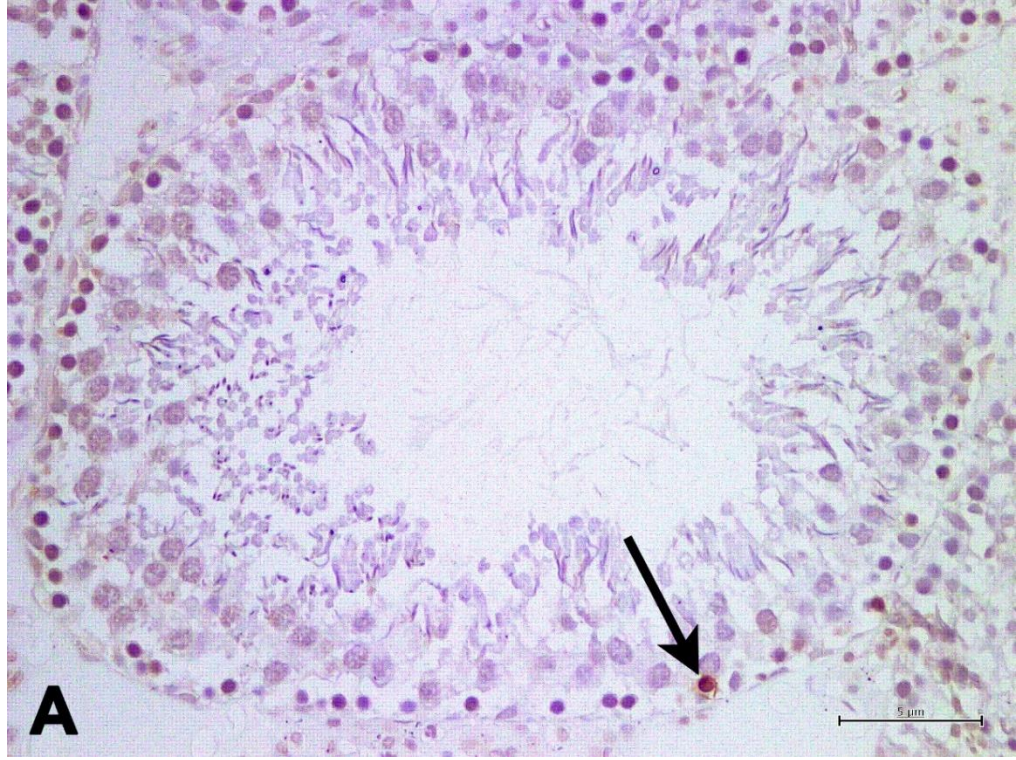
Şekil 27. Deney gruplarına ait Johnsen histopatolojik skor. *****: $p < 0,0001$.

6.7. TUNEL Bulguları

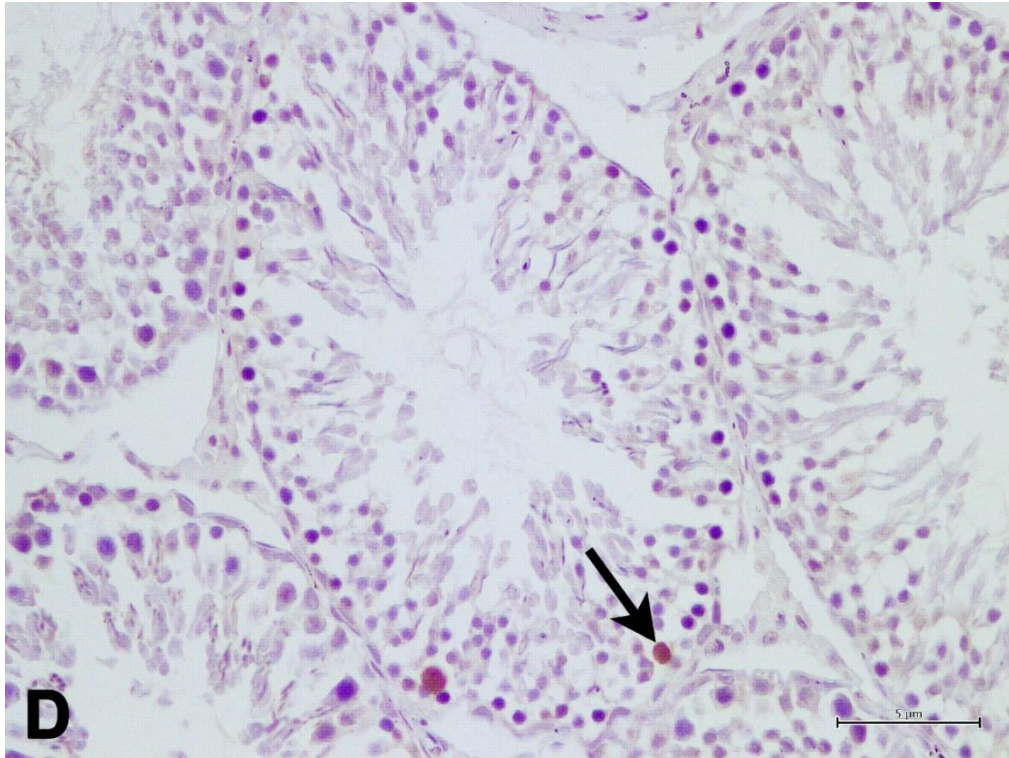
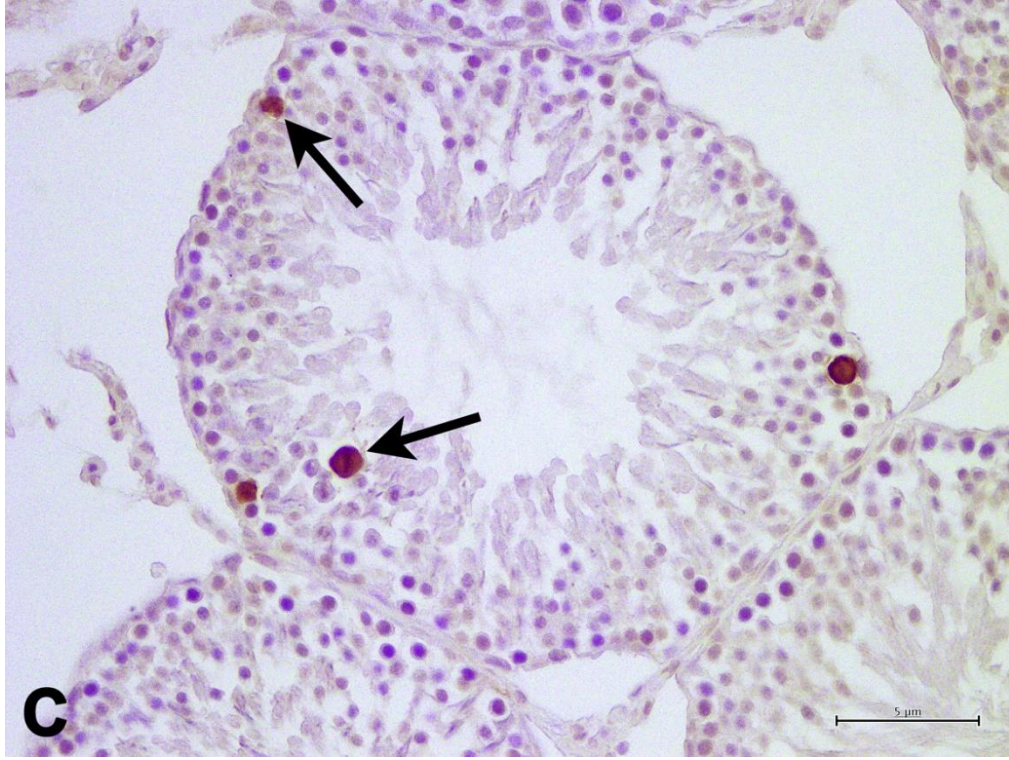
TUNEL-pozitif hücreler deney gruplarının tümünde tespit edildi (Şekil 29 ve Şekil 30). Pozitif kontrol olarak seçilen meme dokusunda TUNEL pozitif hücreler tespit edildi (Şekil 31). Kontrol ($11,67 \pm 1,66$) ve baicalin ($10,83 \pm 1,53$) grupları ile karşılaştırıldığında, CP grubunda ($38,13 \pm 2,10$) apoptotik indeksin anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,0001$). Bununla birlikte, CP + Baicalin grubunda ($20,00 \pm 1,89$) CP grubu ile kıyaslandığında apoptotik indeksin anlamlı bir şekilde düştüğü izlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 28).



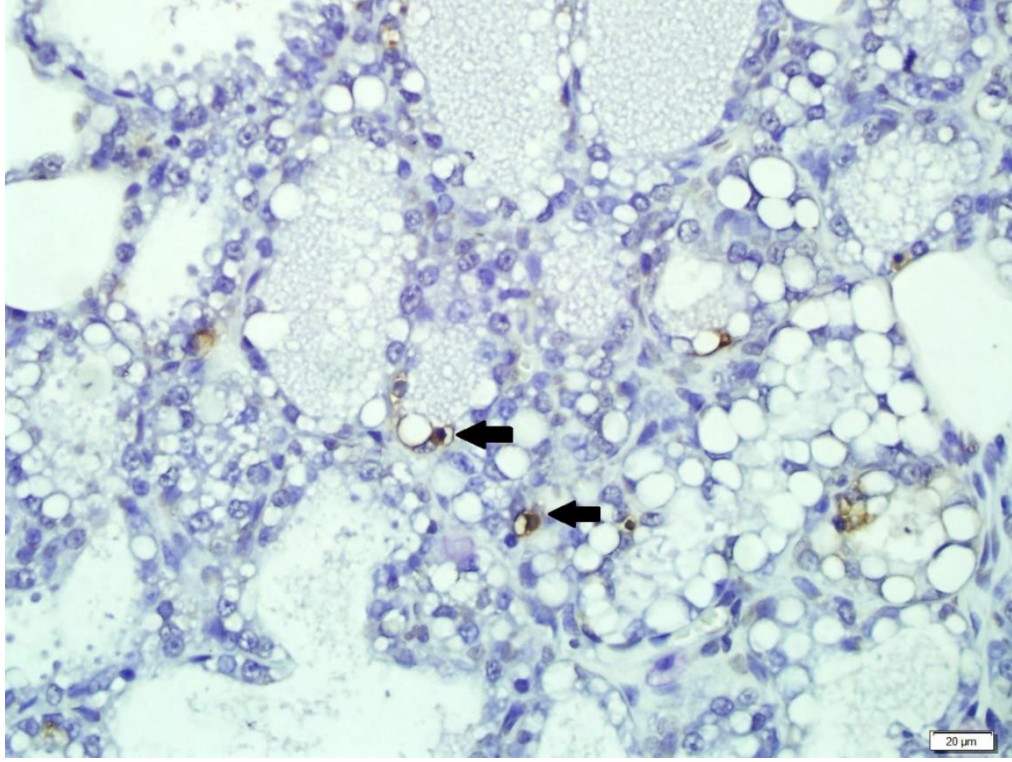
Şekil 28. Deney gruplarındaki apoptotik indeks. *****: $p < 0,0001$.



