

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GONADOTOKSİSİTEDE ASETİL L-CARNİTİN'İN TESTİSTEKİ KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neslihan COŞKUN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. M. Tahir HATİPOĞLU

ANKARA
Haziran 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GONADOTOKSİSİTEDE ASETİL L-CARNİTİN'İN TESTİSTEKİ KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neslihan COŞKUN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. M. Tahir HATİPOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-20 proje numarası ile desteklenmiştir

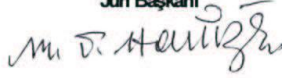
ANKARA
Haziran 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 05/07/2011

İmza
Prof. Dr. M. Tahir HATİPOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Prof. Dr. Candan ÖZÖĞÜL
Gazi Üniversitesi



İmza
Prof. Dr. Eray KARAHACIOĞLU
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller, Fotoğraflar, Grafikler	v
Tablolar	viii
Kısaltmalar ve Simgeler	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Testis Embriyolojisi	5
2.2. Testis Anatomisi	8
2.2.1. Testis'in Damarları ,Lenf Dolaşımı ve Sinirleri	11
2.3. Testis Histolojisi	12
2.3.1. Seminifer Tübüller	14
2.3.2. Sertoli Hücreleri	15
2.3.3. Spermatogenik Hücreler	18
2.3.3.1. Spermatogonium (Spermatogonium)	19
2.3.3.2. Spermatozoid (Spermatocytus)	20
2.3.3.3. Spermatid (Spermatidium)	21
2.3.3.4. Spermium (Spermium)	23
2.3.4. İnterstisyel Doku ve Leydig hücreleri	24
2.4. Testis Fizyolojisi	26
2.5. Kemoterapi	29
2.5.1. Kemoterapötik Ajanlar	32
2.6. Cisplatin (CİS-DİAMİNEKLOROPLATİNUM II = CDDP)	36
2.6.1. Cisplatin'in Yapısı ve Etki Mekanizması	37
2.6.2. Cisplatine Bağlı Toksisite ve Toksisitenin Önlenmesi	42
2.6.3. Cisplatinin Farmakokinetiği	45

2.7. Apoptozis	45
2.7.1. Apoptozisin Biyolojik Süreçteki Rolü	47
2.7.2. Apoptozis Morfolojisi ve Biyokimyasal Özellikleri	49
2.7.3. Apoptozis Mekanizması	51
2.7.3.1. Apoptozis'i Etkileyen İç ve Dış Uyaranlar	52
2.7.3.2. Apoptozis Düzenleyicileri	52
2.7.3.3. Apoptozis Yolakları	65
2.8. Antioksidanlar	72
2.8.1. Serbest Radikaller ve Etki Mekanizmaları	73
2.8.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	77
2.8.3. Antioksidanların Sınıflandırılması	78
2.8.3.1. Kaynaklarına göre	78
2.8.3.2. Yapılarına göre	79
2.8.3.3. Çözünürlüklerine göre	79
2.8.3.4. Yerleşimlerine göre	79
2.8.3.5. Enzimatik Antioksidanlar	80
2.8.3.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	80
2.8.3.5.2. Katalaz (CAT)	81
2.8.3.5.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	82
2.8.3.6. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	84
2.8.3.6.1. Diyetle Alınan Antioksidanlar	84
2.8.3.6.2. Diğer Antioksidanlar	84
2.9. L-Karnitin	84
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	89
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	89
3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem	91
3.3. TUNEL Yöntemi	93
3.4. TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) Yöntemi	94
3.5. İstatistiksel Yöntem	95
4. BULGULAR	96
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	96

4.1.1. Testis Histomorfolojisi	96
4.1.2. Spermiyum Morfolojisi	98
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	98
4.3. İstatistiksel Bulgular	100
4.3.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	100
4.3.2. Tübül Çapı ve Tübül Epiteli Boyutlarının Değerlendirilmesi	102
5. TARTIŞMA	120
6. SONUÇ	133
7. ÖZET	136
8. SUMMARY	138
9. KAYNAKLAR	140
10.EKLER	158
EK-1: Etik Kurul Raporu	158
EK-2: Sertifika	159
11.TEŞEKKÜR	160
12.ÖZGEÇMİŞ	161

ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE FOTOĞRAFLAR

Şekiller

Şekil 1. Leydig hücrelerinden testosteron salınımı

Şekil 2. Cisplatinin moleküler yapısı

Şekil 3. Cisplatin İzomerleri

Şekil 4. Pürin bazlarının (Adenin ve Guanin) reaktif 7.azot atomu

Şekil 5. Cisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar

Şekil 6. Cisplatine bağlı gelişen toksisiteler

Şekil 7. Apoptozis morfolojisi

Şekil 8. Bcl-2 ailesi proteinlerinin yapısı

Şekil 9. İnaktif prokaspazın aktif kaspaza dönüşümü

Şekil 10. Kaspazların yapısı

Şekil 11. Apoptozis yolakları

Şekil 12. Oksijen türevli radikaller

Şekil 13. Antioksidan Mekanizmalar

Şekil 14. L-karnitin ve diğer kimyasal formlarının yapısı

Fotoğraflar

Fotoğraf 1. Normal görünümde kontrol grubu testis dokusu H&E

Fotoğraf 2. Kontrol grubunda intersitisyum (yıldızlar) ve seminifer tübüller (ST) Normal görünümde Sertoli hücreleri (kırmızı ok) ve germ hücre serileri (siyah ok). H&E

Fotoğraf 3. Yalın L-carnitin grubundan alınan testis doku örnekleri kontrol grubunda olduğu gibi normal görünümdeydi. H&E

Fotoğraf 4. Yalın L-carnitin grubunda normal görünümde seminifer tübüller (ST) ve germ hücre serileri (siyah ok). H&E

Fotoğraf 5. Yalın cisplatin grubundan elde edilen testis dokularında periferik dejenerasyon ve seminifer tübüllerde germ hücre deskuamasyonu (yıldız). H&E

Fotoğraf 6. Yalın cisplatin grubundaki seminifer tübüllerde germinal deskuamasyon (kırmızı oklar) H&E

Fotoğraf 7. Yalın cisplatin grubundaki testislerde merkezi ödem (yıldız) ve tübül çapındaki azalma nedeniyle birbirlerinden uzaklaşmış seminifer tübüller (siyah ok), bağlantı birimlerinin dejenerasyonun bağlı olarak germ hücrelerinin bazal membrandan uzaklaşması (kırmızı ok). H&E

Fotoğraf 8. Yalın cisplatin grubundaki seminifer tübüllerde germinal hücre katmanında azalma (siyah ok) ve lümende genişleme (yıldız). H&E

Fotoğraf 9. L-carnitin+cisplatin grubu testis doku örneklerindeki bulgular kontrol ve yalın L-carnitin grubu ile benzer görünümde. H&E

Fotoğraf 10. L-carnitin+cisplatin grubunda germ hücre deskuamasyonu, germinal epitelin bazal membrandan uzaklaşması, lümen genişlemesi, periferik ve merkezi intersitisyel ödem gözlenmedi. H&E

Fotoğraf 11. TESE uygulaması sonucu KRUGER tekniği uygulanan spermiyum örnekleri. A-B: Kontrol ve L-Carnitin gruplarında normal spermiyumlar, C: cisplatin grubu; C1: bükülmüş başlı (bend head) spermiyum, C2: orta parça anomalisi olan kement benzeri (lasso-like) spermiyum, C3: orta parça (midpeace) anomalisi olan spermiyum, C4: dönük orta parçaya sahip (looping midpeace) spermiyumlar, D1 ve D2: L-carnitin + cisplatin grubunda normal görünümde spermiyumlar.

Fotoğraf 12. Kaspaz 9 immünişaretlemesi yapılan gruplar: (A) Kontrol grubu ve (B) yalın L-carnitin grubunda immün pozitif hücre gözlenmedi.(C) cisplatin grubunda ise immünreaksiyon göstermeyen Sertoli hücreleri (kırmızı oklar), pozitif rekasiyon gösteren spermatogonyumlar (yeşil oklar) ve spermatosit l' ler (mavi oklar), (D) L-carnitin+Cisplatin grubunda ise pozitif tutulum sadece spermatosit l' lerde gözlendi. (DAB&Hematoksilen)

Fotoğraf 13. Kaspaz 8 immünişaretlemesi yapılan gruplar: (A) Kontrol grubu ve (B) yalın L-carnitin grubunda immün pozitif hücre gözlenmedi. (C) Cisplatin grubunda ise immünreaksiyon göstermeyen Sertoli hücreleri (kırmızı oklar), spermatogonyumlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyon gösteren spermatosit l' ler (mavi oklar) gözlendi. (D) L-carnitin+cisplatin grubunun kontrol ve L-karnitin gruplarına eşteş olduğu görüldü. (DAB&Hematoksilen)

Fotoğraf 14. Aktif Kaspaz 3 immünreaktivitesi tüm gruplarda negatif olarak gözlendi. (DAB&Hematoksilen)

Fotoğraf 15. TUNEL yöntemi uygulanan gruplar: (A) Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücre gözlenmedi. (B) yalın L-carnitin grubunda primer spermatositlerde TUNEL pozitif hücre gözlendi. (C) Cisplatin grubunda spermatagonia ve primer spermatositlerde TUNEL pozitif hücrelerin sayısında artış olduğu gözlendi. (D) L-carnitin+cisplatin grubunda ise, TUNEL pozitif hücrelerin sayısında azalma olduğu gözlendi. (DAB&Hematoksilen)

Grafikler

Grafik 1: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları

Grafik 2. Seminifer tübül çapları dağılımı

Grafik 3. Seminifer tübül epiteli kalınlık ölçümleri dağılımları.

TABLolar

Tablo 1. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik gruplar

Tablo 2. Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının istatistiksel farklılıkları

Tablo 3. Gruplar arası deney öncesi ve sonrası ağırlık farklarının karşılaştırılması

Tablo 4. Gruplara ait seminifer tübül çapı ölçümlerine ilişkin tamamlayıcı istatistik değerleri.

Tablo 5. Gruplar arası seminifer tübül çapı ölçümlerinin istatistiksel değerleri.

Tablo 6. Gruplara ait seminifer tübül kalınlığı ölçümlerine ilişkin tamamlayıcı istatistik değerleri.

Tablo 7. Gruplar arası seminifer tübül epiteli kalınlığı ölçümlerinin istatistiksel değerleri.

Tablo 8. Deney sonunda elde edilen canlı ve ölü hayvan verileri.

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABP : Androjen Bağlayıcı Protein

ATP : Adenozin Trifosfat

AIF : Apoptozis Uyarıcı Faktör

a. : Arter

DNA : Deoksiribonükleik Asit

FSH : Folikül Stimüle Edici Hormon

gl : Glandula

GnRH : Gonadotropin Serbestleştirici Hormon

GSH : Glutatyon

IAP : Apoptozis Baskılayıcı Faktör

LH : Lüteinleştirici Hormon

n. : Nervus

PGH : Primordiyal Germ Hücresi

PBS : Fosfat Tampon Solüsyonu

RNA : Ribonükleik Asit

SOR : Serbest Oksijen Radikalleri

SR : Serbest Radikaller

TDF : Testis Belirleyici Faktör

v. : Ven

1. GİRİŞ

Kanser, sık görülen ve öldürücü etkisi yüksek olan, günümüzde önemi giderek artan sağlık ve yaşam sorunlarından biri haline gelmiştir. Kanser 200'ü aşkın çeşidi olan bir hastalıktır. Bu çeşitlerin hepsi Türkiye'de görülmektedir. İstatistiklere göre kanser, özellikle gelişmekte olan ülkelerde kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüme yol açan nedenler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ölen hastaların %8'i kanserden ölmektedir. Gelişmiş olanlarda ise bu oran %25'dir. ^{1,2,3,4}

Dünyada her yıl 12.7 milyon kişiye kanser tanısı konulduğu ve 7.6 milyon kişinin kanserden öldüğü bildirilmiştir.⁵ Dünya Sağlık Örgütü 2005 yılında tüm dünyada görülen 58 milyon ölümün %13'ünün kanser nedeni ile olduğunu bildirmiştir.⁶ Önlem alınmadığı takdirde, dünya genelinde kanser yükünün artacağı ve 2030 yılında 26 milyon yeni tanı kanser vakasına ve 17 milyon ölüme ulaşacağı sanılmaktadır.⁵

Ülkemizde ise Devlet İstatistik Enstitüsünün, sağlık istatistikleri raporunda, toplam ölümler arasında % 12,9 (23.775 kişi) ile en sık ikinci ölüm sebebinin kanser olduğu belirtilmiştir.⁷ Sağlık Bakanlığı'nın 2000-2006 yıllarını kapsayan son çalışmasına göre, Türkiye'de 396 bin kanser olgusu bulunmakta ve her yıl, 140 bin kişi kanserden ölmektedir. Türkiye'deki hasta sayısının önümüzdeki 20 yıl içerisinde 1,5 milyona ulaşacağı öngörülmektedir.⁸ Kanser olguları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de en önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir. ⁴

Kanser insidansındaki artışa bağlı olarak, gelişen tedavi modelleri sayesinde sağ kalım oranları da her geçen gün artmaktadır. 2010 yılında her 250 kişiden birinin çocukluk ağı kanserlerinden tedavi olmuş bir birey olacağı hesaplanmıştır.⁹

Son yıllarda kanser tedavisinde meydana gelen gelişmelere bağlı olarak, modern kanser tedavisinin temelini oluşturan çok sayıda kemoterapötik ajan keşfedilmiş ve kullanıma girmiştir.⁴

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar sayesinde kansere bağlı ölüm oranlarında azalma gözlense de, uzun dönem sağ kalımlarda, büyüme problemleri, kardiovasküler problemler, nöron gelişimsel problemler, ikincil malign tümörler gibi yaşam kalitesini etkileyen çok ciddi endikasyonlar gözlenmiştir. Eşsiz değerdeki follikülleri depolayan overler ve sperm üreten testisler, kemoterapötik ilaçlara son derece duyarlıdır. Tedavi sonrası görülen reprodüktif yetmezlik oranlarının artışı, üreme sağlığını etkileyen komplikasyonları da beraberinde getirmektedir. Yüksek kemoterapi ve radyoterapi ya da kemik iliği transplantasyonuna bağlı sitotoksik tedaviler gerek over rezervini, gerekse testiküler sperm üretimini baskılayan ya da geri dönüşümsüz hasar oluşturan tedavi seçenekleridir.^{10,11}

Kemoterapi sonrası testislerde spermatogonia, spermatosit ve spermatitlerde görülen apoptoz, gonadal işlevu ve fertilitiyi etkilemektedir. Cyclophosphamide, chlorambucil, melphalan, busulfan, nitrogen mustard, procarbazine, ifosfamide, ve thiotepa gibi bazı kemoterapötik ajanlar çoğunlukla geri dönüşümsüz fertilitiyeye sebep

olurken, cisplatin ve adriamisin kısmen, bleomisin, actinomisin D, vincristine, methotreksate ve 5-fluorouracil hafif gonadotoksiktir.^{3,6,7}

Bu ajanlardan kısmi gonadotoksik olduğu belirtilen cisplatinin, testislerde doza ve zamana bağlı germ hücre apoptozunu indüklediği, düşük dozda spermatogenezisi azalttığı, yüksek dozda ise germ hücrelerini tamamen yok ettiği bildirilmiştir.^{9,12}

Cisplatin, erişkin çağda görülen pek çok tümörde ve nöroblastoma, Wilms tümörü, hepatoblastoma, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkoma gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde kemoterapi protokollerinin vazgeçilmez bir elemanıdır. Cisplatin uygulamasının doz sınırlayıcı yan etkisi olarak nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite gelişebilmektedir. Cisplatin ototoksisitesinin gelişmesinde reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ve mitokondrial oksidatif hasarın rol oynadığı belirtilmektedir.^{13,14}

L-carnitin'in güçlü bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcı olduğu gösterilmiştir.¹⁵ Pek çok hücre tipinde L-Carnitin'in oksidatif strese bağlı mitokondri hasarlanmasını ve mitokondri bağımlı apoptozu önlediği gösterilmiştir.^{16,17}

L-carnitin, hücrenin (göze) enerji üretimi için gerekli beta-oksidasyona gidebilmek üzere serbest uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrion matriksine geçişinde gerekli olup, serbest uzun zincirli yağ asitlerinin açilkarnitinlere transformasyonunda kofaktör olarak rol alır. L-carnitin, mitokondrion işlevlerinde önemli rol oynayan protektif bir ajandır,

ki nöroprotektif etkide tubulin gibi proteinlerin asetilasyonunu sağlıyor olması önemlidir. Ek olarak L-carnitin mitokondrion içindeki açılCoA / CoA oranını düzenler ve mitokondriondeki toksik ürünleri tutucu rol oynar. Bu sebeple, sistemik L-carnitin uygulamasının, cisplatinin toksik yan etkilerinden koruyucu, önleyici rolü olabilir.¹⁸