Sekil 29. Kontrol ve baicalin gruplarına ait TUNEL boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları. Kontrol (A) ve baicalin (B) gruplarında az sayıda TUNEL pozitif hücre (ok) görülmektedir. Orijinal büyütme: x400



Şekil 30. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait TUNEL boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikrografları. CP grubunda **(C)** TUNEL pozitif hücrelerde **(ok)** artış görülmektedir. CP+Baicalin grubunda **(D)** az sayıda TUNEL pozitif hücre **(ok)** görülmektedir. Orijinal büyütme: x400

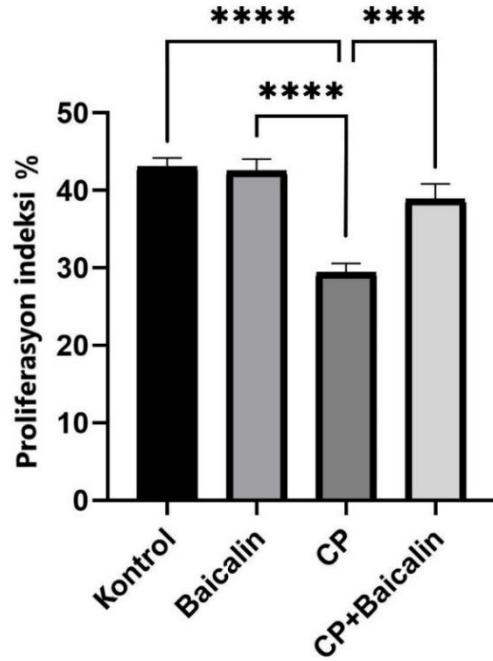


Şekil 31. Pozitif kontrole ait TUNEL boyalı doku kesitlerinin temsili ışık mikrosafı. Pozitif kontrol olarak seçilen meme dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (**ok**) görölmektedir. Orijinal büyütme: x400.

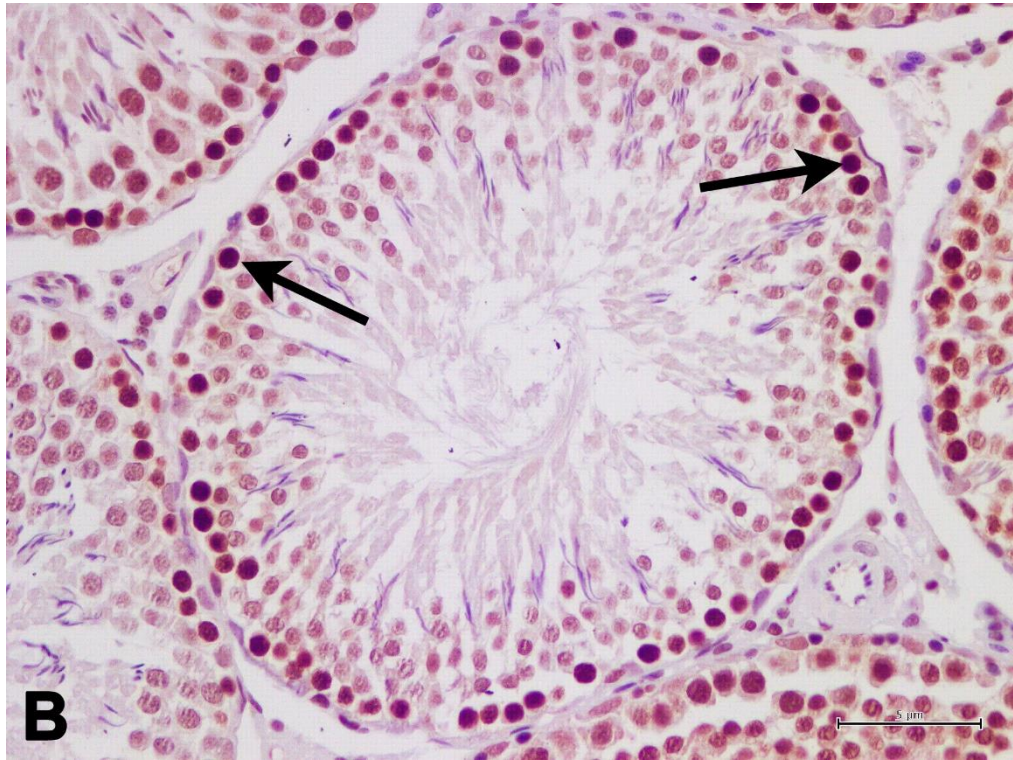
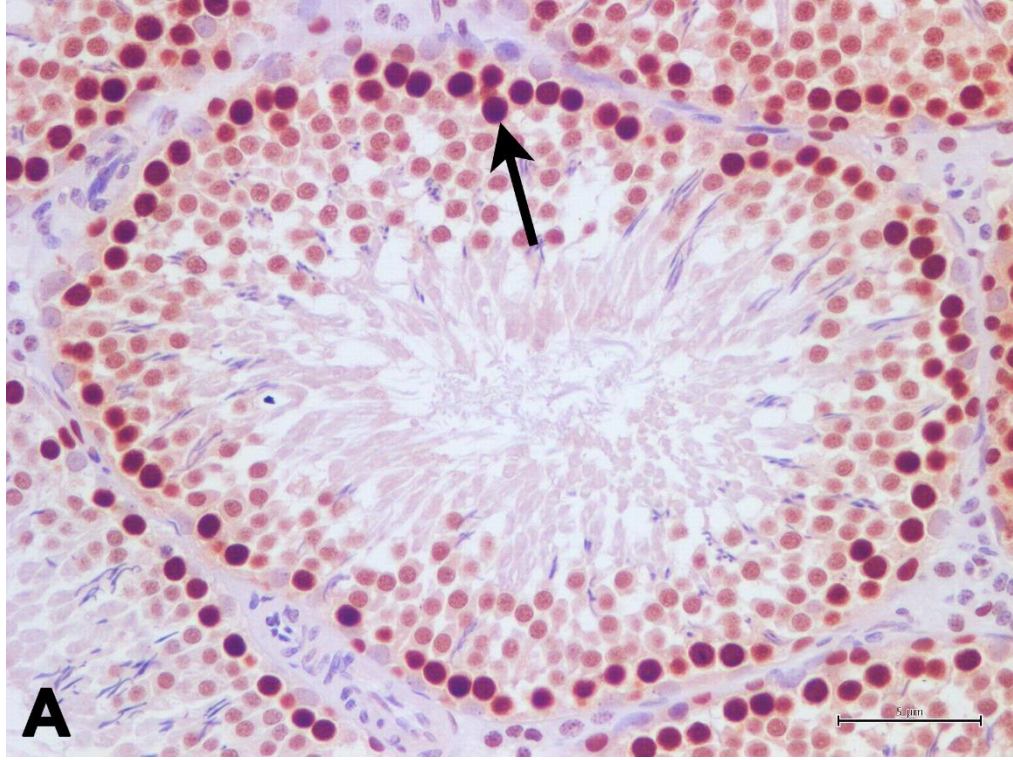
6.8. PCNA İmmunhistokimyası Bulguları

Tüm deney gruplarının seminifer tübüllerinde PCNA pozitif hücreler görüldü (Şekil 33 ve Şekil 34). Pozitif kontrole ait ince barsak dokusunda PCNA pozitif hücreler görüldü. Testis dokusuna ait kesitte negatif kontrol boyamasında herhangi bir boyanmaya rastlanılmadı (Şekil 35).

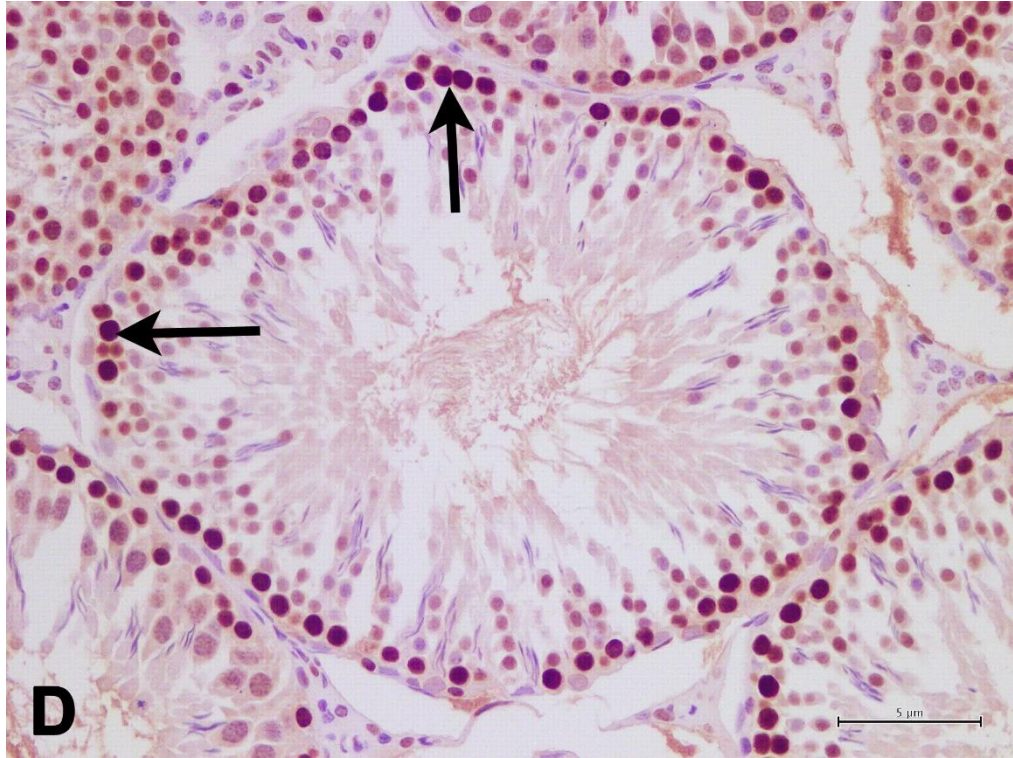
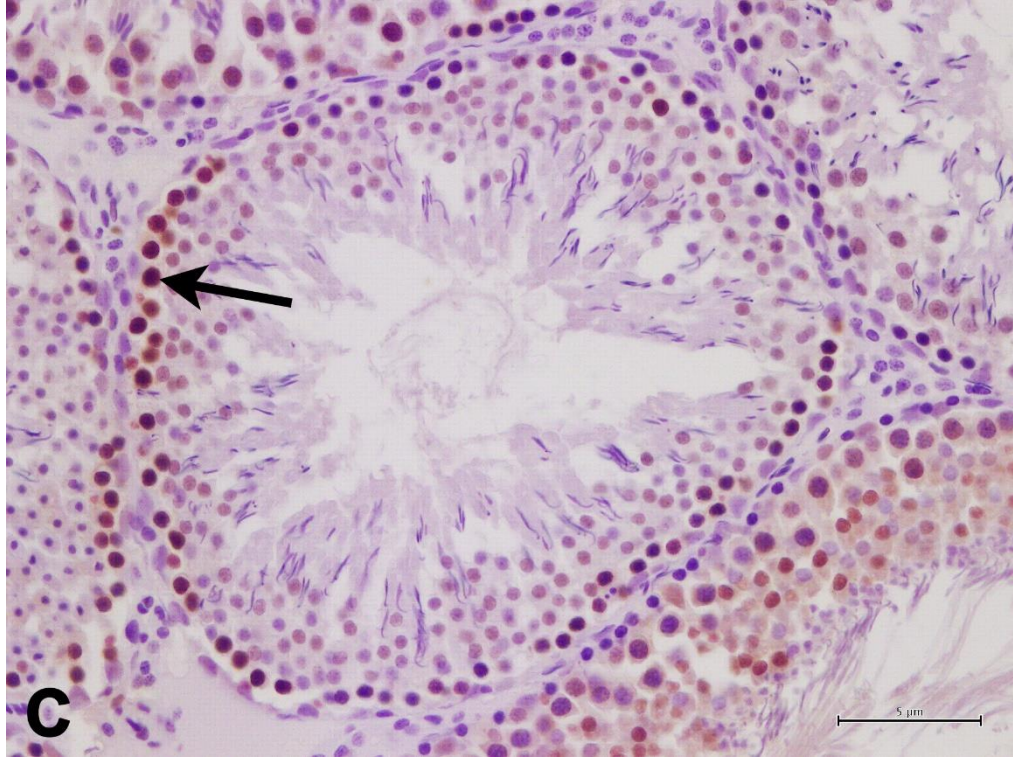
CP ($29,39 \pm 1,19$) grubundaki proliferasyon indeksinin kontrol ($43,02 \pm 1,15$) ve baicalin ($42,47 \pm 1,56$) grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p < 0,0001$). CP+Baicalin ($38,89 \pm 1,96$) grubunda ise CP grubuna kıyasla proliferasyon indeksini anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür ($p < 0,001$) (Şekil 32).



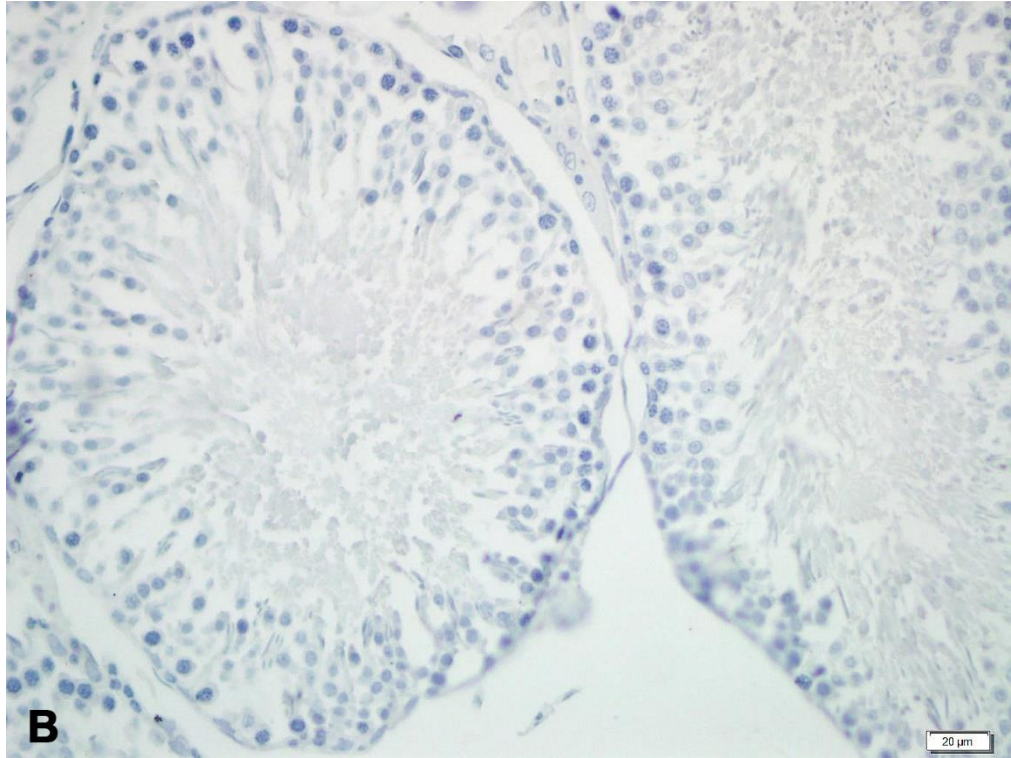
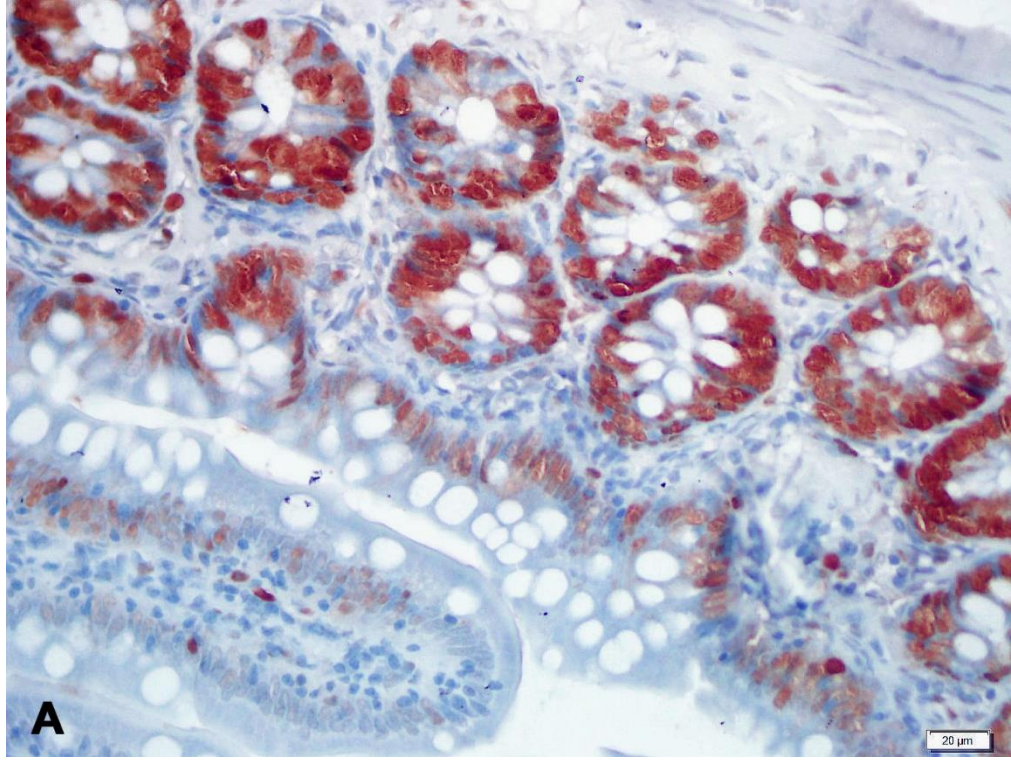
Şekil 32. Deney gruplarındaki proliferasyon indeksi. ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$



Şekil 33. Kontrol ve baicalin gruplarına ait immünohistokimyasal metod ile PCNA boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikroagrafları. Kontrol (A) ve baicalin (B) gruplarında seminifer tübüllerde çok sayıda PCNA pozitif spermatogenik hücreler (ok) görülmektedir. Orijinal büyütme: x400



Şekil 34. CP ve CP+Baicalin gruplarına ait immünohistokimyasal metod ile PCNA boyalı testis kesitlerinin temsili ışık mikroyrafları. CP grubunda (C) seminifer tübüllere PCNA pozitif spermatogenik hücrelerde azalma (**ok**) görölmektedir. CP+Baicalin grubuda (D) seminifer tübüllerde PCNA pozitif spermatogenik hücre sayısında artış (**oklar**) görölmektedir. PCNA immünohistokimyası. Orijinal büyüyme: x400

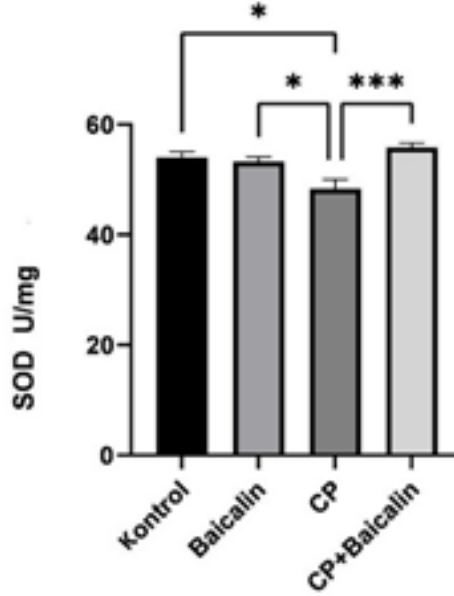


Şekil 35. Pozitif (A) ve negatif kontrole (B) ait kesitlerin temsili ışık mikroyrafları. Pozitif kontrol (A) olarak seçilen ince barsak dokusunda PCNA pozitif hücreler. Negatif kontrol (B) olarak testis dokusu. PCNA immünohistokimyası. Orijinal büyütme: x400

6.9. Biyokimyasal Bulgular

6.9.1. Testiküler SOD aktivitesi bulguları

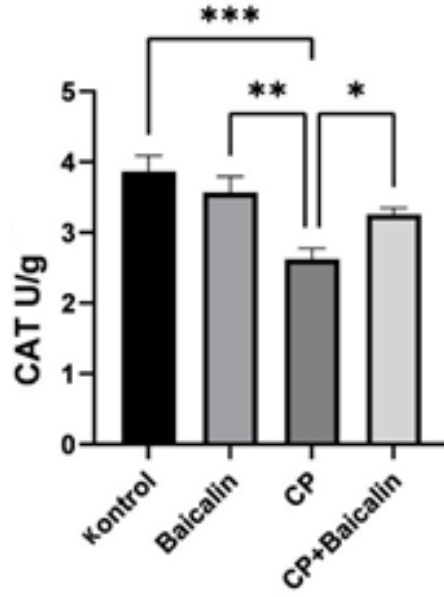
Kontrol ve baicalin gruplarına kıyasla CP grubunun SOD aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ($p<0,05$). CP+Baicalin grubunda ise SOD aktivitesinin CP grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil 36).



Şekil 36. Deney gruplarının testis dokularında SOD aktivitesi. SOD: süperoksit dismutaz; *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$

6.9.2. Testiküler CAT aktivitesi bulguları

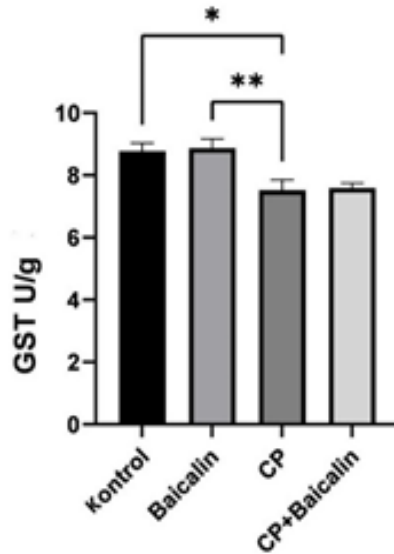
CP grubunda CAT aktivitesinin kontrol gruba kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). Benzer şekilde CAT aktivitesinin CP grubunda baicalin grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p<0,01$). CP+Baicalin grubu CP grubu ile kıyaslandığında CAT aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 37).



Şekil 37. Deney gruplarının testis dokularında CAT aktivitesi. CAT: katalaz; *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$

6.9.3. Testiküler GST aktivitesi bulguları

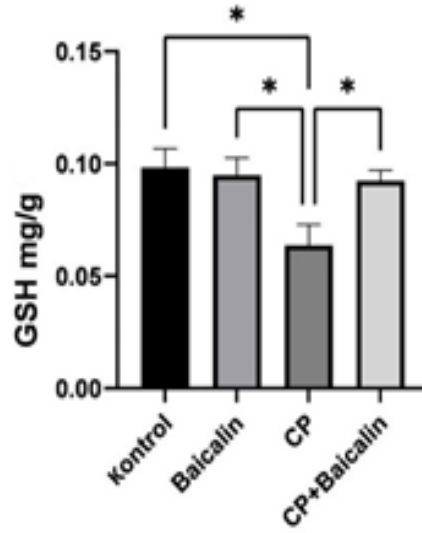
CP grubunda GST aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ($p<0,05$). Benzer şekilde GST aktivitesinin CP grubunda baicalin grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0,01$). CP+Baicalin grubunda GST aktivitesinde CP grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 38).



Şekil 38. Deney gruplarının testis dokularında GST aktivitesi. GST: glutatyon-S-transferaz; *: $p<0,05$, **: $p<0,01$

6.9.4. Testiküler Glutasyon bulguları

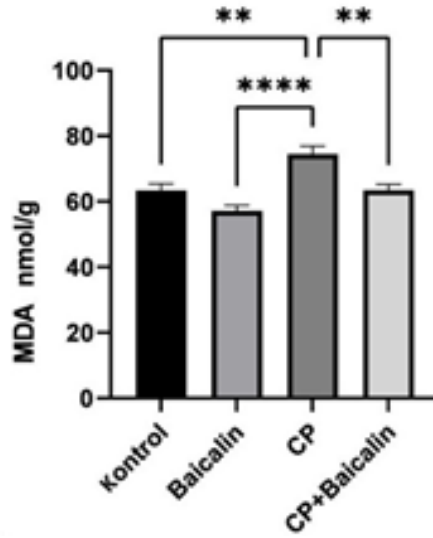
Kontrol grubu ile kıyaslandığında CP grubunda GSH seviyesinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0,05$). Benzer şekilde GSH seviyesinin CP grubunda baicalin grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0,05$). CP+Baicalin grubunda ise GSH seviyesinin CP grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttırdığı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 39).