Bu çalışmanın amacı, erkek ratların testis dokusunda Cisplatinin yol açacağı gonadotoksik etkileri belirlemek ve bu etkilere karşı sistemik uygulanan L-carnitin'in koruyucu etkisini ortaya koymaktır. Bu etkilerin incelenmesi için, histokimyasal olarak morfometri ve morfoloji analizleri için hematoksilin-eosin (H&E), immünohistokimyasal olarak caspaz 3, 8, 9 ve TUNEL yöntemleri uygulandı. Ayrıca TESE yöntemi ile sperm morfolojileride incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Testis Embriyolojisi

Testisler (erbezi, orchis), karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak paraksiyal mezoderm ile lateral plağı geçici bir süre birleştiren, ara (intermediyer) mezodermden gelişirler.^{19,20,21}

Embriyonun cinsiyeti genetik açıdan döllenme sırasında belirlenmiş olmakla beraber, gonadların erkek veya dişi morfolojik özellikleri ancak embriyonal (döletsel) gelişimin 7. haftasından sonra gözlenebilir. Her iki cinste de gonadların görünümü benzerlik gösterdiğinden bu dönem seksüel gelişimin farklılaşmamış evresi olarak isimlendirilir. Bu dönemdeki gonadlara ‘farklılaşmamış gonad’ adı verilir.^{19,22,23}

Gonadlar, karın arka duvarını döşeyen mezotelden (mezodermal epitel), mezotelin altında bulunan mezenşimden (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücrelerinden (ilkel cins hücreleri) köken alır. Gonad gelişimin ilk evresi embriyonal gelişimin 5. haftasında mezonefrozun medialinde mezotelin kalınlaşması ile başlar. Mezodermal epitelin (kölom epiteli) çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması ile sağda ve solda mezonefrozun medialinde genital veya gonadal kabartı biçimlenir. Embriyonal gelişimin 6. haftasına değin genital kabarıklık içerisinde germ hücreleri yoktur. Gametler embriyonal gelişimin ikinci haftasında epiblastın içinde oluşan ve daha sonra vitellus kesesine göç eden primordial germ hücrelerinden (PGH) köken alır. Yaklaşık 10-100

primordial germ hücresi gelişimin 4. haftasından itibaren vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasından, son bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada ise genital veya gonadal kabarıklıklara yerleşirler. PGH, genital veya gonadal kabarıklıklara ulaşmazlar ise gonadlar gelişemez. İlkel gonadların over veya testise farklanmasında PGH'nin indükleyici etkisi bulunmaktadır. PGH çoğalması ve doğru yere göçü, bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörü ile hücre membran ligandı olan kök hücre faktörünün etkileşimine bağlıdır.
19,22,24,25

PGH'nin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve göçü sırasında oluşmuş olan genital kabarıklıkların kölomik epiteli çoğalır ve mezenşim içerisine doğru gömülerek parmak şeklinde primer cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli epiteloid kordonlar oluştururlar. Primer cinsiyet kordonları yüzey epiteli ile bağlantılıdır. Bu aşamaya kadar her iki cinsiyet içinde gonadların tipi aynıdır. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, içte ise medulla bulunur. XY seks kromozomuna sahip embriyoda medulla testise farklanırken, korteks bir takım kalıntılar dışında dejenere olur.^{26,27,28}

Embriyonal gelişimin 7. haftasından itibaren embriyonun erkeklik ya da dişilik yönünde gelişmeye başlaması gerçekleşir. Genetik olarak ilkel germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY ise farklanmamış gonad testis yönünde gelişir. Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunan SRY geni farklanmamış gonadın testis olarak gelişmesini sağlayan 'testis belirleyici faktör'ü (TDF) kodlar. TDF'nin etkisi altında primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Yine TDF'nin etkisi ile primer seks kordonları medullanın derinlerine doğru ilerlemesine

ve testis veya medullar kordonların biçimlenmesine neden olur. Testis kordonları gonadların hilusuna doğru ağ şeklinde birbirleri ile anastomoz yaparak, rete testis tübüllerini oluşturur. Primer seks kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantısı tunica albuginea denilen kalın fibröz kapsülün araya girmesi ile son bulur. Tunica albuginea 12. haftada gelişir. ^{19,27,28,29}

Büyüyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezospermium ile asılı hale gelir. 4. ayda testis kordonları at nalı şeklini alır. Bu kordonların uçları ince bir kanal olan tubuli rektus, tubuli rektuslar rete testise açılır. Testis kordonları, primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epiteli olan kölomik epiteliden köken alan Sertoli (epitheliocytus sustentans) hücrelerinden meydana gelmiştir. Testis kordonları arasında, genital kabarıklığın mezeneşiminden köken alan Leydig (endocrinocytus interstitialis) hücreleri bulunur. Bu hücreler gelişimin 8. haftasından itibaren androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların farklılaşmasını ve erkek dış genital organların oluşumunu sağlar. ^{19,28}

Puberteye değin solid halde bulunan kordonlar, erişkinlikte (puberta) birlikte lümenleri açılarak seminifer tübüllerini oluştururlar. Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüllerini ile birleşir ve kanalize olan diğer genital kanallara açılır. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur. Bunlar; testisin yüzey epitelinden gelişen destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve primordial germ hücrelerinden farklılaşan spermatogoniumlardır. ^{19,27,28}

Testisler embriyonal yaşamda karın boşluğunda bel omurlarının iki yanında gelişmeye başlar. Gebeliğin 12. haftasında testisler

inguinal bölgeye ulaşır. 28. haftada inguinal kanallardan geçerek, 33. haftada periton ve vajinal proses arkasından scrotuma inerler. Testisler scrotum içerisinde kısmen hareketlidir. Testisler scrotum içerisinde bulunarak, spermatogenezis için gerekli olan vücut sıcaklığından 2-3 ° C daha düşük ısıda olmaları sağlanır.³⁰

2.2. Testis Anatomisi

Testis (erbezi); iki uyluk arasında perineal bölgede scrotum içinde, sağ ve solda yerleşmiş olarak bulunan, vücut dışında yer alan spermiyumların üretiminden ve androjenlerin sentezinden sorumlu, oval şekilli bir çift organdır. Erişkin bir erkekte testislerin her biri yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm eninde ve 3 cm kalınlığında, 10-15 gr ağırlığında sert ve hareketli organlardır.^{20,31}

Testisler, scrotum içerisinde fibrovasküler sap olan funiculus spermaticus ile asılı olarak bulunurlar. Funiculus spermaticus'a, ductus deferens, a. ductus deferentis, plexus ductus deferentis, a. testikularis, plexus testikularis, plexus pampiniformis, a. cremasterica, n. genitofemoralis'in ramus genitalis'i ve lenf damarları bulunur. Yapısal olarak sol testis sağ testise göre biraz daha aşağıda yer alır. Scrotumun iç yüzü septum skroti (septum testis) ile ikiye ayrılır ve testisler bu boşluklarda bulunurlar.^{23,24,32,33,34}

Her bir testis'in facies medialis ve facies lateralis olarak iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olarak iki kenarı, ekstremitas superior ve ekstremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır. Üst ucu ve arka

kenarı dışında kalan alanlar serbesttir. Margo anterior, peritoneum viscerale'nin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo posterior'un medial bölümünde corpus epididymis oturur. Margo posterior'un orta kısmında testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur. Extramitas superior üst uç olup, buraya caput epididymis yerleşmiştir. Extramitas inferior testis'in alt ucu olup, cauda epididymis ile örtülüdür.^{35,36}

Testisler embriyolojik gelişimde tıpkı ovaryumlar gibi karın boşluğu arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Doğumdan hemen önce canalis inguinalis'ten geçerek scrotuma inerler. Testisler bu iniş sırasında karın boşluğunda kendilerini saran periton kesesini de (prosesus vaginalis) beraberinde taşırlar. Doğumdan sonra processus vaginalis periton boşluğu ile ilişkisini keser ve tunica vaginalis adını alır. Testisler tunica vaginalisinde içinde bulunduğu dıştan içe doğru üç tabaka ile çevrelenmiştir. Bunlar; tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculoza'dır.^{32,33,34,35,36}

Tunica vaginalis, scrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (epiorchium) ve testis'i saran lamina visseralis (epiorchium) olmak üzere iki katmandan oluşur. Lamina parietalis'in iç yüzü düzdür ve mezotel ile kaplıdır, scrotum'un iç yüzünü örter. Lamina visseralis testis'in epididymise ve funiculus spermaticus'a tutunduğu yer dışında kalan kısımları örter ve bu iki oluşumu birbirine bağlar. Tunica vaginalis'in bu iki oluşumu arasında cavum serosum scroti adı verilen içi sıvı dolu bir boşluk bulunur. Bu alan testislerin scrotum içerisinde kısmen hareketli olmasını sağlar.

Tunica albuginea, lamina visseralis'in hemen altında bulunana testis dokusunu dıştan saran, mavimsi-beyaz renkli, düzenli sıkı bağ dokusu yapısındaki en belirgin katmandır. Elastikiyeti az olan bu tabaka, kollajen liflerden zengin sert bir tabakadır. Tunica albuginea, testis'in arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis'i oluşturur. Mediastinum testis, testis'in damar ve sinirlerinin giriş çıkış yaptığı bölgedir.^{20,35,36}

Mediastinum testisten çıkan ve testis'in içerisine doğru uzanan fibröz uzantılar testisi piramidal şekilli lobili testis denilen 250-300 lopçuğa böler. Bu fibröz uzantılara septuma testis denir. Her bir lobuli testis yapısı içerisinde gevşek bağ dokusu ile sarılı tubuli seminiferi kontorti (Tubulus seminifer convolutus) adı verilen 3-4 adet kanalcık bulunur. Lobili testislerin taban kısımları periferde, tepe kısımları ise mediastinum testis'e yönelmiştir. Tubuli seminiferi kontortileri saran bağ dokusu içerisinde bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri bulunur.³²

Tubuli seminiferi kontortilerin mediastinum testise bakan kısımlarında lümen daralır, kanallar düzleşir, kıvrımlarını yitirir, düz tübüller şeklinde birbirleri ile birleşerek tubuli seminiferi rekti denilen kısa ve düz kanalları oluştururlar. Tubulus seminifer rektus'lar mediastinum testise uzanır, burada birbirleri ile anastomoz yaparak rete testis (Haller ağı) adı verilen kanalcıklara açılırlar. Birbirleri ile anastomoz yapmış rete testis kanalları kalınlaşmış tunica albuginea'nın oluşturduğu mediastinum testis'in üst bölümünde yer alır. Rete testis kanalları sayıları 12-15 arasında değişen ductulus efferentes adı verilen küçük kanalcıklara dönüşür. Duktuli efferentesler, tunica albuginea'yı delerek, epididimis'in caput epididimis parçasına açılırlar. Caput epididimis'e ductulus

efferentesler genişler, daha kıvrımlı bir hal alır ve konik yapıdaki lobülleri oluştururlar. Her bir lobülden gelen duktus tek bir epididim duktusuna (ductus epididymis) drene olur. Bu kanal, kuyruğa doğru ilerledikçe çapı ve kalınlığı artan ductus deferens olarak devam eder.

Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın alt kısmında bulunan lobulus testisleri saran damardan zengin ve gevşek bağ dokusu karakterinde en iç katmandır.^{32,33,34,37}

2.2.1. Testis'in Damarları , Lenf Dolaşımı ve Sinirleri

Testislerin damarları a.testicularis ve v. testicularis'tir. Testisler; karın aortası olan aorta abdominalis'ten ayrılan a. testikularis'lerce kanlandırılır. Bu arter ilk gelişme yeri olan bel bölgesinde, aorta abdominalis'ten çıkar ve aşağıya testise uzanır. Arterler, testis'e geldikten sonra septalar aracılığıyla interstisyuma ulaşır. A. testikularis, funiculus spermaticus ile birlikte testis'in arka kenarından (margo posterior) organ içerisine girerek mediastinum testis'te birçok dala ayrılarak testisi kanlandırır.

Testislerin venlerinden sağ v. testicularis v. cava inferior'a; sol v. testikularis sol v. renalis'e açılır.³⁸

Testis'in lenf damarları, yüzeysel ve derin olarak iki grupta toplanır. Yüzeysel lenf damarları tunica vaginalis'in yüzeyinde, derin lenf

damarları ise testis ve epididimis'in içinde seyreder ve funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler.

Testislerin sinirlendirilmesi otonom sinirlerle sağlanır. Testis'in otonom sinirleri, a. testikularis'in çevresindeki plexus testikularis'ten gelir. plexus testikularis; 10. kafa çifti n. vagus'tan gelen parasempatik lifleri, medulla spinalis'in T 10-11. segmentlerinden gelen sempatik ve visseral afferent lifleri içerir.^{20,21,23,34,35,36,37}

2.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme organları (organa genitalia masculina interna); scrotum içinde yerleşik çift testis, epididymis, funiculus spermaticus, ductus deferens, eklenti bezleri (gl. Vesiculosa, prostata, gl. bulbourethralis) ile penisten oluşur.^{39,40}

Testisler, ekzokrin ve endokrin işlevi olan birleşik tübüler bezlerdir. Puberteyle birlikte erkek üreme hücresi olan spermiyumların üretilmesi testislerin ekzokrin işlevi iken, erkek seks hormonu olan testosteron'un sentezi, depolanması ve salınması testisin endokrin işlevidir.⁴¹

Testisler scrotum içerisinde dıştan içe üç katmandan oluşan bir kapsül ile sarılıdır. Bu katmanlar:

1. Tunica vaginalis testis: Mezotelyal hücrelerin oluşturduğu periton kökenli, çift yapraklı seröz bir zardır. Testisin ön kenarı ve yan yüzlerini örten içte visseral tabaka (lamina visceralis) ile scrotum üzerine uzanan dışta paryetal tabakası (lamina parietalis) bulunmaktadır. Visseral tabaka tunica albuginea'ya yapışıkır. Parietal tabaka scrotumun iç yüzüne dayanır. Tunica vaginalis'in dış ve iç yaprağı arasında periton boşluğuna bağlı seröz bir boşluk bulunur.

2. Tunica albuginea: En belirgin tabakadır. Tunica vaginalis'in visseral yaprağını içten örter. Düzensiz yerleşmiş kollajen demetler içeren, yoğun fibroelastik bağ dokusu arasında çok az sayıda düz kas fibrilleri bulunduran kalın bir katmandır.

3. Tunica vasculoza: Tunica albuginea 'nın iç yüzünde yer alan, kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusu yapısındaki en iç tabakadır.^{39,40,41,42}

Tunica albuginea, testisin arka yüzünde organın parenkimasına doğru üçgen biçiminde kalınlaşarak mediastinum testis'i oluşturur. Kan ve lenf damarları, mediastinum testis'den girerler. Boşaltım kanalları ise aynı yerden çıkar. Buradan testisin içerisine doğru uzanan fibröz bağ doku bölmeleri, testisi 250-300 adet piramidal biçimli lobüllere (lobuli testis) ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Tübülleri saran gevşek bağ dokusunda; bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreler bulunur.⁴³

2.3.1. Seminifer Tübüller (Tubulus Seminifer Convolutus)

Seminifer tübüller testisin parenkimasını (parenchyma testis) yaparlar. Spermatogenezisin olaylandığı, oldukça kıvrımlı yapılar olup yoğun kapiller ağ ile çevrelenmiştir. Tübüllerin her biri yaklaşık 150-250 µm çapında, 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki seminifer tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir.

Seminifer tübüller kör bir ucla başlarlar. Lobüllerin mediastinum testis'e bakan bölgesinde birbirlerine doğru yaklaşarak kısa, dar, düz seyirli kanalcıklar olan tubuli rekti (tubulus seminifer rectus) olarak isimlendirilen kısa segmentler halinde devam ederler. Testis içi boşaltım kanallarından biri olan tubuli rekti; seminifer tübülleri, mediastinum içinde bulunan ve anastomozlaşmış bir kanal sistemi olan rete testis'e bağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 ductulus efferentes ile epididimis'in baş kısmına bağlanmıştır.^{40,41,42,43}

Seminifer tübüller, fibröz bir bağ dokusu, bazal membran ve çok katlı seminifer epitelden oluşur.

Seminifer tübüller dıştan fibroblast katmanından oluşan, tunica propria adı verilen fibröz bağ doku katmanı ile sarılmıştır. Tunica propria' da fibroblast hücre katmanları arasında Tip I kollajen lifler bulunur. Tunica propria ile seminifer tübül epiteli birbirinden, oldukça iyi gelişmiş bir bazal lamina (membrana bazalis) ile ayrılır. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas hücre özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içeren katmandır (stratum myoideum). Miyoid hücreler

(myofibroblastus), hareketsiz spermiyumları rete testis'e ilerleten ritmik kasılma erkinden sorumludurlar.^{26,27,31}

Seminifer tübül duvarı, çok katlı epitel ile döşelidir ve başlıca iki tip hücre içerirler:

1. Sertoli ya da destek hücreleri (Epitheliocytus sustenans)
2. Spermatogenik hücreler ya da spermatogenik seri hücreleri (Cellulae spermatogenicae)

2.3.2. Sertoli Hücreleri (Epitheliocytus Sustenans)

Sertoli hücreleri ilk kez 1865 yılında, İtalyan fizyolog ve histolog Enrico Sertoli tarafından tanımlanmış, seminifer epitelin germinal olmayan tek elemanıdır. Bu hücreler bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan, tabanları bazal membrana oturan, apikal yüzleri lümene bakan, uzun, piramidal şekilli, spermatogenik serideki hücreleri saran, apikal ve yan yüz farklaşmaları içeren destekleyici hücrelerdir. Puberteye kadar bu hücreler seminifer epitelin baskın hücre tipiyken, puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur ve bu dönemden sonra postmitotiktir.^{39,40,42}

Tübüller arası boşluk ve tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar. Kötü koşullara ve yaralanmalara karşı spermatogenik hücrelerden daha dayanıklıdırlar. Sertoli hücrelerinin üst ve

yan hücre membranlarının sınırları düzensizdir. Gelişmekte olan spermatogenik hücreler bu düzensiz aralıklardan lümene ulaşırlar.

Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle Sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez ve soluk renkli görülürler. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda bu hücrelerin çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum (SER) sisternaları, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternaları, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda yuvarlak ve uzun mitokondrionlar, primer ve sekonder lizozomlar, çok sayıda mikrotübül, lipid damlacıkları, kesecikler, glikojen granülleri ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) içerdiği gösterilmiştir. Sertoli hücrelerinin oldukça iri ve üçgen biçiminde uzamış ve bazale yerleşik çekirdekleri vardır. Çekirdekte heterokromatin azdır. Çekirdekçik belirgin ve merkeze yerleşiktir. Oldukça aktif olan bu hücrelerin çekirdekleri, kromatinden yoksun olması nedeniyle açık renkli görülür. Ayrıca sitoplazmada protein yapıda oldukları bilinen Charcot-Böttcher kristalloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri bulunmaktadır. Sitoplazmada çok miktarda gözlenen elektron yoğun cisimciklerin steroid sentezi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.^{43,44}

Yan yana bulunan Sertoli hücrelerinin bazal yan yüzlerinde (bazolateral) birbirleri ile sıkı bağlantılar (zonula okludens) oluştururlar. Böylelikle seminifer tübül lümenini çepeçevre saran kesintisiz bir hücre tabakası oluşturulur. Aynı zamanda sertoli hücreleri arasındaki bu sıkı bağlantı birimleri, seminifer epiteli bazal kompartıman ve adluminal kompartıman olarak iki bölmeye ayırır. Sıkı bağlantının alt kısmında yer alan bazal kompartıman dardır ve lümene yakın olan adluminal kompartımanı çevreler. Bazal kompartıman, kan damarlarının lümenini, interstisyel boşlukları ve spermatogoniumlar tarafından doldurulan

bölgeleri kapsar. Bazal kompartıman içinde spermatogoniumlar, genç primer spermatositler, adluminal kompartıman içinde ise olgun primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler bulunmaktadır. Bu iki bölme spermatogenezis için bir mikroçevre sağlar.^{39,40,41,42,43}

Spermatogenezis sırasında spermatogenik hücreler bu bağlantılardan geçerek bazal bölümden adluminal bölüme çıkarlar. Sertoli hücrelerinin yan yüzlerinde ayrıca oluklu bağlantılar da bulunur, bunlar da iyonik ve kimyasal alış verişi sağlarlar.^{44,45,46}

Sertoli hücrelerinin bazolateral bölgede oluşturdukları sıkı bağlantılar kan testis bariyerini oluşturur ve lümen altındaki bölgeyi bağ dokusundan gelen etkilere karşı korur. Kan-Testis Bariyeri, bağışıklık sistemi ile gelişen spermiyumlar arasındaki her türlü etkileşimi ortadan kaldırarak antikor dahil proteinlerin gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşmasını engeller ve spermatogenik hücreleri otoimmün tepkilere karşı korur.^{47,48}

Sertoli hücrelerinin bir çok önemli işlevi bulunmaktadır. Bunlar;

1. Gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesini sağlamak,
2. Spermiyogenezisin sonunda spermatidler tarafından atılan fazla hücre kısımlarını lizozomlar aracılığı ile fagosit etmek ve sindirmek,
3. Olgun spermiyumların aktin-aracılı kasılmalarla, spermiyasyon denilen süreçte, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,

4. Seminifer tübül lümenine genital kanallar yönünde akan ve spermilerin taşınması için kullanılan protein ve iyondan zengin sıvı salgılamak,

5. Folikülü Uyarıcı Hormon (FSH) ve testosteron denetimi altında, seminifer tübül içinde spermatogenezis için gerekli olan testosteronun yo unla tırılmasını sağlayan Androjen-bağlayıcı protein salgılamak (ABP),

6. Hipofiz bezi  n lobundan FSH sentezini ve salınmasını baskılayan inhibin adı verilen bir peptid salgılamak,

7. Embriyonik ge i me sırasında erkek fet sta M lkler (para mezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan glikoprotein yapıda Anti-Müllerian hormonu (Müler kanalını baskılayıcı hormon) sentezlemek,

8. Kan –testis bariyeri ile spermatosit/spermatidlerin otoimmün yanıtta korunmasını sağlamak,

9. Serum transferrin'den demiri alarak olgunlaşma sürecindeki gametlere ileten testiküler transferrin'in sentezini ve salgılanmasını sağlamak. ^{26,41,42,}

2.3.3. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreleri, epithelium spermatogenicum hücreleridir. Seminifer tübül duvarını d  eyen, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduran 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş, düzenli olarak çoğalarak olgun spermiumlara farklanan hücrelerdir. Seminifer epitelin bazal kompartımanında yer alan ilkel germ h creti spermatogoniumdan, olgun üreme h creti olan spermium oluşuncaya değin geçen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve farklanma evreleri 'spermatogenezis' olarak adlandırılır. Spermatogenezisin tüm evreleri spermatogenik hücre katmanlarında geçer. Hücreler olgunla tık a bazaldan lümene doğru yer

değiştirirler. Lümeneye yaklaştıkça olgunlaşırlar. Bazaldan lümeneye doğru hücre tipleri spermatogoniumlar, spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar olarak sıralanır.^{41,42}

2.3.3.1. Spermatogonyum (Spermatogonium)

Spermatogoniumlar, bazal bölümde bulunur. Kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar.³¹

Diploid kromozoma sahip 12 µm çapında, serideki diğer hücrelere göre daha küçük, soluk renkte boyanan çekirdeğe sahip hücrelerdir. Puberteye kadar seminifer tübül duvarında spermatogenetik hücre olarak sadece spermatogoniumlar bulunur. Pubertenin başlaması ile hormonal etki sonucu bu hücreler mitozla çoğalarak diğer tip hücreleri oluşturur. Yapısal olarak üç tip spermatogonium gözlenir: bunlar; Spermatogonium A, Spermatogonium B ve spermatonium intermediumdur.^{31,41,42}

Koyu A tipi spermatogoniumlar, seminifer epitelin kök hücreleridir. Radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidir. Yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirerek, koyu A tipi spermatogoniumları ya da açık A tipi spermatogoniumları oluştururlar.

Açık A tipi spermatogoniumlar, ökromatik çekirdeğe sahiptirler ve çekirdekçikler çok belirgindir. Hormonal etkiler ile mitozla

bölünürler ve B tipi spermatogoniumları oluştururlar. Bu hücreler B tipine dönüşmeden önce sırasıyla A1, A2, A3, A4 ve daha sonra ara spermatogoniumları yaparlar.

B tipi spermatogoniumlar, çekirdekleri yuvarlak şekilli ve koyu renkte boyanan hücrelerdir. Çekirdek çevresinde ve çekirdek zarı boyunca yoğunlaşmış çekirdek kromatini içerirler. Mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatositleri oluştururlar.^{41,42,49,50}

2.3.3.2. Spermatosit (Spermatocytus)

B tipi spermatogoniumların mitoz bölünmeleri sonucu primer spermatositler (spermatocytus primarius) oluşur. Bu hücreler spermatogenik serideki en büyük hücrelerdir. 46 kromozomları (2n) vardır. Oluşmalarının hemen ardından bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürer. Bu nedenle görülen spermatositlerin çoğu bu aşamadır.

Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatosit (spermatocytus secundarius) olarak adlandırılan yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin görülmesi zordur, çünkü bu hücreler interfazda kısa süre kalan hızla ikinci mayom bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. İkinci mayom bölünmenin ardından her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploide kromozoma sahip hücreler olan spermatidler (spermatidium) oluşur.

Sonuçta, primer spermatositler art arda iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayısını yarıya indirirler ve haploid sayıda spermatidler oluşur. Tüm bu olaylar (mayoz bölünme) kan-testis bariyerinin içinde adluminal kompartımanda gerçekleşir.⁵⁰

2.3.3.3. Spermatid (Spermatidium)

Spermatidler, sekonder spermatositlerin ikinci mayom bölünme geçirmeleri sonrasında oluşur. Bu hücreler 7-8 µm boyunda, küçük ve yuvarlaktır. Çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşır. Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma girintileri arasına gömülü olarak bulunurlar. Seminifer tübüllerde adluminal bölgede yerleşmişlerdir. Çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum, mitokondrionlar, iyi gelmiş Golgi kompleksi, serbest ribozomlar ve bir çift sentriyol içerirler.⁴¹

Spermatidler bölünmezler. Ancak şekil değişikliğine uğrayarak olgun germ hücresi olan spermiyuma dönüşürler. Spermatidin farklılaşarak şekil değiştirmesine 'spermiyogenezis' denir. Spermiyogenezis aşamalarında, akrozom (acromesoma) oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, kuyruk gelişir ve sitoplazma atılır. Spermiyogenezis 4 aşamadan oluşur. Bunlar; Golgi, şapka (kep), akrozom ve olgunlaşma evresi.

Golgi evresi: Spermatidlerin granüllü endoplazmik retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler, Golgi kompleksinde glikoproteinden zengin ve PAS (+) boyanan, küçük proakrozomal granüller oluşur. Bu granüller birleşerek çekirdek zarına yakın yerleşen akrozomal

vezikül içinde yoğunlaşırlar. Akrozomal kese spermiyumun ön kutbunu belirler; bunun karşı kutbuna da sentriyoller yerleşir ve spermiyumun kuyruğunun şekillenmesini başlatır.

Şapka evresi: Akrozomal vezikül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılarak çekirdek zarına tutunan bir şapka oluşturur. Akrozomal şapkanın altında yer alan çekirdek kılıfı porlarını yitirerek kalınlaşır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır.

Akrozomal evre: Çekirdeğin ön yarısına değin yayılan akrozomal vezikül ve akrozomal granül artık akrozom adını alır. Akrozom; hiyalurinidaz, nöraminidaz, asit fosfataz, proteaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu nedenle özelleşmiş lizozom işlevine sahiptir. Yine bu evrede, çekirdek uzar ve yoğunlaşır. Çekirdeğin uzaması ve yoğunlaşması, mikrotübüllerden oluşan silindir benzeri bir yapıyla kolaylaştırılır. Bu yapıya manşet denilir. Sentriyollerden hücre yüzeyine dik duranı, spermiyumun kuyruğunu yapacak bir flagellum oluşturur. Sitoplazma flagellum çevresinde hareket edip onu sarar. Mitokondriyonlar kuyruğun başlangıç bölümü çevresinde spiral olarak yerleşip spermiyumun gövdesini yaparlar. Mitokondriyonlar hareket için gerekli olan enerjiyi sağlarlar.

Olgunlaşma evresi: Oluşan olgun spermiyumlar sertoli hücrelerinden ayrılır ve seminifer tübül lümenine salınır. Spermiyumların sitoplazmasından oluşan artık cisimler Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Sitoplazma ve sitoplazmik cisimlerin atılması ile hücreler arasındaki sitoplazmik köprülerde kaybolur. Lümeneye salınan olgun spermiyumların hareket ve dölleme yetenekleri henüz yoktur.⁴¹

2.3.3.4. Spermiyum (Spermium)

Olgun germ hücreleridir. İnsanlarda spermatagoniumlardan spermiyum oluşma süresi yaklaşık 64 gündür. Ortalama 60-65 µm uzunluğunda olan olgun spermiyum, baş ve kuyruk olarak iki ana kısımdan oluşmaktadır.⁴²

Baş (Caput): Akrozomla sarılmış çekirdekten (nucleus) oluşan, yaklaşık 4.5-5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındaki kısımdır. Çekirdek yassılaştırmış biçimde ve yoğun yapıdadır. Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter. Akrozom, lizozomlarda da bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluridaz, akrosin, nöraminidazlar) içerir. Akrozomal enzimler oositi saran korona radyata ve zona pellusida'ya spermiyum girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır, korona radyata hücrelerini ayırır ve zona pellusida'yı eritir.

Kuyruk (Flagellum): Sil yapısındadır. Başlangıç, orta, esas ve son parçalardan oluşur.

Başlangıç (Pars conjugens) : kuyruk kısmının başa bitişik kısmıdır. Kısa ve kalındır.

Orta parça (Pars intermedium); yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Boyun ile esas parça arasında uzanır. 9+2 mikrotübül yapısında flagellum kapsar. Çevrede spiral mitokondriyon halkası vardır.

Bu parçada flagellum çevresinde ayrıca kuyruk sonuna doğru incelerek kaybolan dokuz tek kalın fibrin daha vardır.

Esas parça (Pars principalis): yaklaşık 45 µm uzunluğunda, kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonum ve fibröz bir kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf, spermiyumun öne hareketi sırasında mikrotübüller kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur.

Son parça (Pars terminalis): yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanması nedeniyle sadece aksonum içeren, kuyruğun en kısa parçasıdır.^{41,42}

2.3.4. İnterstisyel Doku ve Leydig hücreleri (İnterstitium testis ve Endocrinocytus interstitialis)

Testisin seminifer tübülleri arasında yer alan interstisyel bağ dokusu, kan damarlarından, lenfatiklerden, sinirlerden zengin gevşek bağ dokusudur. Testisin kılcal damarları pencere tiptedir ve kan proteinleri gibi büyük moleküllerin geçişine izin verir. Bu dokuda ince kollajen ve retiküler lifler ile fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Bu hücrelere ek olarak puberte döneminde belirgin hale gelen Leydig hücreleri veya interstisyel hücreler olarak adlandırılan hücreler görülmeye başlar. Testiste bu bölüm stromayı oluşturur.

Leydig hücreleri veya interstisyel hücreler, kan damarları ve lenfatik kanal veya sinüzoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir. Leydig hücreleri, 15-20 µm çapında, poligonal şekilli ve merkezi nükleusa sahip, sitoplazması eozinofilik boyanan tipik olarak lipid damlacıkları içeren hücrelerdir. Çekirdek ökromatiktir ve bir-iki çekirdekçik içerir. Steroid salgılayan hücrelerde olduğu gibi Leydig hücreleri de iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozomlar, çok sayıda küçük lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriyonlar, yaş ilerledikçe artan lipofuskin pigment granülleri ile kristalize yapıdaki proteinler olan Reinke kristali ve öncüllerine sahiptir.^{50,51}

Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu hormon olan testosteronun üretiminden sorumludur. Bu hücreler salgıladıkları testosteron hormonu (toplam testosteronun %95'ini üretir, geri kalan %5 böbrek üstü bezinin korteksinde üretilir) ile spermatogenezisi sürdürür. Testosteron sentezi mitokondriyonlarda ve granülsüz endoplazmik retikulumlarda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. Üretilen testosteron doğrudan kana verilir.⁵¹

İnsanda gebelik sırasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, maternal kandan fötüsa geçer ve androjenik hormonları üreten fötal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Bu hormonlar, embriyonun gelişim sırasında erkek genital organların farklılaşmasını sağlar. Fötal Leydig hücreleri gebeliğin 8 ile 18. haftaları arasında oldukça aktiftirler. Daha sonra gerilerler. Hücreler puberte öncesi döneme değin inaktirler. Pubertede ise testosteron salgısı, sperm üretimi, aksesuar bezlerin salgısının başlatılması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Erişkinde ise testosteron salgısı, spermatogenez, sekonder seks karakterlerinin devamı, genital boşaltım kanalları ve aksesuar bezler

için gereklidir. ^{41,42,51} Leydig hücrelerin erk ve işlevini hormonal uyarımlara bağlıdır. LH ve prolaktin Leydig hücrelerinin işlevini düzenler. Leydig hücreleri LH ile uyarılmasının ardından testosteron üretir. Prolaktin ise LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenler. ^{26,41,51}