Şekil 39. Deney gruplarının testis dokularında GSH seviyesi. GSH: glutasyon; *: $p<0,05$

6.9.5. Testiküler MDA bulguları

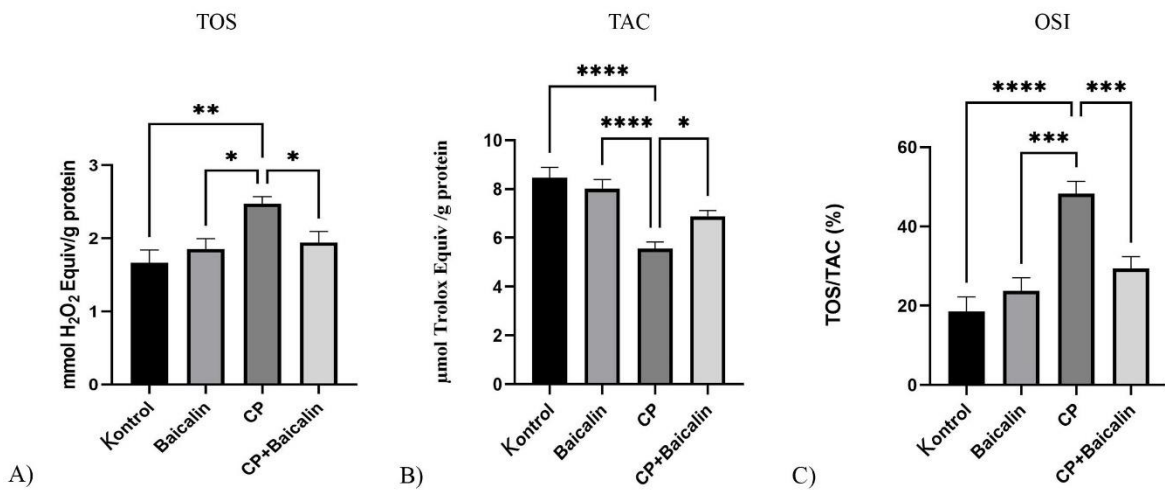
CP grubunda MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı saptandı ($p<0,01$). Benzer şekilde MDA seviyesinin CP grubunda baicalin grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$). CP+Baicalin grubunda ise MDA seviyesinin CP grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0,01$) (Şekil 40).



Şekil 40. Deney gruplarının testis dokularında MDA seviyesi. MDA: malondialdehit; **: $p<0,01$, ****: $p<0,0001$.

6.9.6. Testiküler TOS, TAC ve OSI bulguları

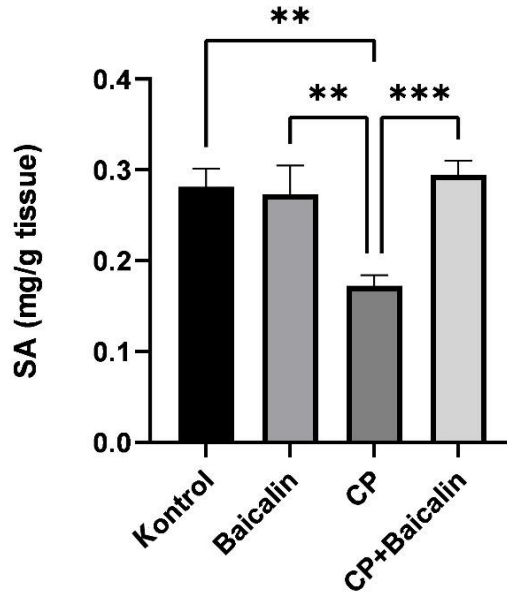
Kontrol (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,01$ ve $p<0,0001$) ve baicalin (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,05$ ve $p<0,001$) gruplarıyla karşılaştırıldığında CP grubunda TAC seviyesinde anlamlı bir azalma, TOS ve OSI seviyelerinde ise anlamlı bir artış tespit edildi. CP+Baicalin grubunda ise CP grubuna göre TAC seviyesinde anlamlı bir artış, TOS ve OSI seviyelerinde anlamlı olarak azalma saptanmıştır (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$ ve $p<0,001$) (Şekil 41).



Şekil 41. Deney gruplarının testis dokusunda TOS (A), TAC (B) ve OSI (C) seviyeleri. TOS: total oksidan seviyesi, TAC: total antioksidan kapasite, OSI: oksidatif stres indeksi. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$.

6.9.7. Testiküler SA bulguları

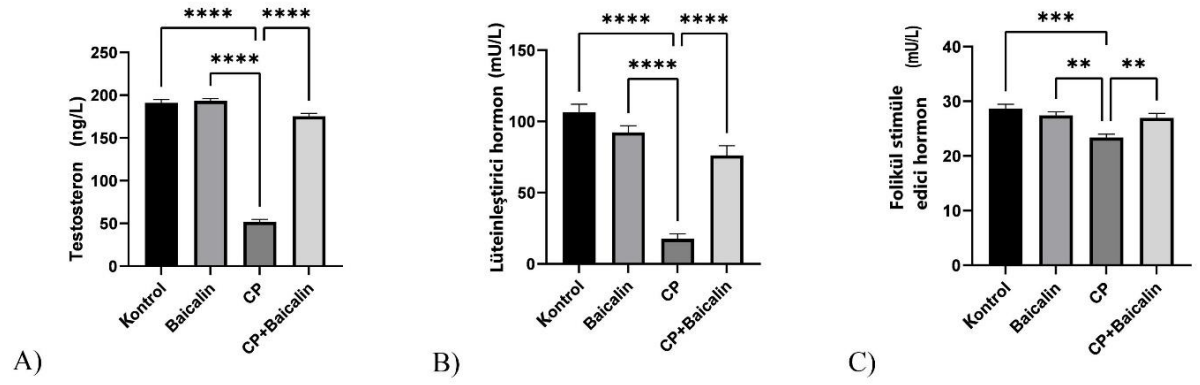
Kontrol ve baicalin gruplarına kıyasla CP grubunda SA seviyesinin anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($p<0,01$). CP+Baicalin grubunda ise SA seviyesinin CP grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu saptandı ($p<0,001$) (Şekil 42).



Şekil 42. Deney gruplarının testis dokularında SA seviyesi. SA: siyalik asit; **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$.

6.9.8. Serum testosteron, LH ve FSH bulguları

Kontrol grubunun testosteron, LH ve FSH seviyelerinin CP grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,001$). Benzer şekilde, baicalin grubunda yüksek testosteron, LH ve FSH seviyeleri CP grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,01$). CP grubu ile karşılaştırıldığında, CP+Baicalin grubunun testosteron, FSH ve LH seviyelerinde anlamlı bir artış saptandı (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,01$) (Şekil 43).



Şekil 43. Deney gruplarında testosteron **(A)**, lüteinizan hormon **(B)** ve folikül uyarıcı hormon **(C)** seviyeleri. **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, CP enjeksiyonu ile oluşturduğumuz testis hasarı modelinde vücut ağırlığında ve sperm sayısında azalma, baş ve kuyruk gibi sperm morfolojisinde görülen anomalilerde artış saptanmıştır. Seminifer tübüllerde germinal epitelde bozukluklar, spermatogenik serideki hücre sayısında azalma ve lümende germ hücre döküntülerini içeren dejenerasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca, seminifer tübüllerdeki germ hücre proliferasyonunun azaldığı ve apoptotik hücrelerin arttığı saptanmıştır. CP enjeksiyonu uygulanan sıçanlarda serum testosteron, LH ve FSH seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca testis dokusunda MDA, TOS seviyesinde artış ve SOD, CAT, GSH aktivitesi ve TAC seviyesinde bir azalma saptanmıştır. Baicalin tedavisinin CP enjeksiyonu uygulanan sıçanlarda histopatolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki bu olumsuz etkileri iyileştirdiği gösterilmiştir.

Kemoterapötik ilaçlar, özellikle de alkileyici ajan olan CP seminifer tübüllerdeki germ hücreleri için gonadotoksiktir. Bu toksisite, morfolojik olarak anormal sperm yüzdesinin daha yüksek olmasına ve daha az sperm sayısına neden olur (Howell ve Shalet, 2002; Liu ve ark., 2021). DeneySEL bir çalışmada, 350 mg/kg CP maruziyetinin farelerin spermatozoalarında kalıtsal translokasyonlara yol açtığı gösterilmiştir (Sotomayor ve ark., 1975). Ayrıca başka bir çalışmada, CP'nin seminifer tübülde epididimise geçişi sırasında spermatozoa üzerinde olumsuz bir etkisinin olabileceği ve bu durumun sonraki nesilleri de etkileyebileceği öne sürülmüştür (Qiu ve ark., 1992). Siklofosamid uygulamasının sperm ve dölleme yeteneğinde bozulmaya neden olduğunu gösteren bir çalışmada, oluşturulan iki deney grubunun ilkinde 1 hafta ve ikincisine 5 hafta süreyle haftada bir kez 50, 100, 150 ve 200 mg/kg dozlarında CP, i.p olarak verilmiştir. Bu çalışmada, 1. hafta sonunda kurban edilen grubun sperm motilitesi, artan CP dozları ile azalmıştır. 1. hafta sonunda kurban edilen grubun 150 ve 200 mg/kg CP dozlarında sperm motilitesinde anlamlı bir azalma olduğu fakat; 5. hafta sonunda kurban edilen grupta CP'nin 200 mg/kg dozu hariç tüm dozlarında sperm motilitesinin iyileştirildiği gösterilmiştir. Sperm sayısına bakıldığında ise, 1. hafta sonunda kurban edilen grubun 100, 150 ve 200 mg/kg CP dozlarında sperm sayılarında anlamlı olarak azalma olduğu görülmüştür. Beşinci hafta sonunda kurban edilen grupta ise, 150 ve 200 mg/kg CP dozlarında sperm sayısında % 31 ve % 84'e varan azalma görülürken, 50 ve 100 mg/kg CP dozlarında sperm sayısında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Çalışmanın sonuçları CP'nin yüksek doz uygulamasının erkek üreme sisteminde kalıcı işlev bozukluğuna yol açabileceğini göstermektedir (Elangovan ve ark., 2006).

CP'nin sperm sayısında ve motilitesinde bir azalmaya yol açmasının yanı sıra sperm baş ve kuyruk morfolojisindeki anomaliliği de anlamlı olarak arttırdığı bildirilmiştir (Elangovan ve ark., 2006 ; Ceribaşı ve ark., 2010). Patofizyolojik açıdan bakıldığında ise, CP'nin DNA hasarına, membran yağ asitlerinin serbest radikal kaynaklı peroksidasyonuna veya düşük antioksidan kapasiteye neden olduğu, bunun da morfolojik kusurların artmasına ve anormal sperm oluşumuna yol açtığı iddia edilmiştir (Torabi ve ark., 2017 ; Ilbey ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da benzer bir şekilde CP sperm baş ve kuyruk morfolojisinde hasara ve sperm sayısında azalmaya neden olmuştur.

Kanno ve ark. (2009) CP'nin (100, 150, 200 ve 250 mg/kg, haftada bir kez, i.p., altı hafta boyunca) hem farelerin vücut hem de testis ağırlığını azalttığını ve vücut ağırlığındaki azalmanın CP'nin sistemik toksisitesine ve CP kaynaklı stresin bir sonucu olarak beslenme eksikliğine atfedilebileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise, CP uygulamasının vücut ağırlığını azaltmış olsa da, testis ağırlığında bir değişiklik oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun literatürdeki önceki çalışmalarla desteklenerek CP'nin dozu, tedavi süresi ve hayvan duyarlılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Türk ve ark., 2010 ; Fukushima ve ark., 2005).