2.4. Testis Fizyolojisi

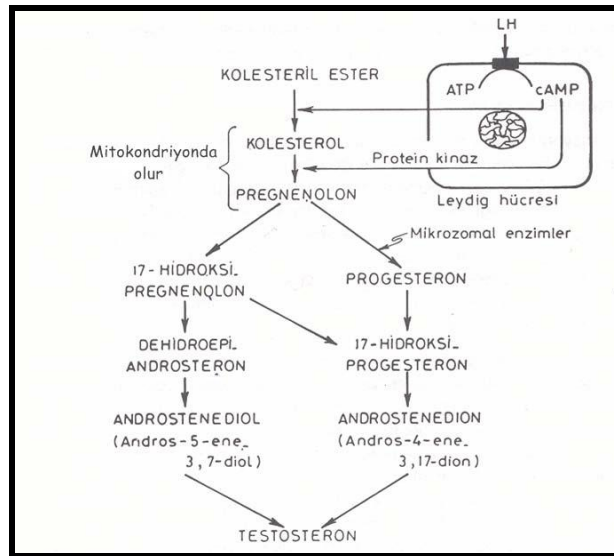
Testis dokusu ekzokrin ve endokrin işlevlere sahiptir. Ekzokrin işlevi seminifer tübüllerde spermiyogenezis ile spermiyumları üretmektir. Endokrin işlevi ise androjenler olarak tanımlanan erkeklik hormonlarını salgılamaktadır. ⁵²

Testisin endokrin işlevi hipotalamustaki nöroendokrin hücreleri salınan Gonadotropin Serbestleştirici Hormon'un (GnRH) etkisi ile hipofiz ön lobundan (adeno hypophysis, lobus anterior) salınan gonadotropinler (FSH, LH) tarafından düzenlenir. Bu hormonlar testisin ekzokrin işlevini denetler. ⁵²

Hipofiz ön lobundan salgılanan LH'nin etkisi ile Leydig hücrelerinden testosteron yapımı uyarılır. Testosteron sentezi spermatazoaların üretimi ve olgunlaşması için gereklidir. Leydig hücrelerinden salınan testosteron kan damarlarına ve peritübüler dokuya verilir. Kan damarları ile yardımcı üreme bezlerine ve diğer pek çok organa etki ederken, peritübüler dokuya ulaşan testosteron FSH'nin etkisi ile Sertoli hücrelerinden salınan androjen bağlayıcı proteine bağlanarak seminifer tübül lümenine ulaşır. Tübül lümeninde biriken testosteron, spermatogenetik hücrelerin çevresinde androjen seviyelerini yükseltir ve

spermatogenezis için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar.⁵² Sertoli hücrelerinden FSH'nin etkisi ile androjen bağlayıcı protein dışında FSH'nin salınımını inhibe eden 'inhibin' ve aktive eden 'aktivin' gibi salgısal proteinlerde üretilir. Ayrıca embriyonal gelişim sırasında Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan Müller kanallarını baskılayıcı madde'de (Mullerian inhibiting substance; MIS) salgılanır.⁵¹

Testisin esas hormonu bir steroid olan testosterondur. Testosteron testisin Leydig hücrelerinde kolesterolden sentezlenir. Ayrıca progesteron yolu ile 17-hidroksiprogesteron'dan da sentezlenir, fakat bu yol ile sentez insanlarda azdır. Leydig hücrelerinin LH tarafından uyarması cAMP yoluyla olur. cAMP kolesterol esterden kolesterol oluşumunu artırır, protein kinazın aktive edilmesi ile de kolesterol pregnenolon'a dönüştürülür. Kolesterolden pregnenolon sentezi mitokondriyonda olaylanır; pregnenolon mitokondriyondan ayrılır ve mikrozomal enzimler aracılığı ile progesterona çevrilir. Leydig hücrelerinin endoplazmik retikulumunda progesteron önce androstenedion'a, androstenedion ise daha sonra testosteron'a dönüştürülür. (Şekil 1)



Şekil 1. Leydig hücrelerinden testosteron salınımı⁵¹

Testosteron hormonu spermatogenezis için gerekli olmanın yanı sıra embriyonal ve fetal yaşam sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü içinde gereklidir. Fetal gelişim döneminde ve ergenlikten sonra (yaklaşık 10-13 yaşından itibaren) testosteron üretimi gerçekleşir. Gebelikte plasentadan üretilen gonadotropik hormon, fötüse geçer ve fetal testis Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretimini uyarır. Fetal dönemde üretilen bu hormon erkek üreme organlarının embriyonik farklılaşması için gereklidir.⁵³

Embriyonal Leydig hücreleri gebeliğin dördüncü ayına kadar tamamen farklılaşmamış olarak kalırlar, daha sonra testosteron sentezinde azalma gerçekleşir ve puberteye kadar salınımı durur. Pubertede testosteron salınımının başlaması ile penis büyür, yardımcı genital bezler büyür ve salgı salgılamaya başlarlar; ses kalınlaşır, sakal, bıyık çıkar, pubis bölgesi kıllanır ve genel olarak vücut kıllanması artar, karşı cinse ilgi duyma artar; vücut biçiminde erkeğe has geniş omuz, dar kalça, kuvvetli kas gelişmesi gibi ikincil cinsiyet özelliklerinde gelişme gözlenir. Yağ bezi salgısında ve protein sentezinde artış gözlenir; buna bağlı olarak büyüme hızında ve kas gelişiminde artış gerçekleşir. Testosteron kemik büyümesini artırırken, epifiz plağının kapanması ile boy uzamasını sonlandırır. Normal eritrosit kütlelerinin sürdürülmesine yardımcı olarak eritropoietin sentezini ve eritroid öncüllerinin olgunlaşmasını ve böbrekte sodyum geri emilimini uyarır, karşı cinse ilginin ve libidonun başlamasını sağlar.

Dolaşım kanındaki aşırı testosteron seviyesi negatif geri bildirim etkisi göstererek ön hipofizden LH salınımını engeller.^{41,42,53,54}

2.5. Kemoterapi

Kanser, sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması bakımından günümüzde önemi giderek artan sağlık ve yaşam sorunlarından biri haline gelmiştir. İstatistiklere göre kanser, özellikle gelişmekte olan ülkelerde kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüme yol açan nedenler arasında ikinci sırada yer almaktadır. ^{1,2,3,4}

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, kontrolsüz ve anormal bir şekilde çoğalması ile invaziv özellik kazanarak uzak organlara kan veya lenf yolu ile yayılması (metastaz) sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır.¹

Apoptozise gitmesi gereken DNA hasarı olmuş ya da yanlış, eksik veya fazla transkript olmuş hücreler anormal şekil ve hızda büyümeye ve çoğalmaya başlarlar, salgıladıkları proteolitik ve fagositik enzimlerle dokuların sağlıklı hücrelerini eritip, daha fazla çoğalmak için kendilerine yer açarlar. Hücreler önce bulundukları yerde sınırsız bir çoğalma yeteneği ardından da normal hücreler kadar güçlü bağları olmaması nedeniyle vücudun başka bölgelerine yayılarak uzak yerlerde çoğalma yeteneği (metastaz) geliştirirler. Yayılan bu hücreler bulundukları yerdeki doku ve hücreleri işgal ederek, işlevlerini önlerler böylece tümör adı verilen kitle oluşumuna yol açarlar. Sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının, normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenememesi sonucu oluşan düzen bozukluğu ve anormal hücre artışı kanserin oluşmasına neden olur.

Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır. ^{1,41,42,55,56,57,58,59}

Hastaya kanser tanısı konulduktan ve hastalığın yaygınlığı belirlendikten sonra, hastalığı tamamen iyileştirmek amacıyla tümörün histolojik yapısına, lokalizasyonuna, büyüklüğüne, hastalığın aşamasına, metastaz olup olmamasına, hastanın fizyolojik ve psikolojik durumuna ve gereksinimlerine göre yaşam süresini uzatmak veya yaşam kalitesini artırmaya yönelik uygun tedavi yöntemleri seçilir. ⁵⁶

Kanser tedavisinde kullanılan belli başlı tedavi yöntemleri şunlardır; cerrahi (bölgesel), radyoterapi (RT), kemoterapi ve yeni tedavi yöntemleri (hormon tedavisi, immünoterapi - biyolojik tedavi , anjiogenez inhibitörleri , sinyal ileti sistemi inhibitörleri , gen tedavisi, kemik iliği transplantasyonu) 'dır. Bu yöntemlerden birisi ya da birkaçı birlikte uygulanarak kanser tedavisi sağlanmaktadır. ^{59,60}

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapinin ana ilkesi; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden özellikle kontrolsüz çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya yok etmek amacı ile doğal veya sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar veya hormonlarla yapılan tedavilerin tümünü içine alan bir tedavi şeklidir. ⁶⁰

Kemoterapinin başlıca amacı; hastalığı tedavi etmek, kanserli hücrenin çoğalmasını ve bölünmesini engellemek, hastalığın yayılmasını önleyerek kanserin kontrol altında tutulmasını sağlamak, hastalığın büyümesini yavaşlatmak, başka bir yere yayılmış olma ihtimali olan kanser hücrelerini yok etmek, hastalığa bağlı rahatsızlıkları azaltmak, ortalama yaşam süresini uzatmak, yaşamı tehdit eden spesifik komplikasyon riskini azaltmak ve böylece yaşam kalitesini yükseltmektir. ¹

1900' lü yıllarda Alman bakteriyoloji bilgini Paul Ehrlich (1854-1915), bakterilerin vücut dokularına yerleşerek birçok hastalığa (kolera, tifo, verem, tetanos, kangren) sebep olduğu bilgisi ile yola çıkarak hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde bakterilere karşı toksik olabilecek kimyasal maddelerden nasıl yararlanılabileceğini araştırmıştır. Deneyleriyle bu bilgileri daha da zenginleştirerek, bazı boyaların bakterilerde yoğunlaşabileceğini keşfetmesi ile bakteri ve toksinlerin yol açtığı olumsuz etkilere karşı çeşitli kimyasal maddeler kullanılarak hastalıkları tedavi edilebileceği düşüncesi ile ilk kez '*kemoterapi*' terimini ortaya atmıştır. Bunun üzerine bir çok araştırmacı transplante tümörleri taşıyan fare modelleri kullanarak potansiyel kanser kemoterapötiklerini test edebilmişler ve günümüze kadar yaklaşık 40 yararlı anti-kanser ilacı keşfedilmiştir.

Kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçlar, kanser hücresi üzerindeki etkilerine, hastalığın evresine, hastanın genel durumuna göre tek başına veya birkaç ilacın birlikte verilmesi şeklinde uygulanabilirler.

2.5.1. Kemoterapötik Ajanlar

Altretamin heksametilamin, amsakrin-AMSA Akridinil anisidid, Anastrozol, Arsenik trioksit, Asparaginaz, Azasitidin, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), Beksaroten, Bevasizumab, Bleomisin, Bikalutamid, Buserelin, Busulfan, Dakarbazin, Daktinomisin, Daunorubisin, Doksorubisin (Adriamycin), Dosetaksel, Eksemestasan, Epirubisin, Ekstramustin, Etoposid, Floksüridin, Fludarabin, Fluorourasil, Flutamid, Fulvestrant, Gefitinib, Gemsitabin, Gemtuzumab, Goserelin asetat, Heksametilmelamin, Hidroksiüre, İdarubisin, İfosfamid, İmatinib mesilat, İnterferon-2a, İnterlökin-2, İrinotekan-CPT-11, Kapesitabin, Karboplatin, Kladribin, Klorambusil, Letrozol, Löprolid asetat, Medroksiprogesteron asetat, Megestrol asetat, Mekloretamin, Melfalan, Merkaptopürin, Metotreksat, Mitomisin, Mitotan, Mitoksantron, Oksaliplatin, Oktreotid, Paklitaksel, Pemetreksed, Plikamisin, Prokarbazin, Raltitreksed, Rituksimab, Setuksimab, Siklofosfamid, Sisplatin, Sitarabin, Streptozin, Talidomid, Tamoksifen, Temozolomid, Tioguanin, Tiotepa, Topotekan, Trastuzumab, Vinblastin, Vindesin, Vinkristin, Vinorelbin.^{59,60}

Kemoterapötik ajanlar kimyasal yapılarına ve hücredeki aktivitelerine göre; alkilleyiciler, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, alkaloidler, enzimler, kortikosteroidler (hormonlar ve hormon antagonistleri) olmak üzere etki mekanizmaları birbirinden tamamen farklı çeşitli kategorilere ayrılırlar.⁶⁰

Alkilleyici ajanlar: özellikle hızlı çoğalan hücrelere etki ederler. Yapısındaki alkil kökü ile makromoleküllerin nükleofilik kısımlarına geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar ve özellikle DNA zincirlerinde çapraz

bağlantıların kırılmasına neden olarak doğrudan DNA'yı etkilerler. Busulfan, Melphalan, Karmustin, Lomustin, Klorambusil, Karboplatin, Sisplatin, Dakarbazin, Siklofosfamid, Prokarbazin, İfosfamid, Nitrojen mustard alkileyici ajanlar arasında yer alır.

Anti-metabolitler; hücredeki normal metabolitler ile benzerlik gösterdiklerinden dolayı rahatlıkla hücre içine girirler burada metabolitlerin yerine geçerek aktiviteyi bloke eder, azaltır yada makromoleküllerin içine girerek, işlevi olmayan bir makromolekül yaratırlar. DNA sentezi gibi hücrenin metabolik süreçlerini bozarak hücre gelişimini bloke ederler. Bu gruptaki ilaçlar hücreyi S fazında etkilerler. Allopürinal, Fluorourasil, Metotreksat, 6-Merkaptopürin, Hidroksiürea, Floksüridin, Gemsitabin, Fludarabin, 6-Tioguanin, Pentostatin anti-metabolit ajanlar arasında yer alır .

Antibiyotikler; farklı yapıda bir grup olup, hücre siklusuna özgü olmayan bu ilaçlar hücrede DNA ve RNA replikasyonunu durdurur, dokularda uzun süre kaldıklarından DNA sentezi boyunca hücre ölümüne yol açarlar. Radyasyonla birlikte verildiklerinde toksisiteleri artar. Bleomisin, Aktinomisin, Daktinomisin, Adriyamisin, Doksorubisin, Epirubicine, Daunorubicin, Mitomycin-c, Mitoxantrone, İdarubisin antibiyotik ajanlar arasında yer alır.

Alkoloidler; hücreyi mitoz bölünme evresinde iplikçiklerin oluşmasına engel olarak hücre bölünmesini bloke eden ilaçlardır. Podofilotoksinler'den ve vinca alkoloidlerinden semisentetik olarak elde edilirler. Etoposid, Teniposid, Vinkristin, Vinblastin, Vinerabin, Paklitaksel, Doketaksel alkoloid ajanlar arasında yer alır.

Enzimler; protein sentezini ve hücre metabolitlerini inhibe ederler. L-asparaginase bu grupta yer alan ajanlardır.

Kortikosteroidler; pasif difüzyon ile hücre içine girer, glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak çekirdeğe geçer, orada DNA 'ya bağlanarak DNA'nın transkripsiyonunu engeller. Özellikle hormon bağımlı kanserlerin büyümesini, çoğalmasını önler, protein sentezini inhibe eder. Prednisone, Dexamethasone kortikosteroidler grubunda yer alan ajanlardır.^{56,60}

Kemoterapötik ilaçlar oluşturduğu etkiye göre iki gruba ayrılırlar;

Hücre döngüsüne bağımlı ilaçlar; S evresine dönük ilaçlar; antimetabolitler, M evresine dönük ilaçlar; alkaloidler ve G2 evresine dönük ilaçlar; antibiyotikler.

Hücre döngüsüne bağımsız ilaçlar; hormonlar, antibiyotikler ve alkileyici ajanlar.⁶⁰

Antikanser ajanların büyük çoğunluğu hücrenin en aktif olduğu dönemler olan G1, G2, S ve Mitoz evrelerinde etkilidir. Bunun yanı sıra hücre döngüsüne bağımlı olamayan ajanlarda bulunmaktadır. G0 evresindeki hücrelere etki eden bu ajanlar yavaş büyüyen tümörlere karşı da kısmen etkilidir.