Oksidatif stres, hücrelerin büyük miktarlarda ROS üretmesine neden olur. Organizmalar stres koşullarında ROS maruziyeti ile başa çıkmak için çeşitli enzimatik (SOD, CAT ve glutatyon peroksidazlar (GPx'ler)) ve enzimatik olmayan (GSH) savunma mekanizmaları geliştirir. CP kaynaklı testis toksisitesinin kesin etki mekanizması bilinmemekle birlikte, antioksidan savunma üzerinde olumsuz etkilerinin yanı sıra ROS üretimini ve lipid peroksidasyonunu artırdığı bilinmektedir (Saxena ve ark., 2020). Hepatik sitokrom P450 sistemi siklofosfamidi aktif fosforamid hardal ve toksik akrolein olmak üzere iki nihai maddeye dönüştürür. Siklofosfamidin antineoplastik ve immünosupresif etkileri fosforamid hardala bağlıken, toksik yan etkileri akrolein bileşenine bağlıdır. Akrolein, hızla çoğalan dokulara müdahale ederek ve DNA çapraz bağlantılarına neden olarak ROS ve oksidatif hasarı tetikleme gücüne sahiptir. Testis dokusu, hızlı proliferasyon kapasitesi nedeniyle CP'nin toksisitesine özellikle duyarlıdır (Aguilar-Mahecha ve ark., 2001).

Testiküler antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GST aktiviteleri ve GSH seviyesi) azalması daha önce CP ile indüklenen sıçanlarla yapılan araştırmalarda gözlenmiştir (Wang ve ark., 2021; Ilbey ve ark., 2009). Oyagbemi ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada, CP uygulamasının MDA, nitrit ve H₂O₂ seviyelerinde önemli artışa neden olduğunu, SOD ve GST aktivitelerinde ise anlamlı bir azalmaya yol açtığını tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada, CP uygulaması GSH-Px aktiviteleri ve GSH düzeylerini önemli ölçüde azaltırken, MDA düzeylerini önemli ölçüde arttırmıştır (İlbey ve ark.,2009). Antioksidan moleküllerindeki azalma, testisin antioksidan savunma sistemlerini bozan kontrol edilemeyen H₂O₂ üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Sallam ve ark., 2021). Ayrıca Yuan ve ark. (1991) GSH tükenmesinin, CP ve metabolitlerinin serbest veya proteine bağlı -SH grupları ile doğrudan konjugasyonundan kaynaklanabileceğini ve antioksidan fonksiyonlara müdahale edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Güncel bir çalışmada da, CP uygulamasının testiküler total antioksidan kapasiteyi ve SOD enziminin testiküler aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, antioksidan enzim aktivitelerindeki bu azalmanın serbest radikalleri temizlemek için antioksidan enzimlerin aşırı kullanımına bağlanabileceği ileri sürülmüştür (İbrahim ve ark., 2023). Akbel ve ark. (2023) yaptıkları bir çalışmada ise, CP'nin serum ve dokularda (karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis) MDA seviyesinde artışa ve GSH seviyesinde, SOD ve CAT aktivitelerinde azalmaya yol açtığını bildirmiştir. Benzer şekilde, araştırmamızda CP testis dokusunda antioksidanlarda (SOD, CAT ve GST aktiviteleri ve GSH seviyeleri) önemli bir düşüşe ve MDA seviyesinde bir artışa neden olmuştur. Bulgularımız, CP'nin antioksidanlar ve oksidanlar arasında oksidanlar lehine aktivasyon göstererek testis dokusunun biyokimyasal yapısını değiştirdiğini göstermektedir.

Siyalik asit, hücre yüzeyinde glikolipit ve glikoproteinlerde bulunan, negatif yüklü bir moleküldür. Birçok nöronal süreçte yer alır, hücreyi kimyasal ve mekanik olarak korumanın yanında hücrelerin birbirlerini tanımalarını ve birbirlerine tutunmalarını da sağlar (Varki, 2008). Kronik mancozeb ile oluşturulan gonadal toksisite modelinde, testis ve epididimis dokularında SA içeriğinin doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Kaçkar ve ark., 1997). Buna benzer olarak, vanadil sülfat ile oluşturulan gonadal toksisite modelinde, testis ve kauda epididimisin protein ve SA içeriklerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş ve SA seviyesindeki bu azalmanın testisin nekrotik durumu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Jain ve ark., 2007). Başka bir çalışmada ise, 20 mg/kg CP verilerek oluşturulan akciğer modelinde dokuda siyalik asit seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Venkatesan ve ark., 1998). Bizim çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırılmasında CP grubunun testis dokusunda SA seviyesinin anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Doku SA seviyesindeki bu azalmanın nedeni, CP ile oluşan oksidatif stres sonucu membran yüzeyindeki SA'ların koparak kana geçmesi olabileceğini düşünmekteyiz.

CP ile indüklenen sıçanların testis dokusundaki histopatolojik bulgular, bozulmuş spermatogenez, germinal epitel kalınlığının azalması, vakuolizasyon, perivasküler fibrozis,

ödemli sıvı birikimi, çok çekirdekli dev hücre oluşumu, lümende germ hücre döküntüleri, hemoraji ve konjesyon olarak gösterilmiştir (Alkhalaf ve ark., 2020 ; Torabi ve ark., 2017). Hosseini ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, CP'nin Sertoli ve Leydig hücre popülasyonlarının yıkımına ve sperm morfolojisinde anormalliklere neden olduğunu göstermiştir. CP ile sülfidril gruplu proteinler arasındaki etkileşimlerin ve testosteron sentezindeki azalmanın morfolojik hasarın sonuçlarından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Alkhalaf ve ark., 2020). El Gharabawy ve ark. (2019) spermatogenik hücrelerin sitoplazmasındaki vakuollerin, CP'nin neden olduğu hücre zarı ve hücre organellerinde hasara neden olan ve hücre zarının geçirgenliğinde artışa neden olan lipid peroksidasyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da CP verilen grupta, seminifer tübüllerde spermatogenik serideki hücre sayısında azalma, germinal epitel hücreleri arasında dilatasyon ve vakuol oluşumu tespit edilmiştir. Seminifer tübüllerdeki hasar, CP grubundaki Johnsen'in testis skorunun ve seminifer tübüllerin epitel kalınlığı, alanı ve çapının kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak azalmasıyla da desteklenmiştir.

Testis dokusu morfolojisi üzerindeki CP'nin olumsuz etkisi literatürde iyi bir şekilde belgelenmiş olmasına rağmen, azalan testosteron salgısının kesin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Erkeklerde gonadal fonksiyonu kontrol eden hipotalamik hipofiz gonadal aksın aktivasyonu, hipofizde FSH ve LH üretimini uyarmak için GnRH'nin hipotalamik salgılanması ile başlar. FSH ve LH erkeklerde testosteron üretmek için Leydig hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Akomolafe ve ark., 2020). CP, ROS seviyelerini artırarak oksidatif stres oluşturur ve steroidojenik enzim aktivitelerini hedef alarak testosteron, LH ve FSH üretiminin azalmasına neden olur (Ghosh ve ark., 2002 ; Das ve ark., 2002). Khamis ve ark. (2023) çalışmalarında CP'nin neden olduğu oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyonun yanı sıra, hipofiz-testis aksını etkileyerek spermatogenezi etkilediğini göstermiştir. CP'nin serum testosteron, FSH, LH ve prolaktin seviyelerini belirgin şekilde düşürdüğü literatürde gösterilmiştir (Ebokaiwe ve ark., 2022 ; Shabaan ve ark., 2021). Solomon ve ark. (2021) testis dokusundaki Sertoli hücrelerinin, germ hücrelerinin ve peritübüler hücrelerin sayısının CP ile azaldığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada Sertoli hücrelerinin fonksiyonunun etkilendiği ve böylece testis germ hücrelerinin etrafındaki ortamın etkilenebileceği ileri sürülmüştür. Bu durumun spermatogonyal hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşmasında bozulmaya ve dolayısıyla infertiliteye yol açabileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Bakhtiary ve ark. (2020), testis dokusundaki aktif Sertoli hücrelerinin ortalama sayısının CP ile anlamlı olarak azaldığı ve Sertoli hücrelerinin fizyolojik testosteron bağımlılığındaki kilit rolü göz önüne

alındığında, CP kaynaklı hasarın kısmen Sertoli hücre deformasyonuna bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Wallace ve ark. (1997) CP'nin, öncelikle Sertoli hücreleri tarafından inhibin hormonu salınımı yoluyla FSH salgılanmasını baskıladığı ve Sertoli hücrelerinin FSH'ye duyarlılığının CP uygulamasıyla değiştiğini ileri sürmüşlerdir. Hem bu çalışmanın bulguları hem de literatürdeki bulgular CP'nin Leydig ve Sertoli hücrelerinde fonksiyon bozukluğu ve hipofiz-gonadal aksın bozulması yoluyla hormon salgılanmasını değiştirebileceğini düşündürmektedir.

Siklofosamid, öncelikle DNA iplikçiklerini çapraz bağlayarak, germinal epitel bütünlüğüne zarar vererek ve apoptozu aktive ederek testiste hücre büyümesini ve farklılaşmasını engeller (Ghobadi ve ark., 2017). Hücresel proliferasyon ve farklılaşmanın iyi bilinen bir belirteci olan PCNA, kimyasal olarak indüklenen testis toksisitesini tespit etmek için erken bir biyobelirteç olarak spermatogenezin hassas analizini yapmak için kullanılabilir (D'Andrea ve ark., 2008). Oral timokinon uygulamasının CP kaynaklı testiküler hasar üzerindeki etkisini inceleyen bir araştırmada, PCNA pozitif hücrelerin sayısının 20mg/kg CP'ye maruz kalan sıçanların testislerinde belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Adana ve ark., 2022). Liu ve ark. (2021), CP uygulanan farelerde 1 hafta sonra PCNA-pozitif spermatogonial ve spermatosit hücrelerinde ve testis proliferasyonunu gösteren başka bir belirteç olan PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) pozitif spermatogonial hücrelerde anlamlı olarak azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada PCNA-pozitif germ hücrelerinin yoğunluğunun CP tedavisinden bir gün sonra anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca CP enjeksiyonundan bir gün sonra TUNEL-pozitif germ hücrelerinde de artış gözlenmiştir. Bu apoptotik hücreler ilacın kesilmesinden 10 hafta sonrasına kadar da tespit edilebilmiştir. Araştırmalar, CP maruziyetinin PCNA pozitif hücreleri azaltarak testislerin fonksiyonel ve yapısal bütünlüklerini bozduğunu ve ardından spermatogonial hücrelerde apoptozu aktive ettiğini göstermektedir (Liu ve ark., 2021 ; Adana ve ark., 2022). Tripathi ve ark. (2008) tarafından farelerde yapılan bir çalışmada, 50 ve 100 mg/kg dozlarında uygulanan CP'nin 200 mg/kg dozuna kıyasla dokuda daha fazla sayıda TUNEL pozitif hücre artışına yol açtığını belirtmişlerdir. CP' nin en yüksek dozunun (200 mg/kg) germinal hücrelerin ve spermatositlerin tamamen kaybına bağlı olarak TUNEL-pozitif hücrelerin azalmasının nedeni olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamız, CP'nin germ hücrelerinin apoptotik indeksi anlamlı olarak arttırdığı, proliferatif indeksi anlamlı olarak azalttığını göstermektedir.