Antitümöral etkisi olan ilaçların etki mekanizmalarını genel olarak özetleyecek olursak ; DNA sentezini durdurarak DNA sentezinde rol oynayan folik asit ve nükleotidleri baskırlar. Bu nedenle hücreler DNA ve RNA sentezlerini yapamazlar (Metotreksat, Fluorourasil, Hidroksiüre, Merkaptopürin). Hücre çekirdeklerindeki DNA'ya doğrudan hasar verirler böylece DNA'nın kendini kopyalaması gerçekleşemez (Siklofosamid, Sisplatin, Doksorubicin, Etoposid). Mitotik iplikçiklerin sentezini engelleyerek ya da yıkımına neden olarak hücre bölünmesi sırasında mitotik iplikçiklere hasar verirler ya da tübülün proteinlerinin yapısını bozarak eşleşen kromozomların iç iplikçikleri tarafından hücre kutuplarına çekilmesini önleyerek bölünmeyi durdurlar ve 2 yeni hücrenin oluşmasını engellerler (Vinblastin, Vincristin, Paclitaxel). Bazı enzimler protein sentezi için gerekli olan aminoasitleri yok ederler. (Asparjinaz) Bu etki mekanizmaları sayesinde kanserli hücrenin yok edilmesi sağlanmış olur. ²

Kanserli hücreler gelişmeye başladığı dönemlerde aktif halde bölünürler. Eğer tam bu evrede sitotoksik ajanlar uygulanırsa iyileşme şansı yüksektir; aksi takdirde tümör büyüklüğü arttıkça oksijen ve besin gereksinimini karşılayabilmek için kanser hücrelerinin bölünme hızı yavaşlar ve inaktif G0 fazına girer; çoğu kemoterapötik ajan, replikasyon ve proliferasyon dönemlerinde hücreler üzerine etkili olduğundan, G0 fazındaki kanser hücreleri kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerinden korunurlar ve malign aktivitelerini sürdürürler, bu durum kanser tedavisindeki başarısızlığı açıklamaktadır. Ek olarak tümör hücrelerinde ilaçlara karşı oluşan kalıtsal veya kazanılmış direnç oluşumunda kanser tedavisinde başarısız olunmasına sebep olur. Tümörler kemoterapiye kısa bir duyarlılık döneminden sonra sık sık karşılaşılması sonucu dirençli hale gelebilirler. Dirençli hücredeki çeşitli proteinler ilacın hücre içi etkinliğinin kaybolmasına ve ilacın hızla hücre dışına atılmasına neden olur. Kanser kemoterapisine dirençli genler arasında en bilineni *mdr-1* genidir. ^{41,58}

2.6. Cisplatin (CİS-DİAMİNEKLOROPLATİNUM II = CDDP)

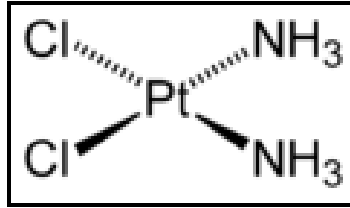
Cisplatin, kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan ve yüksek antitümöral aktivite gösteren en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir.^{60,61} Oldukça geniş kullanım alanına sahip olan cisplatin; ürogenital sistem kanserleri, santral sinir sistemi tümörleri, ilerlemiş yumurtalık kanserleri, nonseminomatöz testis tümörleri, mesane, prostat, serviks, özafagus, meme ve baş-boyun kanserleri gibi erişkin çağda görülen bir çok kanser türünün yanı sıra, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastoma, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün de tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁶²

1965 yılında biyofizikçi Barnett Rosenberg ve arkadaşları, elektriksel alanın bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesine etkilerini incelemek için *Escherichia Coli* ile yaptıkları deney sırasında tesadüf eseri cisplatini keşfetmişlerdir. Yapılan bu çalışmada E.coli'nin büyüme alanında platin elektrodları kullanılmış ve platin elektrodlarının bulunduğu bölgedeki bakterilerin bölünmesinin durduğu ancak normalden çok daha uzun filamanlara sahip olduğu gözlenmiştir. İncelemeler sonucunda bu olayın elektriksel alandan kaynaklanmadığı platin elektrotlarından E.coli'nin büyüme ortamına geçen platin türevlerinden kaynaklandığı bulunmuştur. Yapılan kimyasal analizler sonucunda bakterinin hücre bölünmesini durduran bileşenin ilk defa 1845 yılında tanımlanmış ve Peyron kloridi adı ile bilinen daha sonra cisplatin adını alan platinin organik bir türevi olduğu saptanmıştır. Bu bileşenin bakteri hücre bölünmesini engellemesi, çok hızlı büyüyen tümörlerdeki hücre bölünmesinde durdurabileceğini düşündürmüştü ve 36 gün süren sarkomlu fareler üzerine yapılan çalışmada cisplatinin tümör boyutunda gerilemeye sebep olduğu

saptanmıştır. 1978 yılında Amerika Gıda ve İlaç kurumunun (FDA) onayını alan cisplatin antineoplastik ilaçlardan biri olarak klinik kullanıma girmiş ve kanser hastaları üzerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{61,62,63,64,65}

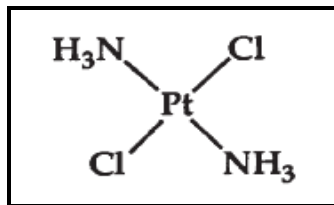
2.6.1. Cisplatin'in Yapısı ve Etki Mekanizması

Cisplatin (cis-diaminedikloroplatinum (II), cis-platinum (II), cis-DDP, CDDP), merkezdeki iki değerlikli platin atomuna bağlı iki klor ve iki amonyum atomu içeren, suda çözünebilen bir bileşiktir. Kimyasal formülü; $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ olan cisplatinin moleküler ağırlığı; 300.05 g/mol'dür. (Şekil 2)^{64,142}

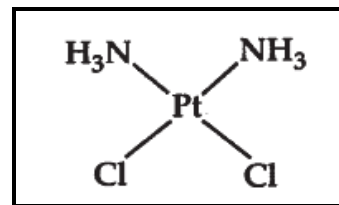


Şekil 2. Cisplatinin moleküler yapısı (Cl; klor, NH₃; amonyum, Pt; platinum)

Bileşik *cis* ve *trans* olmak üzere iki izomere sahiptir. Bunlardan cis formu sitotoksik özelliğe sahiptir. (Şekil 3)^{64,65}



cis-diaminedikloroplatinum



trans-diaminedikloroplatinum

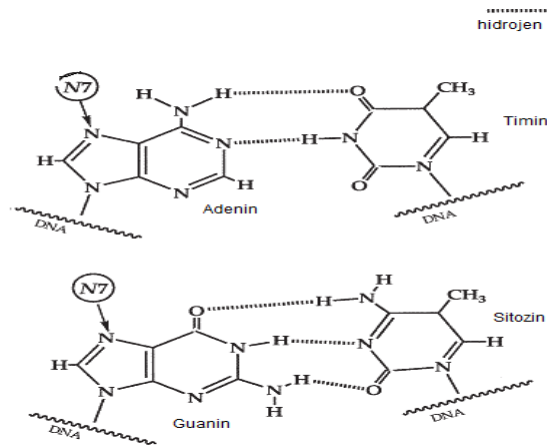
Şekil 3. Cisplatin İzomerleri

Cisplatin, hücre döngüsüne özgü olmayan alkilleyici ajanlar grubuna dahildir. DNA çapraz bağlarını etkiler ve hızla kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerinin bölünmesini engeller. Cisplatinin antitümöral etkisinin görülebilmesi için hücre içerisinde reaktif platin türlerine (monoaqua-diamine-platin veya diaqua-diamine-platin) hidrolize olması gerekir. İlacın etkinliğinin görülebilmesi için cisplatinin hücre içine alımı önem kazanır. Cisplatin hücre içine pasif difüzyon ve aktif transport yolu ile alınır. Pasif difüzyon ile alımda, ortamda bulunan klor iyonu konsantrasyonu önem taşır. Hücre içi klor iyonu konsantrasyonu hücre dışı klor iyonu konsantrasyonundan az olduğu takdirde cisplatin pasif difüzyon yolu ile hücre içerisine alınır. Cisplatinin hücre içerisine aktif transport ile alınmasından sorumlu mekanizmalar organlara göre değişiklik göstermektedir. Hücre membran proteinlerinden bakır transport proteini olan 'copper transporter 1' (CTR1) ve bakır transport proteinlerinden Golgi ve hücre membranı arasında taşıyıcı rol oynayan ATP7A ve ATP7B proteinleri cisplatinin hücre içine alınmasında görev almaktadır. Bunun yanı sıra organik katyon transporter (OCT) proteinince proksimal tübüllerde cisplatinin hücre içine alınmasında rol oynamaktadır.^{63,64,65,66}

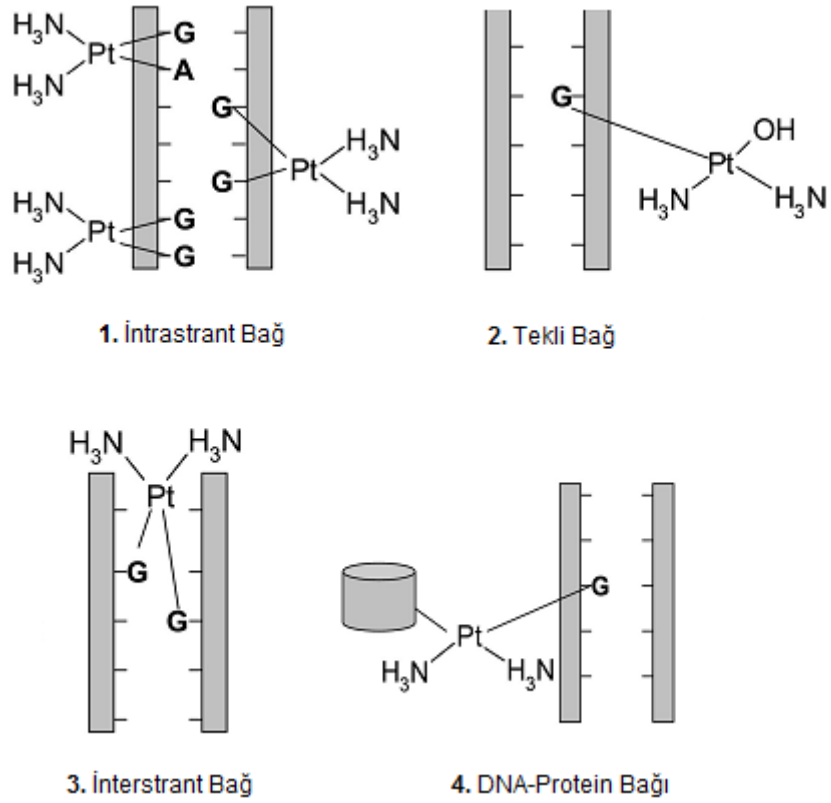
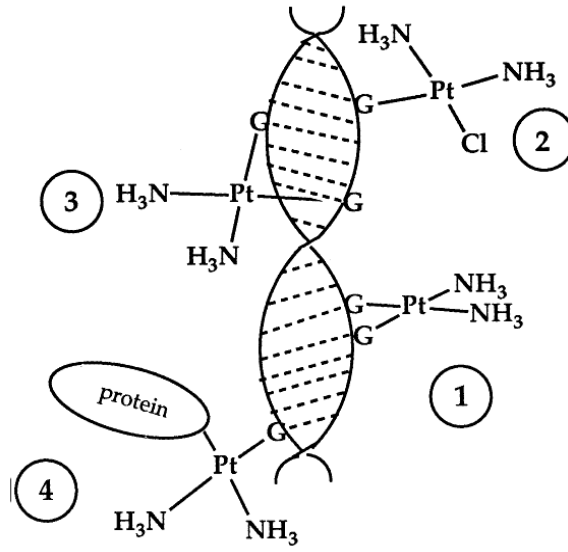
Cisplatin hücre içerisine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek hücrede apoptoz, nekroz, oksidatif stres, fibrojeniz, inflamasyon, hipoksi ve mitokondrial hasara yol açarak sitotoksik etkisini gösterir. Özellikle hücrede sitozolde, mitokondrionda, nükleus ve mikrozomlarda cisplatin konsantrasyonu maksimumdur.⁶⁷

İlaç hücre içerisine girdikten sonra su ile reaksiyona girerek sahip olduğu klor iyonlarını kaybeder ve klor iyonları yerine su molekülü kazanarak ilacın nükleik asitlerle ve proteinlerle reaksiyona giren pozitif yüklü aktif şeklinin oluşmasını sağlar.^{63,65}

Pozitif olarak yüklü aktif yeni moleküle, hücre içerisindeki çiftleşmemiş elektron içeren oksijen atomları, sülfür ve nitrojen atomları, tiyoller, membrandaki fosfolipidler, hücre iskelet elemanlarından mikofilamanlar, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'ın pürin bazları ve birçok aminoasit yan zincirleri gibi nükleofilik gruplar bağlanarak ilacın sitotoksik özelliği gözlenir. Özellikle DNA ilacın sitotoksik özelliğinin görüldüğü başlıca hedeftir. Cisplatin, DNA'daki pürin bazlarının (adenin ve guanin) oldukça reaktif olan 7.azot atomu ile kolayca reaksiyona girerek tekli bağ, DNA ile sitozol ve çekirdekdeki proteinler arasında, iki DNA zinciri arasında (interstrand) (cis-platinumdiamine-d (GpG)) ve en sık olarak da tek DNA zincirindeki pürin bazları arasında (intrastrand) (cis-platinumdiamine-d (ApG)) kovalent çapraz bağlar oluşturarak DNA'nın yapısını bozar ve DNA'nın transkripsiyonunu ve replikasyonunu inhibe ederek hücre siklusunun G2 fazında durmasını sağlar. DNA'da oluşan hasar sonucu devreye hücre içinde bulunan, DNA'da oluşan hasarı tanımakla görevli hücre içi proteinler girer ancak cisplatin'in modifiye ettiği DNA yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı onarılamayacak boyutlardadır ve hücre tarafından tolere edilemez, bu sebeple DNA hasarını fark eden ve sarmal üzerine bağlanan proteinler birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek apoptoz veya nekroz yolu ile hücre ölümüne neden olur.^{63,64,65,66,67,68,143} (Şekil 4, 5)



Şekil 4. Pürin bazlarının (Adenin ve Guanin) reaktif 7.azot atomu ¹⁴²



Şekil 5. Cisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar 1) İntrastrand bağ 2) DNA tekli bağ 3) İnterstrand bağ 4) DNA-protein bağı¹⁴¹

Cisplatin'in hücre DNA'sında oluşturduğu sitotoksik etkilerin yanı sıra hücre mitokondrion işlevi üzerinde de etkilidir. Mitokondriondan kalsiyum O_2 çıkışını artırır, aynı zamanda oksijen taşınmasında arttırarak solunum hızında artışa, dolayısı ile hipoksiye neden olur. Bunun yanı sıra ATPaz aktivitesini engeller. Tüm bu olaylar hücre ölümü ile sonuçlanır. Makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunda ilacın etkisi ile artış gözlenir ve fibrozise neden olur.⁶⁴

Cisplatin tümör nekroz faktör'ün ($TNF-\alpha$) ekspresyonunu artırır, $TNF-\alpha$ hücrede inflamasyona yol açar, aynı zamanda apoptozis'i indükler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine katkıda bulunur.¹⁴³

Cisplatin sitotoksitesinde oksidatif stres hasarı, ROS üretimi önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres hasarında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri; mitokondrion, ksantin-ksantin oksidaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) tarafından üretilir. Cisplatinin etkisi ile tüm bu yollarla üretilen reaktif oksijen türleri proteinlere, lipidlere, DNA'ya etki ederek yapılarına zarar verir. İlaç aynı zamanda glikoz-6 fosfat dehidrogenaz ve hekzokinaz aktivitesinin artışına sebep olarak reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu tetikler ve glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz, katalaz gibi aktif antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek antioksidanların üretiminin azalmasına yol açar. Antioksidan sistemlerinin hasar görmesi sonucunda lipid peroksidasyon ürünü, malondialdehid (MDA) düzeyi artmaktadır. Oluşan serbest radikaller, hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna sebep olarak hücre membranının lipid yapılarına zarar verir, proteinlerin denatürasyonuna yol açar, bu da enzimatik inaktivasyona ve mitokondrial disfonksiyona neden olur.^{141,142,143}

Sonuçta serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı olarak serbest yağ asitleri artar, özellikle karaciğer ve böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu artar, fosfolipidler degrades olur, antioksidan üretimi azalır, mitokondrideki voltaj bağımlı kanallarla reaksiyona girerek membran permeabilitesinin değişmesine ve sitokrom c'nin mitokondriden salınmasına yol açar, bir çok sinyal ileti yolağını aktive hale getirerek hücrede apoptozisi başlatır ve hücre ölümüne sebep olur. ^{63,64,65,66}

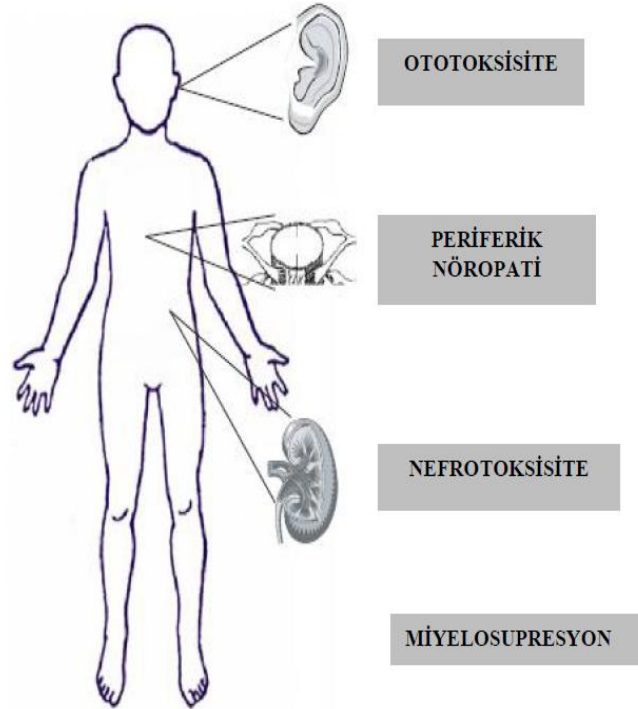
2.6.2. Cisplatine Bağlı Toksisite ve Toksisitenin Önlenmesi

Cisplatin ve benzer kemoterapötik ilaçlar tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurarak tedavi edici etki göstermenin yanı sıra, normal hücre ile tümör hücreleri arasındaki yapısal benzerlikten dolayı normal hücrelerin de kemoterapi ile hasarlanmasına neden olmaktadır.

İlaçların kullanımını sınırlayan klinik açıdan önemli birçok sistem üzerinde yan etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Cisplatinin doz kısıtlayıcı en iyi bilinen yan etkileri; ototoksisite, nefrotoksisite, renal toksisite, nörotoksisitedir. Şiddetli bulantı, kusma, diyare, iştahsızlık, tat duyusunda bozukluk gibi gastrointestinal sistem bozuklukları, bradikardi, hipertansiyon, serebral arterit gibi kardiyovasküler bozukluklar, saç dökülmesi, döküntü gibi dermatolojik etkiler, miyelosüpresyon, anemi, hemolitik anemi, miyelosupresyon gibi hematolojik bozukluklar, ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonlar, karaciğer işlev testlerinde yükselme, bilirubin seviyesinde yükselme gibi hepatik sistem bozuklukları, gen mutasyonlarına, kromozomal kırılmalara ve somatik hücrelerde anöploidiye neden olmaktadır, üreme organları

üzerinde toksik etki sonucu infertilite, işitme kaybı, görme bozukluğu, renk algısında değişiklik, periferik nöropati gibi nörolojik bozukluklar, kemik iliği üzerine depresif etkisi, kas krampları, serum demir düzeyinde yükselme gibi çok sayıda istenmeyen yan etkiler görülmektedir.^{66,67}

Bunların içerisinde en önemli doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir, çünkü cisplatinin büyük bir kısmı (%90) idrar yolu ile atılır, böbreklerin diğer organlara oranla cisplatine daha çok maruz kalması ciddi ve geri dönüşümsüz böbrek hasarına yol açmaktadır. Cisplatin nefrotoksitesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır, cisplatinin vücuttan atılımında böbreklerin ana organ olması ve cisplatine fazlaca maruz kalması nedeni ile böbrekler işlevini kaybetmekte ve akut böbrek yetmezliği , akut tübüler nekroz, glomerüler filtrasyonun bozulması gibi etkiler cisplatin alan hastalarda sıklıkla karşılaşılmaktadır.⁶⁶ (Şekil 6)



Şekil 6. Cisplatine bağlı gelişen toksisiteler^{66,141}

Oluşan bu yan etkileri önlemek için cisplatin hızlı enjeksiyon yerine uzun süreli infüzyon şeklinde uygulanabilir bu sayede elimine edilen ilaç miktarı azaltılır ve toksisite minimuma düşürülür. Toksisite bu şekilde kesilemezse doz azaltılır veya ilaç kesilir.¹⁴³

İlacın tedaviye devamı için kullanımı zorunlu olduğu durumlarda ise yalnızca tümörlü hücreyi hedef alarak, ilacın antitümöral etkinliğini engellemeden, cisplatinin istenmeyen yan etkilerinden korunmak amacı ile koruyucu ajanlar cisplatin gibi kemotöropatik ilaçlarla birlikte kullanılarak oluşan toksisite minimuma indirilmeye çalışılır.⁶⁸

Kemoterapötik ilaçların toksisiteyi önleyici ajanlarla birlikte kullanılması son zamanlarda önem kazanmıştır ve bununla ilgili çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda vitamin C, vitamin E, glutamin, melatonin, silmarin, L-carnitin gibi pekçok antioksidan kullanılmış ve bu antioksidanların cisplatine bağlı oluşan toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir.⁶⁸

Cisplatine bağlı gelişen toksik etkilerin önlenmesi için antioksidan kullanımının yanı sıra ilacı verirken ve ilacı verdikten sonra salin (%0.9 NaCl) ile hidrasyon yapılması cisplatinin yol açtığı toksisiteyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Salin ya da benzeri hipertonik sıvıların cisplatin ile kullanılması cisplatinin vücuttan atılımını hızlandırır. Bunun yanı sıra salin içeriğindeki yüksek klor iyonu konsantrasyonu sayesinde klor iyonlarının cisplatinden ayrılması önlenerek reaktif cisplatin türevlerinin oluşumunda engellenmiş olur.^{65,68,69}

2.6.3. Cisplatinin Farmakokinetiği

Cisplatin mide ve barsak kanalından emilemediği için intravenöz (İV) veya intraperitoneal (İP) uygulanır. Vücuttan atılımı ise üriner yol ile olur. Cisplatin ya tek başına yaklaşık 100 mg/ m² dozda uygulanır ya da onaylı diğer kemoterapötik ajanlarla yaklaşık 20 mg/ m² dozda kombine olarak uygulanır. Her iki uygulamada toksisite aynı görülsede intraperitoneal uygulama sonrasında cisplatin konsantrasyonu periton boşluğunda (diyaframda, mezenterde, omentumda, peritonda) daha fazla olduğu tespit edilmiş bu sebeple intraperitoneal uygulama daha çok tercih edilmektedir. Cisplatin uygulandıktan sonra ilk 5 gün içinde ilacın %27-43 kadarı idrar ile elimine olur. Geri kalan kısmı ise daha uzun sürede vücuttan atılır. Yaklaşık 180 güne kadar ilaç dokularda saptanabilir.^{65,69,70}

2.7. Apoptozis

Hücrelerin büyümesi, çoğalması ve farklılaşması bir düzen içerisinde olmaktadır. Hücreler çeşitli iç ve dış etmenlerin etkisi sonucu mitozla çoğalırlarken, programlı ölüm ya da 'apoptozis' denilen olayla kontrollü bir şekilde yok olurlar. Doğal bir denge halinde bütün bu olaylar devam eder, böylelikle yapım ve yıkım dengesi sağlanarak dokulardaki hücre sayısı uygun seviyede tutulmuş olur.^{71,72}

Apoptozis, sağlıklı doku oluşumu ve gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Genetik olarak kontrol altında hücrelerin kendi kendini yok ettiği, RNA'ya, protein

sentezine ve enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölüm şeklidir.¹ Hücre ölümünün normal gelişim evrelerinde, homeostazisin sağlanmasında veya organizmanın ihtiyaç duymadığı yaşlanmış, hasarlanmış, biyolojik görevini tamamlamış, organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde, bakteri ve otoreaktif virüslerce enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında görevli olan apoptozis, komşu hücrelere zarar vermeden, hücre membran bütünlüğünün korunduğu bir seri kontrollü olaylar zinciridir.⁴¹

Apoptozis Yunanca', 'apo' (ayrı) ve 'ptosis' (düşmek) sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Düşmek, dökülmek anlamına gelmektedir. Sonbahardaki yaprak dökümünü andırdığı için, hücre yitimini belirtmek amacıyla bu terim ilk kez 1972 yılında İskoçyalı patolog John Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr ve arkadaşları ilk olarak apoptotik hücreleri elektron mikroskopik ve morfolojik olarak gözlemlemişler, ölen hücrelerin komşu hücrelerden bağımsız, hücre hacminin küçüldüğü, hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarının gözlemlendiği, organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı 'büzüşme nekrozu' olarak adlandırılmışlardır. Ancak apoptozis ile gerçekleşen hücre ölümünde, hücresel morfolojik ve biyokimyasal olayların, genetik mekanizmaya dayandığı ve nekroz ile gerçekleşen hücre ölümünden tamamen farklı olduğunun gözlenmesi üzerine nekrozdan ayrı bir hücre ölüm şekli olduğunu belirtmek adına 'apoptozis' terimini kullanmışlardır. 1984'de Andrew Wylie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla da apoptotik hücrede morfolojik değişimlerin yanı sıra birçok biyokimyasal markerlarında olduğunu, apoptotik hücre DNA'sının agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNA bütünlüğünün kalmadığını, DNA'da endonükleazların yol açtığı kırıklar sonucu apoptotik hücrelere özgü DNA'daki mono ve oligonükleozomal birimlerin merdiven basamağını

andıran bantlar oluşturduğunu gözlemleyerek bu bilgileri desteklemişlerdir.^{73,74}

2.7.1 Apoptozisin Biyolojik Süreçteki Rolü

Doğadaki birçok canlıda; embriyonal süreçten başlayarak, organogenezise kadar geçen tüm gelişim basamaklarında, doku homeostazisinin sağlanmasında ve yaşlanıp ölünceye kadar geçen tüm yaşam süreci boyunca apoptozis mekanizması gözlenmektedir.⁷⁴

İnsan embriyosunun el ve ayak ekstremitelerinin gelişimi sırasında, parmaklar arasındaki mezenşimal hücrelerin apoptozunda, üreme organlarının oluşumu sırasında Müller ve Wolf kanallarının involüsyonunun gerçekleşmesinde, hücrelerin fokal delesyonunda, kalp, sindirim sistemi gibi iç organların lümenlerinin oluşmasında, sinir sistemi gelişimi sırasında istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında, gözde lensin oluşmasında ve organogenez aşamasında daha bir çok sistemin oluşması ve gelişiminde apoptozisin rolü bulunmaktadır.⁷¹

Çok hücreli canlıların normal gelişimleri sırasında, organizmanın toplam hücre sayısının düzenlenmesinde, seçilmiş bazı hücrelerin ortadan kaldırılmasında, menstrual döngüde uterus duvarındaki endometriyal hücrelerin dökülmesinde, menstrual döngüde veya menopozda görülen folikül hücre atrezisinde, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonunun sağlanmasında, barsak epitel hücresi gibi sürekli yenilenme gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde, bağışıklık sisteminin düzgün çalışmasının sağlanması

için timusda olgunlaşan T lenfositlerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce ortadan kaldırılmasında, derideki keratinositlerin yüzeye doğru göç edip epidermisin en üst tabakasına doğru göçü ile derinin organizmayı dış etkenlerden (enfeksiyon ajanları, travmatik zedelenmeler vs.) koruyucu ölü tabakasının oluşmasında (stratum korneum) ve organizma için önemli fizyolojik olayların gerçekleşmesinde etkin bir rol oynamaktadır.^{72,74}

Apoptozis mekanizması fizyolojik koşullarda genetik kontrolle gerçekleştiği gibi patolojik süreçler sonrasında da gözlenir. DNA hasarı olmuş hücrelerde, virüslerle enfekte olmuş hücrelerde, hipertermi, iyonize radyasyon, hipoksi gibi fiziksel ve toksik uyaranlara maruz kalan hücrelerde, ilaç ve çevresel faktörlere (insektisitler, tarımda kullanılan ilaçlar, kozmik ışınlar vb.) maruz kalan hücrelerde, kanser hücrelerinin (kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi gibi yöntemlerle) ortadan kaldırılması, otoimmün hastalıklara yol açan immün sistem hücrelerinin ortadan kaldırılması gibi patolojik olaylarda diğer hücrelere zarar vermeden hedeflenen hücre yok olur.⁷⁵

Organizmada gözlenen fizyolojik ve patolojik olaylarda apoptozis mekanizmasının dengede ve doğru bir şekilde işlemesi büyük önem taşır.

Apoptozis ile gerçekleşen hücre ölümlerinin zamanında ve gerekli sayıda olması gerekir. Apoptozisin gereğinden fazla olması veya yetersiz olması durumunda, hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki dengenin bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda

bulunur. Apoptozisin artması veya azalması sonucu nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, bağışıklık sistemi bozuklukları veya kanser oluşumu gibi birçok hastalık görülmektedir.⁷⁵

2.7.2. Apoptozis Morfolojisi ve Biyokimyasal Özellikleri

Apoptozis uyarısı alan bir hücrede birtakım morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenir. Apoptozis fizyolojik veya patolojik olaylar karşısında ATP bağımlı aktif bir süreçtir. Apoptoziste odak nokta çekirdektir. Çekirdek içerisinde bulunan kromatin yoğunlaşır (kromatin kondensasyonu), aktive olan Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonükleazlar tarafından parçalanır, kromatin parçaları bir araya toplanarak çekirdek zarı altında toplanır (kromatin agregasyonu) ve kresentik bir görünüm oluşturur. Apoptotik hücrede gözlenen 'kromatin kondensasyonu' sonucu hemotoksilen-eozin boyamalarda hücre çekirdeği koyu, yoğun ve mor renkli gözlenir. Apoptoziste hücre DNA'sı nükleozomlar arası bölgeden parçalanarak, 180-200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırıklar meydana gelir ve hücre bu aşamada onarım yapamaz. Kromatin parçalanması sonucu, agaroz jel elektroforezinde apoptozise özgü merdiven görünümü şeklinde DNA kırıkları gözlenir.^{76,77}

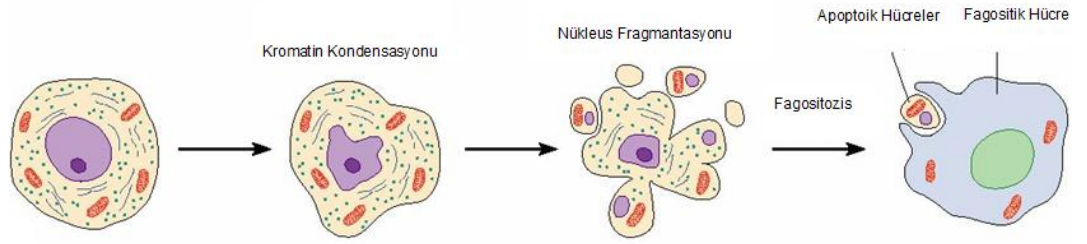
Apoptotik hücrede gözlenen diğer özellikler ise; hücre hacminde azalma ve sitoplazmada büzülme. Hücre büzülmesinin başlıca sebebi; plazma membranında bulunan iyon kanallarının pompalama sistemlerinin bozulması ile hücre iç ve dış sıvı hareketlerinin gerçekleşememesindendir. Diğer hücrelere göre daha küçük ve organeller bir araya toplanıp sıkıca paketlenildiği için sitoplazması daha yoğun olarak gözlenir. Aktin filamanların yıkımı sonucu hücre normal şeklini kaybeder.

Komşu hücreler ile olan temas yüzeylerini ve hücre yüzeyinde görülen özelleşmiş yapıları kaybederler. Granüllü endoplazmik retikulum konsantrik sarmal yapılar olarak gözlenir. Mitokondrion membran kanallarının geçirgenliği değişir, bütünlüğü bozulur, elektron transport zinciri yıkılır, sonuçta mitokondrion işlevlerinin kaybı gözlenir. Diğer organeller yapılarını korur. Hücre membranında yüzeye doğru tomurcuklanmalar (bleb) oluşur.^{74,76,77}

Sitoplazmada iyonize kalsiyum sürekli olarak artar. Kalsiyum apoptozis sürecinde apoptotik yapıların gözlenmesini sağlayacak enzimleri aktive eder. Bu enzimler; DNA kırıklarının oluşmasını sağlayan kalsiyum bağımlı endonükleazlar, sitoplazmik proteinlerin çapraz bağlanmasını sağlanarak hücre içeriğinin dışarı sızmasını önleyen ve enflamatuvar cevabın oluşumu engelleyen transglutaminaz, hücre iskeletinin yıkılmasından sorumlu kalpain gibi proteazlar, membranı döşeyen fosfolipidlerin yapısının bozulmasını sağlayan lipit modifiye edici enzimlerdir. Lipit modifiye edici enzimlerin aktivasyonu ile hücre iç yüzeyini döşeyen fosfolipidlerden bazıları (fosfotidilserin), hücre dış yüzeyine doğru yer değiştirir. Fosfolipid asimetrisi kaybolur. Membran bütünlüğünün kaybolması sonucu hücre membran tomurcukları parçalanır ve apoptotik kesecikler oluşur^{73,74,75,78,79}

Hücrenin parçalanması ile apoptozisin son basamağı olan apoptotik cisimler meydana gelir. Apoptotik cisimler; membranla kaplı değişen miktarlarda nükleus, sitoplazma, organeller veya diğer hücre içi yapıları içerir. Bu aşamadan sonra oluşan apoptotik cisimler; komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Burada önemli olan apoptozis mekanizması gerçekleşirken veya apoptotik hücreler fagosite edilirken; apoptotik hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile çevirili

‘apoptotik cisimcikler’ denilen kesecikler içinde çevrili olması ve inflamasyon yönünde immün sistemi uyarıcı sinyallerin salınmaması ve fagositozun çok hızlı gerçekleşmesidir. Fagositoz aşamasında fagosit edilecek hücrenin tanınması ve yok edilmesi; hücre membranında meydana gelen değişimler sayesinde fagosit edecek hücre ya da makrofajların yüzeyinde bulunan reseptörler (vitronektin, nektin) ile hücre membranının iç yüzeyinden apoptozis uyarısı sonucu dış yüzeye yerleşmiş fosfolipidlerin (fosfatidilserin), ayrıca hücre zarına yerleşen; thrombospondin gibi adheziv glikoproteinler ve adezyon molekülleri (ICAM 3)’nin birbirine bağlanması sonucu gerçekleşir.⁸⁰ (Şekil 7)



Şekil 7. Apoptozis morfolojisi

2.7.3. Apoptozis Mekanizması

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için, genetik mekanizmasının hücresel seviyede oluşan veya hücre dışından gelen çeşitli sinyaller yoluyla uyarılması gerekmektedir.