Siklofosamid testisler üzerindeki olumsuz etkilerini oksidatif stresi indükleyerek ve genetik ifadeyi değiştirerek gösterdiğinden, Ghobadi ve ark. (2017) CP ile ilişkili testis hasarının

oksidatif hasarla mücadele edilerek üstesinden gelinebileceğini öne sürmüştür. Antioksidanlar son zamanlarda birçok klinik ve deneysel çalışmada kemoterapinin neden olduğu gonadal hasara karşı ana terapötik ajanlar olarak ortaya çıkmıştır. Literatür taramasında CP kaynaklı sperm hasarıyla mücadele etmek için bitkisel veya kimyasal kaynaklardan elde edilen birçok antioksidan üzerinde araştırma yapan çalışmalar tespit edilmiştir. Bu antioksidanlardan askorbik asit, melatonin, skualen, astaksantin, stronsiyum fruktoz ve ginsengin ROS'u temizleyerek ve hücrel oksidatif dengeyi koruyarak CP kaynaklı toksisiteye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Ghobadi ve ark., 2017). Doğal bir antioksidan olan baicalinin, deneysel çalışmalarda inflamasyon, apoptoz ve doku nekrozu üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği ve bu sayede anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser etkiye sahip iyileştirici bir bitkisel ajan olduğu öne sürülmüştür (Xu et al., 2013 ; Lin et al., 2014 ; Wei et al., 2015).

Baicalinin ROS'u ortadan kaldıracı olduğu, lipid peroksidasyonunu önleyebildiği, inflamasyonu azalttığı ve oksidatif stres karşısında antioksidan savunmayı koruyabildiğine dair literatürde birçok çalışma görülmektedir (Ganguly ve ark., 2022 ; Wu ark., 2018 ; El-Ela ve ark., 2022). El-Ela ve ark. (2022) baicalinin doksorubisin kaynaklı kardiyotoksistide Toll benzeri reseptör 4 ve nükleer faktör kappa B'nin aşağı regülasyonu yoluyla ve Dickkopf-1'i baskılayarak ve Wnt/ β -katenin yolunu uyararak kardiyak inflamasyonu hafiflettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, baicalinin GSH'yi geri kazandırarak ve MDA seviyesini düşürerek doksorubisin kaynaklı oksidatif stres azalttığı da tespit edilmiştir. Tan ve ark. (2021), baicalinin adriamisin ile indüklenen nefrotik sendrom modelinde epitelyal-mezenkimal geçiş, fibroz, apoptoz ve inflamasyon ile ilgili genleri ve inflamatuvar reaksiyonların baskılanması yoluyla etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ran ve ark. (2023), etomoxir/baicalin ile kombine edilen dibucainin Leydig hücrelerinde yağ asidi oksidasyonunu inhibe ederek ışın kaynaklı testis hasarını iyileştirdiğini bildirmişler. Bunun yanı sıra bu çalışmanın histolojik bulgularında, dibucain ve etomoksir kombinasyonunun dibucain ve baicalin (50mg/kg) kombinasyonuna göre daha iyi olduğu ileri sürülmüştür. Tekeli ve ark. (2023), pestisit emamektin benzoata maruz kalan sıçanlara baicalin uygulamasının, testiküler nitrik oksit, MDA ve GSH seviyeleri ile GPX, GR, GST, SOD ve CAT aktiviteleri gibi oksidatif stres parametrelerini iyileştirerek ve dolayısıyla histolojik hasarı azaltarak olumsuz etkilere karşı yeterli koruma sağladığını bildirmiştir. Baicalinin metotreksat kaynaklı testiküler toksisiteye karşı hücrel düzeyde koruyucu etkisi, mitokondride antioksidan (CAT, SOD, GSH ve GPX) ve trikarboksilik asit döngüsü enzimlerinin aktivitelerini ve ROS ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin seviyelerini iyileştirerek gösterilmiştir (Ijaz ve ark., 2022).

Fluoksetin tarafından indüklenen hepatotoksisite modelinde, Ganguly ve ark. (2022) 100 mg/kg baicalin uygulamasının MDA ve ileri oksidasyon protein ürünleri seviyelerinde azalmaya ve GSH seviyelerinde artışa yol açtığını, ayrıca karaciğerde SOD, CAT ve GST aktivitelerini arttırdığını göstermiştir. Bununla birlikte 50 mg/kg dozundaki baicalin tedavisinin ise, CAT hariç oksidatif stres biyobelirteçlerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada ise, Du ve ark. (2010) baicalinin kanser hücrelerinde katalaz ve GST'yi etkilemeden SOD aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise, baicalinin MDA ve TOS seviyelerini anlamlı olarak azalttığı ve literatüre uygun olarak GST aktivitesi hariç antioksidanları (SOD-CAT aktiviteleri ve GSH-TAC seviyeleri) artırdığı gösterilmiştir. CP+Baicalin grubunda GST aktivitesinde değişiklik olmamasının nedeni, çalışmamızda uyguladığımız baicalinin 100 mg/kg dozunda kullanılmasıyla bağlantılı olabileceğini ve daha yüksek dozlardaki baicalinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkisini güçlendirebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, oksidanlar/antioksidanlar ile ilgili olarak, farklı organlar arasında baicalin tedavisine verilen yanıtın değişmesinin de bir başka neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Apigenin ve baicalin (tek başına veya düşük doz kombinasyonunda) tedavisinin klorokin kaynaklı testis hasarındaki rolünü inceleyen bir çalışmada, serum testosteron, FSH ve LH seviyelerindeki, dokudaki anti-oksidan parametrelerdeki ve sperm sayısı, hareketliliği ve canlılığındaki azalmayı olumlu yönde ve doza bağlı olarak etkilediği gösterilmiştir. Bu çalışmada baicalinin tek başına etkisinin kombinasyon tedavisine kıyasla daha fazla olduğu ileri sürülmüştür (Akilah ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda baicalin tedavisi CP+Baicalin grubunda CP'ye kıyasla testosteron, FSH ve LH seviyelerini anlamlı olarak arttırmıştır. Baicalinin hormon seviyeleri üzerindeki bu olumlu etkisinin, testis dokusu üzerindeki koruyucu etkisinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sepsis modeli üzerinde yapılan bir araştırmada, 200 mg/kg baicalin tedavisinin renal dokunun patolojik durumunu iyileştirdiğini ve apoptoz oluşumunu azalttığını ortaya konulmuştur (Zhu ve ark., 2016). Guo ve ark. (2015) baicalinin sıgır Sertoli hücrelerinde ısı stresine bağlı oluşan hücre apoptozunu Fas/FasL yolunun aktivasyonu ve yüksek oranda strese bağlı 72-kDa protein ekspresyonunun yukarı regülasyonu yoluyla azalttığını göstermiştir.

Baicalin'in erkek infertilitesi ile komplike olan depresyondaki rolünün patofizyolojisi hakkında yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Baicalin'in β -katenin'i modüle ederek depresif sıçanlarda inflamasyonun neden olduğu üreme kapasitesindeki düşüşü azalttığı keşfedilmiştir (Fan ve ark., 2022). Ayrıca, bu çalışmada baicalinin apoptotik hücre sayısını azalttığı tespit edilmiştir.

Torsiyon/detorsiyon testis hasar modelinde, Fouad ve ark. (2017) baicalinin doza bağılı bir şekilde, artmış testiküler BCL2-ilişkili X proteini (Bax), sitozolik sitokrom c, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerini azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada baicalinin anti-apoptotik etkisinin doza bağılı bir şekilde Fas ligandının ekspresyonunu ve histopatolojik hasarı azalttığı gösterilmiştir. Sui ve ark. (2019) ısı stresi modeli üzerine yaptıkları bir çalışmada, baicalinin antioksidatif enzim aktivitelerini artırarak ve muhtemelen Fas/FasL apoptoz yolunu inhibe ederek testis hasarını hafiflettiğini göstermişlerdir. Baicalinin asetaminofen kaynaklı akut karaciğer hasar modelinde, hepatik PCNA ve siklinD1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Shi ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda baicalin tedavisinin literatürle uyumlu olarak CP grubuna kıyasla CP+Baicalin grubunda PCNA pozitif hücre sayısını arttırdığı ve TUNEL pozitif hücre sayısını ise azalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, CP'in sperm sayı ve morfolojisi, testis histolojisi ve cinsiyet hormonu seviyeleri üzerinde olumsuz yönde bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen tüm verilerimiz CP'nin lipid peroksidasyonu, apoptotik hücre sayısını ve ROS seviyelerini artırarak ve proliferatif hücre sayısını azaltarak spermatogenezi bozduğunu ve testis hasarına neden olduğunu göstermektedir. Baicalin tedavisinin ise CP'nin yol açtığı tüm bu olumsuz etkileri tersine çevirdiği ortaya konulmuştur. Baicalin'in sperm sayısı ve morfolojisi, oksidatif stres parametreleri, seks hormonu seviyeleri ve proliferatif hücreler üzerindeki olumlu etkisinin ise antioksidan ve anti-apoptotik fonksiyonundan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, baicalinin CP'ye bağılı testis hasarı üzerindeki iyileştirici etkisi, kemoterapiye bağılı erkek infertilitesine karşı umut verici bir ajan olabileceğini ve klinik uygulamada potansiyel etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

8. KAYNAKLAR

- Adana, M. Y., Imam, A., Bello, A. A., Sunmonu, O. E., Alege, E. P., Onigbolabi, O. G., & Ajao, M. S. (2022). Oral thymoquinone modulates cyclophosphamide-induced testicular toxicity in adolescent Wistar rats. *Andrologia*, 54(4), e14368. <https://doi.org/10.1111/and.14368>
- Aebi H. (1974). Catalase in vitro. In Bergmeyer HU. Verlag Chemie (Eds), *Methods of enzymatic analysis* (pp:121-61974)
- Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., & Robaire, B. (2001). Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. *Molecular reproduction and development*, 60(3), 302–311. <https://doi.org/10.1002/mrd.1092>
- Ahmed, A. R., & Hombal, S. M. (1984). Cyclophosphamide (Cytosan). A review on relevant pharmacology and clinical uses. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 11(6), 1115–1126. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(84\)80193-0](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(84)80193-0)
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Mitchell, L. A., Lambourne, S. R., Connaughton, H. S., & De Iulius, G. N. (2012). Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biology of reproduction*, 87(5), 110. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102020>
- Akbel, E., Kucukkurt, I., Ince, S., Demirel, H. H., Acaroz, D. A., Zemheri-Navruz, F., & Kan, F. (2023). Investigation of protective effect of resveratrol and coenzyme Q10 against cyclophosphamide-induced lipid peroxidation, oxidative stress and DNA damage in rats. *Toxicology research*, 13(1), tfad123. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfad123>
- Akilah A., Balaha M., Rahman MA., Hedy S. (2018) Apigenin and baicalin, each alone or in low-dose combination, attenuated chloroquine induced male infertility in adult rats. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 42: Iss. 3, Article 2.