2.7.3.1. Apoptozis'i Etkileyen İç ve Dış Uyarılar

Apoptozis'i tetikleyen hücre içi sinyaller; hücre içi kalsiyum miktarının artması, hücre içi pH'nın düşmesi, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, DNA hasarı nedeni ile tümör süpresör geninin (p53) aktive olması, metabolik bozukluklar veya hücre siklusunda gözlenen bozukluklar.⁸¹

Apoptozisi tetikleyen hücre dışı sinyaller; nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), Koloni uyarıcı faktörler (CSF) gibi komşu hücrelerden veya ekstraselüler matriksten gelen yaşam sinyallerinin yetersizliği, sitokinler, hormonlar, onkogenler, serbest radikaller, antineoplastik ilaçlar, radyasyon, hipertermi, hipoksi gibi durumlar, tümör nekroz faktör reseptör ailesinin (TNF) üyeleri olan Fas ve TNFR-1 sistemlerinin hücrede ilgili ligandlara bağlanması, çeşitli ilaçlar, antijenler, hücre yüzeyinde perforin kanallarının oluşumu yoluyla granzimlerin hücre ile etkileşime girmesi, otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri hücreyi apoptoza götüren dış faktörlerdir.⁷¹

2.7.3.2. Apoptozis Düzenleyicileri

Apoptozis; çok sayıda ve çeşitte genler ve bu genlerin ürünü olan proteinler tarafından düzenlenir. Apoptozisin düzenlenmesinde rol oynayan genler; c-myc, bcl-2 gen ailesi ve p53 genidir. Bu genlerin ürettikleri proteinlerde bu genlerle aynı adı alır. p53 proteini, bcl-2 ailesi proteinleri, kaspaz proteinleri, apoptozis baskılayıcı faktör (IAP) ve

apoptozis uyarıcı faktör (AIF) protein aileleri apoptozisin düzenlenmesinde görev alan proteinlerdir.⁷⁵

p53 Proteini

p53 geni 17p13.1 kromozomunda bulunur. p53 geninin ürünü olan p53 proteini ya da diğer adıyla tümör baskılayıcı protein (TP53), hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Üç işlevel bölge içeren 393 aminoasitli bir proteindir. N-ucunda asidik transaktivasyon bölgesi, merkezde DNA'ya bağlanan bölge ve C-ucunda da tetramerizasyon bölgesi vardır. Birçok organizmada kanser oluşumunu baskılayan çok önemli bir proteindir.^{82,84}

Hücre çekirdeğinde normal koşullarda inaktif halde bulunan p53 proteini hipoksi, radyasyon, kemoterapi, kimyasal ajanlar, ilaçlar, serbest radikaller gibi stres koşullarına maruz kalan hücrede kanserleşmeye gidecek herhangi bir bozukluk olduğunda veya DNA'da oluşan herhangi bir hasar sonrası eksprese olur. Eksprese olan p53 proteini DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanır daha sonra hücre döngüsünü G1 evresinde durdurur, hücre DNA'sının onarımı için hücreye vakit kazandırır (DNA zarar gördüğünde DNA tamir proteinlerini harekete geçirir) ancak hasar onarılamayacak boyutlarda ise (DNA tamir edilemeyecek kadar zarar gördüğünde) apoptozisi başlatır. Hücrenin apoptozis yolu ile ortadan kaldırılması için gerekli düzenlemeleri (Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenler) sağlar. p53'ün apoptozisi indüklemesi; mitokondrion üzerinden Bax proteinlerinin ekspresyonunu arttırarak Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Çevresel şartlara ve hücresel duruma göre hücre döngüsünün

kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı ölümden görev almaktadır. p53 proteini, genomda mutasyon olmasını önleyerek genom stabilitesini korur.^{61,84}

p53 geni insan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan genlerden biridir. Eğer p53 geninde bir mutasyon oluşursa DNA'yı etkileyen faktörler hücreyi etkiler, DNA'sı hasarlanan hücre tamir edilemez veya apoptozis ile kontrollü bir şekilde yok olamaz sonuçta hücre yaşamı kontrolsüz bir şekilde uzar, uzun vadede diğer hücreleride etkileyerek kanser oluşumuna sebep olur. Bazı virüsler (papillom virüsü, adenovirüs tip 12) p53 proteinini inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozu bloke edebilirler, bu yolla bu virüsler karsinogeneze katkıda bulunurlar.⁸⁴

AIF Ailesi Proteinleri

AIF 57-kD ağırlığında bakteriyel oksiredüktaz benzeri bir proteindir. Mitokondrial intermembran aralığına yerleşmiştir ve buradan salınır. AIF'nin kaspazlardan bağımsız olarak DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşmasına sebep olan bir gen olduğu son zamanlarda keşfedilmiş ve Apoptoz Uyarıcı Faktör (AIF) olarak isimlendirilmiştir. Apoptozis; kaspaz ailesi, kaspaz DNaz aktivitesi ve birkaç yeni proteinin aktivasyonu ile başlar. Apoptozis başladığında AIF mitokondriden çekirdeğe transloke olur ve kromatin kondensasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur.⁸¹

C-myc

Büyüme faktörlerinin etkisi ile hücrenin çoğalmasını uyarır. Çoğalan büyüme faktörlerinin veya sinyallerin yokluğunda apoptotik süreci tetikleyen bir protoonkojendir. c-myc geni 'janus' geni olarak da bilinir.⁸⁵

Bcl-2 Protein Ailesi

Bcl-2 ailesi apoptotik yolağın kritik düzenleyicileridir. İnsan vücudunda yaklaşık 20 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar; mitokondri, çekirdek zarı ve endoplazmik retikulum zarının üzerinde yer alır.⁸⁴

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşan geniş bir ailedir. Bu gruplardan bir kısmı apoptozisi indükleyici etkiye sahipken (pro-apoptotik), bir kısımda apoptozisi baskılayıcı (anti-apoptotik) etkiye sahiptir. Bu iki grubun işlevleri birbirinden tamamen farklıdır. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerken, anti-apoptotik olanlar sitokrom c'nin salıverilmesini baskılar. Bu ailenin üyeleri homodimer (bcl-2/bcl-2) veya heterodimerler (bcl-2/bax) şeklinde kompleks oluştururlar.⁸⁵ (Tablo 1)

Antiapoptotik	Proapoptotik
Bcl-2	Bax
Bcl-Xl	Bak
Bcl-w	Bad
Mcl-1	Bcl-xs
	Bim
	Bid

Tablo 1. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik gruplar

Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye; hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks'e bağlıdır. Yapılarındaki hidrofobik cep BH1, BH2, ve BH3 bölgelerinden oluşur. Amfipatik α -heliks ise BH3 bölgesinde yer alır. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgeside bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğer hücresel yolları ile ilişki kurduğu düşünülmektedir. Pro-apoptotik üyeler ise kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn., Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer bcl-2 ailesi üyesi diğer bcl-2 ailesinin BH3 bölgesine bağlanır.^{84,85}

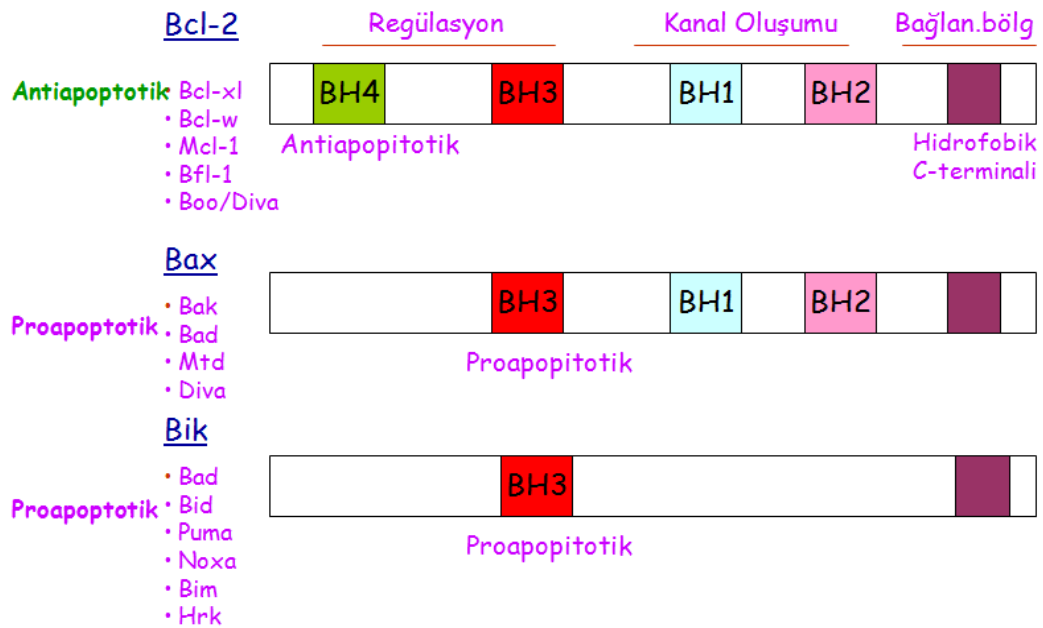
Bcl-2 ailesi proteinleri yapısal ve işlevsel olarak 3 alt gruba ayrılır;^{84,85}

1) Bcl-2 alt grubu: Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Boo/Diva gibi proteinler bu grubu oluşturur. BH1, BH2, BH3, BH4 bölgelerini içerirler. Antiapoptotik etkiye sahiptir, hücre sağkalımının devamlılığından

sorumludur. Mitokondrion membranında bulunur. Proteinin C ucunda zara tutunma bölgesi mevcuttur bu bölgeden mitokondri membranına bağlanır.

2) Bax alt grubu: Bak, Bad, Mtd, Diva gibi proteinler bu grubu oluşturur. BH1, BH2, BH3 bölgeleri içermesi ile bcl-2 alt grubuna benzerlik gösterse de, hepsi proapoptotiktir. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik gösterir ve mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarlarında kanallar oluşturarak apoptozisi indükler.

3) Bik alt grubu : Bad, Bid, Puma, Noxa, Bim, Hrk gibi proteinler bu grubu oluşturur. yalnızca BH3 bölgeleri içeren proapoptotik özellikte proteinlerdir. En önemli özellikleri; heterodimer yapıları oluşturarak, eşlerinin aktivitelerini sağlamalarıdır.^{61,84-85} (Şekil 8)



Şekil 8. Bcl-2 ailesi proteinlerinin yapısı

Pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelere bağlanması halinde inhibitör etki ortadan kalkar, Bax/Bcl-2 oranının değişmesi hücrenin apoptozise gidip gidemeyeceğini belirler. Bax sitokrom c'nin mitokondriondan sitozole salınımını indükleyeceği için, artışı hücre için ölümcüldür. Bu yüzden, anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonları apoptozisi baskımlarken, pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonu apoptozisi indükleyerek hücreleri ölüme götürür.⁸⁴

Bcl-2 geni bu genlerin içinde ilk tanımlanan gendir. İlk olarak 1985 yılında, insan B hücreli foliküler lenfomada kromozomal kırılma noktalarında keşfedilmiştir. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 geninin normalden uzun yaşam süresine sahip olduğu görülmüştür. Bu gen 18. kromozomun uzun kolunda (18q21) yer alır ve aynı adı taşıyan 25 kD molekül ağırlığına sahip proteini kodlar. Ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında bulunur ve iyon transportunu düzenler. Apoptozisi baskılama özelliğine sahip bir protoonkogendir. Bu proteinler iyon alış-verişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki sağlarlar. Hormona duyarlı organlar ile kendi kendini yenileyen ve proliferen olan çeşitli dokularda bcl-2 proteininin ekspresyonunun kuvvetli olduğu, ancak tümör hücrelerinde bu proteinin ekspresyonunun zayıfladığı gösterilmiştir. Antiapoptotik genler içinde yer alan diğer bir gen; Bcl-xL mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi korumaktadır. Bu sayede apoptozis inhibisyonu gerçekleşmektedir.^{61,85}

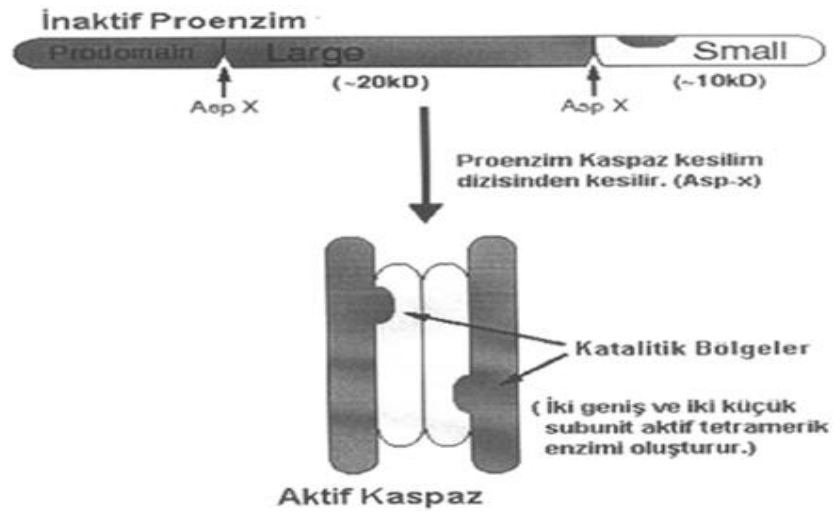
Bax proteinleri ise sitoplazmada bulunur. Bax ekspresyonunun daha fazla olması, bcl2/bax oranının azalması, DNA'da oluşan bir hasar sonrası p53 proteini aktive olur ve bax proteinlerinin

ekspresyonunu arttırır ya da IL-3 veya hücre içi kalsiyum artışı gibi durumlarda proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırarak apoptotik sürece katkıda bulunurlar. Bunun yanı sıra Bax proteinlerinden; bid aktif kaspaz 8 tarafından kırılır ve proapoptotik üyeleri etkinleştirir, bad; defosforile olur ve antiapoptotikler ile etkileşime girerek antiapoptotiklerin etkisini ortadan kaldırır, mikrotübüllerden salınan ve dynein motor kompleksi ile birlikte bulunan bim ve bmf proteinleride apoptotik uyarı ile aktive olur. Sonuçta; apoptotik sinyalin alınmasından sonra gelişen tüm bu olaylar sonrasında Bax proteinleri, mitokondrion dış zarına bağlanırlar. Bu bağlanma mitokondrion membranının seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir ya da tamamen kaybedebilir ve zarda 'Permeabilite Geçiş Por Kompleksi' (PTPC) denilen 1.5 kDa'dan küçük proteinlerin geçebileceği büyük kanalların açılmasına neden olur. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan apoptozisin gerçekleşmesini sağlayacak faktörler sitoplazmaya geçer.^{61,84,85}

Kaspaz Ailesi

Apoptozisin uyarılması, devamlılığının sağlanması ve sonlandırılmasında görevli büyük bir proteaz ailesidir. Aktif merkezlerinde sistein aminoasiti içeren sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Kaspazlar hücrede inaktif zimojenler şeklinde sentezlenir ve 'prokaspaz' adını alır. İnaktif olarak bulunan prokaspaz enzimleri apoptozis sinyalini alarak 'aktif kaspaz' şeklini alırlar ve aktifleşen bu kaspazlar inaktif prokaspazları aktifleştirirler. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. İnaktif prokaspazların, aktif kaspaz formuna dönüşmesini sağlayan üç farklı mekanizma mevcuttur. Bunlardan ilki; proteolitik kesim sonucu

aktivasyondur. Bu aktivasyon şeklinde; prokaspaz yapısında yer alan öncül bölge (pro-domain) kesilerek yapıdan ayrılır, geriye büyük ve küçük alt birimleri içeren heterodimer bir yapı kalır, oluşan bu iki heterodimer yapı birleşerek, iki aktif bölgeye sahip heterotetramer aktif kaspaz yapısı meydana gelir.^{84,85} (Şekil 9)