- Akomolafe, S. F., & Aluko, B. T. (2020). Protective effect of curcumin on fertility in cyclophosphamide exposed rats: Involvement of multiple pathways. *Journal of food biochemistry*, 44(1), e13095. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13095>
- Alev, B., Tunalı, S., Üstündağ, Ü. V., İpekçi, H. (2023). Chard extract increased gastric sialic acid and ameliorated oxidative stress in valproic acid-administered rats. *Food and Health*, 9(2), 139-147. <https://doi.org/10.3153/FH23013>
- Alkhalaf, M. I., Alansari, W. S., Alshubaily, F. A., Alnajeebi, A. M., Eskandrani, A. A., Tashkandi, M. A., & Babteen, N. A. (2020). Chemoprotective effects of inositol hexaphosphate against cyclophosphamide-induced testicular damage in rats. *Scientific reports*, 10(1), 12599. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68608-9>
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(5), IE01–IE05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23927.9886>
- Bakhtiary, Z., Shahrooz, R., Ahmadi, A., & Soltanalinejad, F. (2020). Protective effect of ethyl pyruvate on testicular histology and fertilization potential in cyclophosphamide treated mice. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 11(1), 7–13. <https://doi.org/10.30466/vrf.2018.91253.2047>
- Besse, J. P., Latour, J. F., & Garric, J. (2012). Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment international*, 39(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.002>
- Beutler E. (1975). Glutathione in red cell metabolism. In Beutler E. Grune and Strattion (Eds.), *A Manual of Biochemical Methods*, New York, (pp 112-114).
- Białk-Bielińska, A., Mulkiewicz, E., Stokowski, M., Stolte, S., & Stepnowski, P. (2017). Acute aquatic toxicity assessment of six anti-cancer drugs and one metabolite using biotest battery- Biological effects and stability under test conditions. *Chemosphere*, 189, 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.174>

- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Ceribaşı, A. O., Türk, G., Sönmez, M., Sakin, F., & Ateşşahin, A. (2010). Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 107(3), 730–736. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00571.x>
- Chen ZY, Su YL, Bi YR, Tsang SY. (2000). Effect of baicalein and acetone extract of *Scutellaria baicalensis* on canola oil oxidation. *J Am Oil Chem Soc*; 77: 73–78.
- Cheng, C. S., Chen, J., Tan, H. Y., Wang, N., Chen, Z., & Feng, Y. (2018). *Scutellaria baicalensis* and Cancer Treatment: Recent Progress and Perspectives in Biomedical and Clinical Studies. *The American journal of Chinese medicine*, 46(1), 25–54. <https://doi.org/10.1142/S0192415X18500027>
- Conklin K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 294–300. <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>
- Damian, E., Ianăș, O., & Bădescu, I. (1986). Effect of melatonin-free pineal extract on sialic acid in hemicastrated and testosterone-treated rats. *Endocrinologie*, 24(1), 11–16.
- D'Andrea, M. R., Lawrence, D., Nagele, R. G., Wang, C. Y., & Damiano, B. P. (2008). PCNA indexing as a preclinical immunohistochemical biomarker for testicular toxicity. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 83(5), 211–220. <https://doi.org/10.1080/10520290802521804>
- Das, U. B., Mallick, M., Debnath, J. M., & Ghosh, D. (2002). Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian journal of andrology*, 4(3), 201–207.
- de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of andrology*, 13(5), 368–378.

- Dere, E., Anderson, L. M., Hwang, K., & Boekelheide, K. (2013). Biomarkers of chemotherapy-induced testicular damage. *Fertility and sterility*, 100(5), 1192–1202. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.017>
- Doshi, S. B., Khullar, K., Sharma, R. K., & Agarwal, A. (2012). Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 10, 109. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-109>
- Du, G., Han, G., Zhang, S., Lin, H., Wu, X., Wang, M., Ji, L., Lu, L., Yu, L., & Liang, W. (2010). Baicalin suppresses lung carcinoma and lung metastasis by SOD mimic and HIF-1alpha inhibition. *European journal of pharmacology*, 630(1-3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.12.014>
- Ebokaiwe, A. P., Obasi, D. O., Njoku, R. C., & Osawe, S. (2022). Cyclophosphamide-induced testicular oxidative-inflammatory injury is accompanied by altered immunosuppressive indoleamine 2, 3-dioxygenase in Wister rats: Influence of dietary quercetin. *Andrologia*, 54(3), e14341. <https://doi.org/10.1111/and.14341>
- El Gharabawy, G., Abd Allah, E., Amr, I., Elmitwalli, M. (2019). Histological and Immunohistochemical Study of The Effect of Cyclophosphamide on Testis of Male Adult Albino Rats and The Possible Protective Role of Vitamin E. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 77(6), 5930-5946. <http://doi.org/10.21608/ejhm.2019.65258>
- Elangovan, N., Chiou, T. J., Tzeng, W. F., & Chu, S. T. (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*, 222(1-2), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.027>
- El-Ela, S. R. A., Zaghloul, R. A., & Eissa, L. A. (2022). Promising cardioprotective effect of baicalin in doxorubicin-induced cardiotoxicity through targeting toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B and Wnt/ β -catenin pathways. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 102, 111732. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111732>
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>

- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
- Faber, M., Coudray, C., Hida, H., Mousseau, M., & Favier, A. (1995). Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biological trace element research*, 47(1-3), 117–123. <https://doi.org/10.1007/BF02790108>
- Fan, R., Dai, F., Zhang, C., Zhou, L., Qiu, X., & Li, Y. (2022). Baicalin Attenuates Continuous Activation of β -Catenin Induced by Lipopolysaccharide (LPS) and Depression Complicated by Infertility in Male Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2022, 2112359. <https://doi.org/10.1155/2022/2112359>
- Filipič, M., Novak, M., & Žegura, B. (2020). Genotoxicity of the Residues of Anticancer Drugs: A Hazard for Aquatic Environment. *Fate and Effects of Anticancer Drugs in the Environment*, 403-420. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21048-9_16
- Fouad, A. A., Qutub, H. O., & Jresat, I. (2017). Dose-dependent protective effect of baicalin against testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia*, 49(1), 10.1111/and.12580. <https://doi.org/10.1111/and.12580>
- Fukushima, T., Yamamoto, T., Kikkawa, R., Hamada, Y., Komiyama, M., Mori, C., & Horii, I. (2005). Effects of male reproductive toxicants on gene expression in rat testes. *The Journal of toxicological sciences*, 30(3), 195–206. <https://doi.org/10.2131/jts.30.195>
- Gabrielska, J., Oszmiański, J., Zylka, R., & Komorowska, M. (1997). Antioxidant activity of flavones from *Scutellaria baicalensis* in lecithin liposomes. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 52(11-12), 817–823.
- Ganguly, R., Kumar, R., & Pandey, A. K. (2022). Baicalin provides protection against fluoxetine-induced hepatotoxicity by modulation of oxidative stress and inflammation. *World journal of hepatology*, 14(4), 729–743. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i4.729>

- Gao, Z., Huang, K., Yang, X., & Xu, H. (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et biophysica acta*, 1472(3), 643–650. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(99\)00152-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(99)00152-x)
- Gartner L.P., Hiatt J.L., Strum J.M. (2011). *Cell Biology and Histology*, Board Review Series (sixth edition, pp. 313-315)
- Ghobadi, E., Moloudizargari, M., Asghari, M. H., & Abdollahi, M. (2017). The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 13(5), 525–536. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1277205>
- Ghosh, D., Das, U. B., Ghosh, S., Mallick, M., & Debnath, J. (2002). Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug and chemical toxicology*, 25(3), 281–292. <https://doi.org/10.1081/dct-120005891>
- Gille, L., & Nohl, H. (1997). Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free radical biology & medicine*, 23(5), 775–782. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00025-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00025-7)
- Gomez-Canela, ' C., Santos, M.S.F., Franquet-Griell, H., Alves, A., Ventura, F., Lacorte, S. (2020). Predicted Environmental concentrations: a useful tool to evaluate the presence of cytostatics in surface waters. In: *Fate and Effects of Anticancer Drugs in the Environment*. Springer International Publishing, pp. 27–54. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21048-9_2.
- Gozen A, Demiryurek S, Taskin A, Ciralik H, Bilinc H, Kara S, Aydin A, Aksoy N, Ceylan H. (2013). Protective activity of ischemic preconditioning on rat testicular ischemia: effects of Y-27632 and 5-hydroxydecanoic acid. *J Pediatr Surg*, 48(7): 1565-1572. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.10.074>
- Guichard, N., Guillarme, D., Bonnabry, P., & Fleury-Souverain, S. (2017). Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. *The Analyst*, 142(13), 2273–2321. <https://doi.org/10.1039/c7an00367f>

- Guo, X., Chi, S., Cong, X., Li, H., Jiang, Z., Cao, R., & Tian, W. (2015). Baicalin protects sertoli cells from heat stress-induced apoptosis via activation of the Fas/FasL pathway and Hsp72 expression. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 57, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.049>
- Harma M, Erel O. (2003). Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*, 133:563-566. <https://doi.org/10.4414/smw.2003.10397>
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*, 116(5), 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Hosseini, A., Zare, S., Borzouei, Z., & Ghaderi Pakdel, F. (2018). Cyclophosphamide-induced testicular toxicity ameliorate by *American ginseng* treatment: An experimental study. *International journal of reproductive biomedicine*, 16(11), 711–718.
- Howell, S. J., & Shalet, S. M. (2002). Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *International journal of andrology*, 25(5), 269–276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2002.00365.x>
- Huang, J., Zhang, X., Yang, X., Yv, Q., Ye, F., Chen, S., Cui, Y., Gu, L., Zhu, M., & Li, W. (2024). Baicalin exerts neuroprotective actions by regulating the Nrf2-NLRP3 axis in toxin-induced models of Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*, 387, 110820. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110820>
- Huang, Y., Tsang, S. Y., Yao, X., & Chen, Z. Y. (2005). Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders*, 5(2), 177–184. <https://doi.org/10.2174/1568006043586206>
- Ibrahim, D., Abozied, N., Abdel Maboud, S., Alzamami, A., Alturki, N. A., Jaremko, M., Alanazi, M. K., Alhuthali, H. M., & Seddek, A. (2023). Therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in cyclophosphamide-induced infertility. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1122175. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1122175>
- Ijaz, M. U., Shahzadi, S., Ashraf, A., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Riaz, M. N., Sultana, S. (2022). Protective effect of baicalin on methotrexate-induced mitochondrial damage in testicular tissues of rats. *Journal of King Saud University-Science*, 34(8), 102343.

- Ilbey, Y. O., Ozbek, E., Simsek, A., Otunctemur, A., Cekmen, M., & Somay, A. (2009). Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertility and sterility*, 92(3), 1124–1132. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1758>
- Jain G.C., Pareek H., Sharma S., Bhardwaj M., Khajja B.S. Reproductive Toxicity of Vanadyl Sulphate in Male Rats. (2007). *Journal of Health Science*, 53(1),137-141. <https://doi.org/10.1248/jhs.53.137>
- Johnsen S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1(1), 2–25. <https://doi.org/10.1159/000178170>
- Junqueira, LC and Carneiro, J. (2021). *Basic Histology: Text & Atlas*. New York: McGraw-Hill (sixteenth edition)
- Kackar, R., Srivastava, M. K., & Raizada, R. B. (1997). Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. *Industrial health*, 35(1), 104–111. <https://doi.org/10.2486/indhealth.35.104>
- Kanno T.Y.N, Sensiate LA., de Paula NA., Salles MJS. (2009). Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Braz J Pharm Sci*.45:313-9.<https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200017>
- Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research*, 256(1), 42–49. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4838>
- Khamis, T., Hegazy, A. A., El-Fatah, S. S. A., Abdelfattah, E. R., Abdelfattah, M. M. M., Fericean, L. M., & Arisha, A. H. (2023). Hesperidin Mitigates Cyclophosphamide-Induced Testicular Dysfunction via Altering the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis and Testicular Steroidogenesis, Inflammation, and Apoptosis in Male Rats. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(2), 301. <https://doi.org/10.3390/ph16020301>

- Kim, W. I., Lim, J. O., Pak, S. W., Lee, S. J., Shin, I. S., Moon, C., Heo, J. D., & Kim, J. C. (2022). Exposure to China dust exacerbates testicular toxicity induced by cyclophosphamide in mice. *Toxicological research*, 39(1), 115–125. <https://doi.org/10.1007/s43188-022-00149-x>
- Koppers, A. J., Mitchell, L. A., Wang, P., Lin, M., & Aitken, R. J. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *The Biochemical journal*, 436(3), 687–698. <https://doi.org/10.1042/BJ20110114>
- Köroğlu, K. M., Çevik, Ö., Şener, G., & Ercan, F. (2019). Apocynin alleviates cisplatin-induced testicular cytotoxicity by regulating oxidative stress and apoptosis in rats. *Andrologia*, 51(4), e13227. <https://doi.org/10.1111/and.13227>
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., & Kadziółka, A. (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 155(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)
- Lee, Y. J., & Shacter, E. (1999). Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(28), 19792–19798. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19792>
- Lin, M., Li, L., Li, L., Pokhrel, G., Qi, G., Rong, R., & Zhu, T. (2014). The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 19. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-19>
- Liu, X., Li, Q., Wang, Z., & Liu, F. (2021). Identification of abnormal protein expressions associated with mouse spermatogenesis induced by cyclophosphamide. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(3), 1624–1632. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16263>
- Liu, Y., Hong, Z., Chen, P., Wang, J., Zhou, Y., & Huang, J. (2019). Baicalin inhibits growth and induces apoptosis of human osteosarcoma cells by suppressing the AKT pathway. *Oncology letters*, 18(3), 3188–3194. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10617>

- Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. (2009). Oxidative stress & male infertility. *The Indian journal of medical research*, 129(4), 357–367.
- Miller, M. A., & Zachary, J. F. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 2–43. e19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1>
- Mythroie, A. A., Collins, H., Umbles, C., & Kyle, J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and applied pharmacology*, 82(3), 512–520. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(86\)90286-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(86)90286-3)
- Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Saba, A. B., Adedara, I. A., Olowu, E. R., Akinrinde, A. S., & Dada, R. O. (2016). Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *Andrologia*, 48(4), 393–401. <https://doi.org/10.1111/and.12459>
- Qiu, J., Hales, B. F., & Robaire, B. (1992). Adverse effects of cyclophosphamide on progeny outcome can be mediated through post-testicular mechanisms in the rat. *Biology of reproduction*, 46(5), 926–931. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.5.926>
- Ran, L., Chen, Q., Lu, X., Gao, Z., Cui, F., Liu, X., & Xue, B. (2023). Novel treatment and insight for irradiation-induced injuries: Dibucaine ameliorates irradiation-induced testicular injury by inhibiting fatty acid oxidation in primary Leydig cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 164, 114903. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114903>
- Ritchie, C., & Ko, E. Y. (2021). Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. *Andrologia*, 53(1), e13581. <https://doi.org/10.1111/and.13581>
- Robaire, B., & Hales, B. F. (2003). Mechanisms of action of cyclophosphamide as a male-mediated developmental toxicant. *Advances in experimental medicine and biology*, 518, 169–180. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9190-4_14
- Ross, M.H. and Pawlina, W. (2016). *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (7th edition)

- Rosselli, M., Keller, P. J., & Dubey, R. K. (1998). Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human reproduction update*, 4(1), 3–24. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.1.3>
- Sallam AO., Rizk HA., Emam MA., Fad SE., Abdelhiee EY., Khater H., Elkomy A. and Aboubakr M. (2021) The ameliorative effects of L-carnitine against cisplatin-induced gonadal toxicity in rats. *Pak Vet. J.*, 41:147–151. <https://doi: 10.29261/pakvetj/2020.082>
- Sawicka, E., Długosz, A., Rembacz, K. P., & Guzik, A. (2013). The effects of coenzyme Q10 and baicalin in cisplatin-induced lipid peroxidation and nitrosative stress. *Acta poloniae pharmaceutica*, 70(6), 977–985.
- Saxena AK, Kumar A. (2020). Effect of cyclophosphamide on testis- Protein profile study. In Saxena AK, Kumar A. (Eds). Fish analysis for drug and chemicals mediated cellular toxicity. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, Springer, Singapore, pp:25-42
- Shabaan, S., Madi, N., Elgharib, M., Nasif, E. (2021). Study the Effect of Silymarin on Cyclophosphamide Induced Testicular Damage in Adult Albino Rats. *Bull. Egypt. Soc. Physiol. Sci.*, 41, 553–564.
- Shacter, E., Williams, J. A., Hinson, R. M., Sentürk, S., & Lee, Y. J. (2000). Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*, 96(1), 307–313.
- Shi, L., Zhang, S., Huang, Z., Hu, F., Zhang, T., Wei, M., Bai, Q., Lu, B., & Ji, L. (2020). Baicalin promotes liver regeneration after acetaminophen-induced liver injury by inducing NLRP3 inflammasome activation. *Free radical biology & medicine*, 160, 163–177. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.012>
- Shieh, D. E., Liu, L. T., & Lin, C. C. (2000). Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer research*, 20(5A), 2861–2865.
- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, 215(2), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>

- Solomon, R., AbuMadighem, A., Kapelushnik, J., Amano, B. C., Lunenfeld, E., & Huleihel, M. (2021). Involvement of Cytokines and Hormones in the Development of Spermatogenesis In Vitro from Spermatogonial Cells of Cyclophosphamide-Treated Immature Mice. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1672. <https://doi.org/10.3390/ijms22041672>
- Sotomayor, R. E., & Cumming, R. B. (1975). Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ cell stages of male mice: cytological characterization and transmission. *Mutation research*, 27(3), 375–388. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(75\)90295-x](https://doi.org/10.1016/0027-5107(75)90295-x)
- Subramaniam S., Shyama S., Jagadeesan M., Shyamala Devi CS. (1993). Oxidant and antioxidant levels in the erythrocytes of breast cancer patients treated with CMF. *Med Sci Res*. 21:79-80
- Sui, J., Feng, Y., Li, H., Cao, R., Tian, W., & Jiang, Z. (2019). Baicalin protects mouse testis from injury induced by heat stress. *Journal of thermal biology*, 82, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.03.009>
- Sziva RE, Ács J, Tőkés AM, Korsós-Novák Á, Nádasy GL, Ács N, Horváth PG, Szabó A, Ke H, Horváth EM, Kopa Z, Várbiro S. (2022). Accurate quantitative histomorphometric-mathematical image analysis methodology of rodent testicular tissue and its possible future research perspectives in andrology and reproductive medicine. *Life (Basel)*, 12(2): 189. <http://doi.org/10.3390/life12020189>
- Tan, N., Sun, C. X., Zhu, H. J., Li, D. Y., Huang, S. G., & He, S. D. (2021). Baicalin attenuates adriamycin-induced nephrotic syndrome by regulating fibrosis procession and inflammatory reaction. *Genes & genomics*, 43(9), 1011–1021. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01107-x>
- Tekeli, M. Y., Eraslan, G., Bayram, L. Ç., Aslan, C., & Çalimli, S. (2023). The protective effects of baicalin and chrysin against emamectin benzoate-induced toxicity in Wistar albino rats. *Environmental science and pollution research international*, 30(18), 53997–54021. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26110-5>

- Torabi, F., Malekzadeh Shafaroudi, M., & Rezaei, N. (2017). Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. *International journal of reproductive biomedicine*, 15(7), 403–412.
- Trasler, J. M., & Robaire, B. (1988). Effects of cyclophosphamide on selected cytosolic and mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. *Journal of andrology*, 9(2), 142–152. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1988.tb01026.x>
- Trasler, J. M., Hales, B. F., & Robaire, B. (1987). A time-course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment in rats: effects on pregnancy outcome and the male reproductive and hematologic systems. *Biology of reproduction*, 37(2), 317–326. <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.2.317>
- Trasler, J. M., Hermo, L., & Robaire, B. (1988). Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biology of reproduction*, 38(2), 463–479. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.463>
- Tripathi, D. N., & Jena, G. B. (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*, 248(2-3), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.015>
- Tripathi, D. N., & Jena, G. B. (2009). Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. *Chemico-biological interactions*, 180(3), 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.017>
- Türk, G., Ceribaşı, A. O., Sakin, F., Sönmez, M., & Ateşşahin, A. (2010). Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reproduction, fertility, and development*, 22(4), 587–596. <https://doi.org/10.1071/RD09078>
- Varki A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends in molecular medicine*, 14(8), 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.002>
- Venkatesan, N., Punithavathi, D., & Chandrakasan, G. (1998). Biochemical and connective tissue changes in cyclophosphamide-induced lung fibrosis in rats. *Biochemical pharmacology*, 56(7), 895–904. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00221-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00221-4)

- Venkatesh, S., Shamsi, M. B., Deka, D., Saxena, V., Kumar, R., & Dada, R. (2011). Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *The Indian journal of medical research*, 134(3), 396–398.
- Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069>
- Wallace, E. M., Groome, N. P., Riley, S. C., Parker, A. C., & Wu, F. C. (1997). Effects of chemotherapy-induced testicular damage on inhibin, gonadotropin, and testosterone secretion: a prospective longitudinal study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82(9), 3111–3115. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.9.4238>
- Wang Y. (2002). Epididymal sperm count. *Current Protocol in Toxicology*, 14(1): 16.6.1-16.6.5. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1606s14>
- Wang, L., Feng, T., Su, Z., Pi, C., Wei, Y., & Zhao, L. (2022). Latest research progress on anticancer effect of baicalin and its aglycone baicalein. *Archives of pharmacal research*, 45(8), 535–557. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01397-z>
- Wang, Y., Zou, Z., Jaisi, A., & Olatunji, O. J. (2021). Unravelling the Protective Effects of Emodin Against Cyclophosphamide Induced Gonadotoxicity in Male Wistar Rats. *Drug design, development and therapy*, 15, 4403–4411. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S333383>
- Wang, Z. L., Wang, S., Kuang, Y., Hu, Z. M., Qiao, X., & Ye, M. (2018). A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharmaceutical biology*, 56(1), 465–484. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1492620>
- Warren, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 1971-1975. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69851-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69851-5)
- Wei, X., Zhu, X., Hu, N., Zhang, X., Sun, T., Xu, J., & Bian, X. (2015). Baicalin attenuates angiotensin II-induced endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(1), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.138>

- Woźniak, D., Dryś, A., & Matkowski, A. (2015). Antiradical and antioxidant activity of flavones from *Scutellariae baicalensis radix*. *Natural product research*, 29(16), 1567–1570. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.983920>
- Wu, Y., Wang, F., Fan, L., Zhang, W., Wang, T., Du, Y., & Bai, X. (2018). Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 97, 1673–1679. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.024>
- Xia, L. B., Jiang, P., He, Y. F., Sun, T. T., Zhou, Y., & Zuo, R. H. (2022). Cistanches tubulosa water extract protects the testis against cyclophosphamide-induced injury: Effect and mechanism. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 28(9):771-778.
- Xu, M., Chen, X., Gu, Y., Peng, T., Yang, D., Chang, R. C., So, K. F., Liu, K., & Shen, J. (2013). Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of ethnopharmacology*, 150(1), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.020>
- Yuan, Z. M., Smith, P. B., Brundrett, R. B., Colvin, M., & Fenselau, C. (1991). Glutathione conjugation with phosphoramidate mustard and cyclophosphamide. A mechanistic study using tandem mass spectrometry. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 19(3), 625–629.
- Zhao, Q., Chen, X. Y., & Martin, C. (2016). *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Science bulletin*, 61(18), 1391–1398. <https://doi.org/10.1007/s11434-016-1136-5>
- Zhao, T., Tang, H., Xie, L., Zheng, Y., Ma, Z., Sun, Q., & Li, X. (2019). *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 71(9), 1353–1369. <https://doi.org/10.1111/jphp.13129>
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., & He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(14), 2681–2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>

- Zhu, Y., Fu, Y., & Lin, H. (2016). Baicalin Inhibits Renal Cell Apoptosis and Protects Against Acute Kidney Injury in Pediatric Sepsis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 5109–5115. <https://doi.org/10.12659/msm.899061>
- Zini, A., & Sigman, M. (2009). Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of andrology*, 30(3), 219–229.

9. ÖZGEÇMİŞ

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Bildiri

Altay G. & Ak E. (2023, March 18-19). *Histological Evaluation of the Effect of Baicalin on Cyclophosphamide Induced Testicular Damage in Rats* [Conference presentation]. UTSAK 2023 Congress, Ankara, Türkiye.
<https://www.utsakcongress.com/sunumlar.php>

Proje

Ak E. & Altay G. Siklofosfamid ile oluşturulan sıçan testis hasarı üzerine baicalinin olası iyileştirici etkisinin incelenmesi. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK-2022-10413), 2022-2024.

11.EKLER