Şekil 9. İnaktif prokaspazın aktif kaspaza dönüşümü

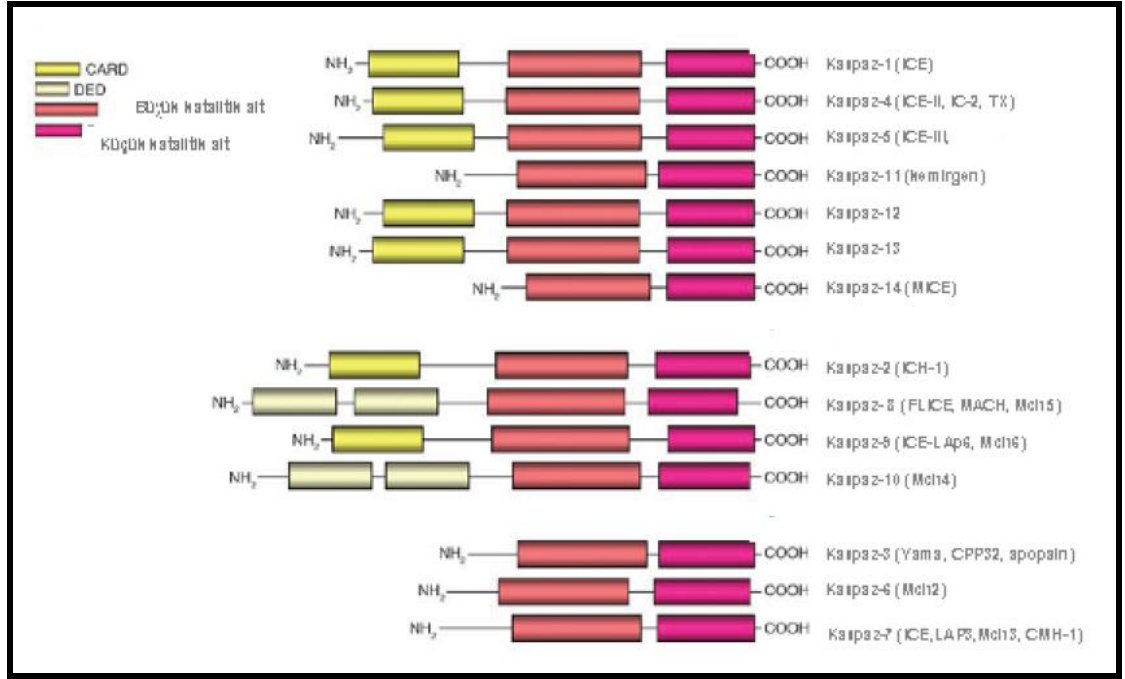
Prokaspazların aktif hale geçmesini sağlayan ikinci mekanizma; yakın uyarılma ile aktivasyonun sağlanmasıdır. Bu mekanizmada; hücre membranında bulunan ölüm reseptörü proteinleri ile membranın iç tarafında ölüm bölgeleri içeren adaptör proteinleri bağlanıp aktive olduktan sonra, ölüm bölgeleri içeren adaptör proteinleri ile prokaspazların öncül bölgeleri (pro-domain) bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bölünerek aktif kaspaz şeklini alır. Prokaspazların aktifleşmesinde görevli son mekanizma ise; holoenzim oluşumu ile aktivasyondur ki bu mekanizmanın gerçekleşmesi için prokaspazın aktivasyonunu düzenleyen bir yapının oluşması ve aktive olması gerekmektedir. Buna en iyi örnek prokaspaz-9'un aktivasyonudur. Çünkü prokaspaz-9'un aktive olabilmesi için Apaf-1'in sitokrom c ile ATP

varlığında birleşmesi ve oluşan bu yapısında daha sonra prokaspaz-9 ile birleşip onu aktive etmesi gerekir.⁸²

Apoptozis sinyalleri ile aktif hale geçen kaspazlar giderek artan hızda diğer prokaspazlarında aktive ederler ve kaspaz kaskadında yer alan enzimler bir kere aktifleştikten sonra asla geriye dönüş olmaz ve aktif hale gelen bu kaspazlar hücre içinde spesifik substrat molekülleri üzerinde proteolitik etki göstererek hücreyi programlı ölüme götürecek olan olaylar dizisini başlatırlar. Kaspazlar hücrede 100'den fazla proteini substrat olarak kullanır. Aktif kaspazlar substratlarına etki ederek hücrede birtakım değişiklikler meydana getirir bunlardan bazıları; DNA'nın parçalanmasına yol açan nükleazları inhibe eden proteini parçalarlar ve böylece hücre kendi nükleazları ile DNA'sını parçalar, DNA hasarının onarılmasında görevli proteinleri parçalar bu sebeple DNA hasarı giderilemez, çekirdek membranının bütünlüğünü sağlayan proteinlere etki ederek çekirdek membranının yapısını bozar ve çekirdekte birtakım morfolojik değişiklikler gözlenir, kromatin yoğunlaşmasından ve DNA'nın kırılmasından sorumlu endonükleazları aktive ederler, aktini yıkan proteini aktifleştirir ve hücre şeklinin bozulmasını sağlar, hücre içi lipid birikimini kontrol eden proteinlere etki ederek hücrede lipid birikiminin artmasına neden olurlar, membranın iç kısmında bulunan fosfotidilserinin, membranın dış yüzüne yerleşmesine sebep olurlar.^{76,77}

Aktif kaspazlar, substratlarını yalnızca sisteinin ucundaki aspartik asit bulunan bölgeden keser. 'Caspases' (CysteinyI-aspartic-acid-proteases) adıda; c- sistein proteaz aktivitesini, asp- aspartik asiti, ases-parçalama, ayırma özelliğinden gelmektedir.

Kaspazlar yapısal olarak, inaktif zimojen olarak sentezlenir ve dört bölge içeren tek bir zincirden oluşur. Kaspazların yapısını oluşturan birimler; NH2 terminal bölge, büyük alt ünite, küçük alt ünite ve büyük alt ünite ile küçük alt üniteyi birbirine bağlayan bağlayıcı bölgeden oluşur. İnaktif olan kaspazların proteolitik kısımları homoloji gösterir. Proteolitik kısımlar; 20 kDa ağırlığındaki büyük alt ünite ve 10 kDa ağırlığında küçük alt ünitelerden oluşur. Bu alt üniteleri birbirine bağlayan 10 aminoasitlik bağlayıcı bölge vardır. İnaktif kaspazlar düzenleyici görev yapan çeşitli uzunluklarda birde ön bölge (prodomain) veya NH2 terminal peptid bölgesi içerir. Bu bölge; başlatıcı ve sitokinleri aktive eden enflamatuar kaspazlarda 100 aminoasitten daha uzun iken, efektör kaspazlarda 30 aminoasitten daha kısadır. Kaspazların ön bölgelerinde protein-protein etkileşiminden sorumlu; başlatıcı kaspazlarda kaspaz iyileştirme bölgesi (CARD), diğer kaspazlarda ise ölüm tetikleyici bölge (DED) bulunur. Bu bölgeler; prokaspazların adaptörleri ile etkileşime girerek aktive olmasında görev alırlar. DED bölgeleri özellikle kaspaz 8 ve 10'un aktivasyonunda, CARD ise kaspaz 9 ve Apaf-1'in aktivasyonunda rol oynar. Kaspaz 3'ün aktive olması apoptozisin geri dönüşümsüz noktasının en önemli göstergesidir.^{82,83} (Şekil 10)



Şekil 10. Kaspazların yapısı

Kaspaz ailesi işlevlerine göre 3 gruba ayrılırlar. Bunlar ; başlatıcı kaspazlar, bitirici (efektör) kaspazlar ve sitokinleri aktive eden enflamatuar kaspazlardır. Başlatıcı kaspazlar; uzun öncül-bölgelere (NH₂-terminal peptid bölgesi) sahip 2, 8, 9, 10. kaspazlardır. Bu kaspazlar adaptör proteinlerle veya sitotoksik etkiye sahip maddelerle etkileşime girerek, farklı yönlerden gelen uyarıları apoptozisi gerçekleştirecek bitirici kaspazlara taşıyarak öncül-kaspazların aktif kaspazlara dönüşümünü sağlarlar. Yeterli miktarda bitirici kaspazın aktive olmasını sağlayarak, apoptotik mekanizmanın hücre içinde farklı yönlerde çoğalarak devam etmesine neden olurlar. Apoptozisin en son basamağında da kontrol noktası olarak görev yaparlar. Bitirici (efektör) kaspazlar; kısa öncül-bölgelere (NH₂-terminal peptid bölgesi) sahip, 3, 6 ve 7. kaspazlardır. Bu kaspazlar, apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini başlatıcı kaspazlardan alırlar ve proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya

fodran, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) riboz polimeraz (PARP), kaspaz aktive eden DNaz inhibitörü (ICAD), jelsolin gibi özel ölüm yapıları) çeşitli enzimatik reaksiyonlarla parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Sitokinleri aktive eden enflamatuar kaspazlar; 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14. kaspazlardır. Bu kaspazlarda, sitokinlerin aktivasyonunda görev alırlar. Örneğin; prokaspaz 1 aktive olduktan sonra interlökin 1- β dönüştürücü enzimin (ICE) aktif hale gelmesini sağlar.⁸⁶

Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunsa da, bazıları çeşitli organellerde yer alır ve buralardan salınırlar. Örneğin; kaspaz 2, 3, ve 9 mitokondrionda, kaspaz 12 Golgi cisimciğinde bulunur. Mitokondrion aracılı apoptoziste kaspaz 9, ekstrensek yolak ile apoptoziste kaspaz 8 ve endoplazmik retikulum stres yolağı ile gerçekleşen apoptoziste kaspaz 12 büyük rol oynar.^{72,83}

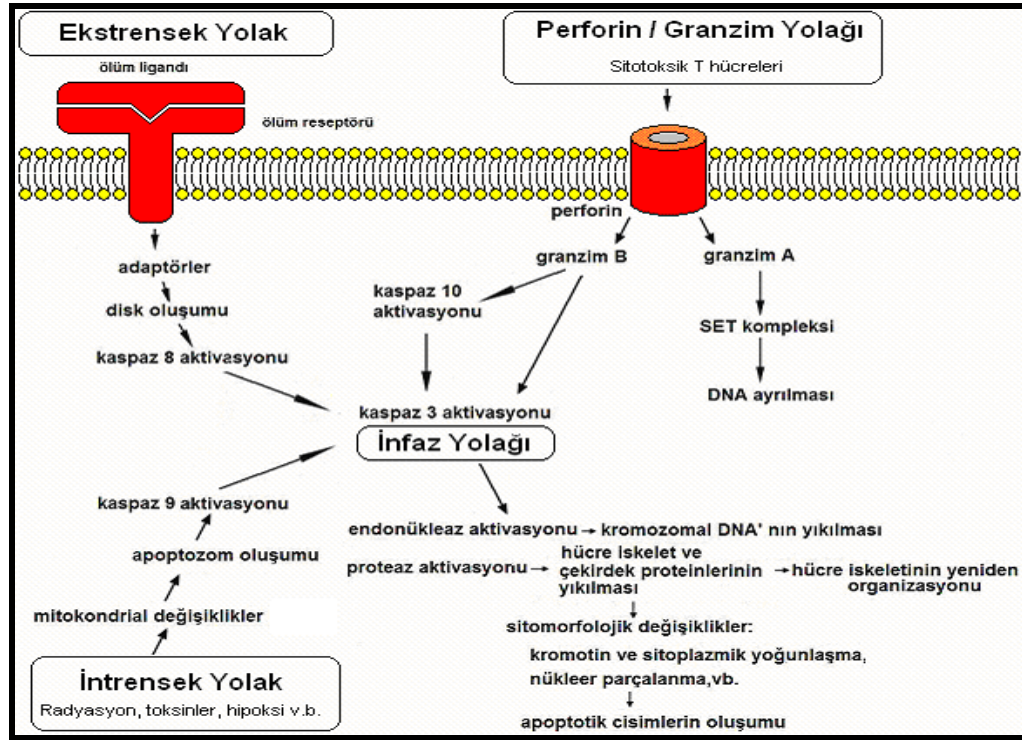
IAP Ailesi Proteinleri

Apoptozisin negatif düzenlenmesinde görevli, anti- apoptotik molekül ailesidir. IAP ailesi üyelerinden cIAPs, XIAP ve kaspazların inhibisyonundan sorumludur. Bu aileye ait inhibitörler yapılarında 70 aminoasitten oluşan farklı proapoptotik proteinlerle etkileşimi sağlayan tekrar bölgeleri (BIR) içerir. Bu bölgelerden prokaspazlara ve aktif kaspazlara (kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9) direkt olarak bağlanarak aktivitelerini inhibe eder ve apoptozisi baskılar. Ayrıca transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde yer alarak apoptozisi inhibe ederler. Özellikle malign hücrelerde IAP proteinlerinin ekspresyonu fazladır. IAP'lerin ekspresyonlarının artması veya

kaspazlarda oluşan defektler sonucu otoimmün hastalıkların, bazı nörolojik bozuklukların görölmesine ve kanser oluşumuna sebep olur.^{81,87}

2.7.3.3. Apoptozis Yolakları

Apoptozis mekanizması enerji bağımlı, moleküler aktivite kaskadı içeren karmaşık bir olaydır. Apoptozis mekanizmasında iki temel yolak vardır. Bunlar; ekstrensek veya reseptör aracılı yolak ve intrinsek veya mitokondrial yolak. Ayrıca; sitotoksik T hücreleri ve NK (Natural killer) hücreleri ve perforin/granzim bağımlı apoptozisin gerçekteşmesini sağılayan ek yolaklarda bulunmaktadır. Tüm bu yolaklar efektör kaspazların aktive olması ile apoptozisin gerçekteşmesini sağılayan infaz yolağıında birleşir. İnfaz yolağı pro-kaspaz 3'ün aktive olması ile başlar ve apoptozis için karakteristik yapıların görölmesi ile olaylanır. Son basamak olarak da, oluşan apoptotik cisimler fagositler tarafından ortadan kaldırılır. (şekil 11)^{61, 87,88}



Şekil 11. Apoptozis yolları⁷²

Ekstresek/Reseptör Aracılı Yolak

Apoptozis ile ortadan kaldırılması hedeflenmiş hücre'nin membranında bulunan spesifik reseptörlere uygun ligandların bağlanması sonucu ekstrinsek yolak ile ölüm uyarısı hücreye aktarılmış olur. Hücre membranında bulunan apoptozisde görevli reseptörler içerisinde en önemli grup 'Tümör Nekroz Faktör Reseptör' (TNFR) ailesidir. Bu ailenin birçok üyesi bulunmaktadır ve biyolojik etkileri çok çeşitlidir. Apoptozisin gerçekleşmesinde görevli TNFR ailesi üyesi ölüm reseptörleri; DR1 (TNFR1, CD120a, p55, p60), DR2 (Fas, CD95, APO-1), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), DR4 (TNF-related apoptozis-inducing ligand reseptör 1 (TRAILR1), APO-2), DR5 (TRAIL-R2), DR6, Ectodysplasin A reseptör (EDAR), Nerve growth faktör reseptör (NGF-R)'dür. Bu

reseptörler içerisinde apoptozisin ekstrensek yolağında görevli, en iyi tanımlanmış transmembran glikoproteinleri Fas (Apo-1, CD95) ve Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1 (TNFR-1)'dir. TNFR-1 birçok dokuda bulunurken, Fas reseptörü; hepatositlerde, lenfoid hücrelerde, tümör hücrelerinde, miyokarda ve akciğerlerde bulunur. Bu reseptörlerin hücre dışında sistinden zengin 'bağlanma bölgeleri' vardır. Bu bölgelere reseptöre özgü ligandlar bağlanır. Hücre dışından sinyalin alınması hücre membran reseptörüne uygun ligandın bağlanması ile olur. Fas reseptörüne FasL, TNFR-1 'e TNF ligandı bağlanır ve apoptotik sinyal hücreye aktarılır. TNF ve FasL TNF ailesi üyeleridir. FasL, sitotoksik T hücrelerinde (CTL) ve NK (natural killer) hücrelerinde bulunur. Reseptörlerin sitoplazmik kısımlarında ise 80 aminoasitten oluşan 'ölüm bağlantı bölgesi' (death domain (DD)) denilen protein zincirleri vardır. Ölüm bağlantı bölgeleri ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içine aktarımında rol oynar.^{82,88}

Fas ve TNFR-1 reseptörlerine ilgili ligandların bağlanması ile reseptör aktivasyonu gerçekleşir. Aktive olmuş reseptörlerin sitoplazma içerisinde kalan ölüm bölgelerine (DD), sitoplazmada bulunan adaptör proteinler bağlanır. Fas reseptörünün sitoplazma içerisinde kalan ölüm bölgesine 'Fas'a bağımlı ölüm bölgesi adaptör proteini' (FADD) bağlanırken, TNFR-1 reseptörünün sitoplazma içerisinde kalan ölüm bölgesine ise 'TNFR bağımlı ölüm bölgesi adaptör proteini' (TRADD) bağlanır. TRADD daha sonra FADD ile birleşir. Ancak bazı durumlarda TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere de bağlanabilir. Bunun sonucunda da önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- kB (NFkB) aktive olur. Bu durumda hücre apoptozise gidemez ve canlı kalır. Tümör hücrelerinde bu proteinin aktif olduğu gözlenmiştir.⁸² Adaptör proteinlerin ölüm bölgelerine bağlanan 'DD' bölgelerinden başka

prokaspazlara bağlanan 'DED' bölgeleride vardır. İnaktif prokaspazlar DED bölgeleri ile adaptör proteinlerin DED bölgelerine bağlanır.^{61,88}

Ligandın reseptörüne bağlanması ile reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, adaptör proteinle birleşir, adaptör proteinlerine ise inaktif prokaspazlar bağlanır. Oluşan bu yapı; ölüm başlatan sinyal kompleksini (death inducing signal complex - **DISC**) oluşturur. Oluşan bu yapı sayesinde, inaktif prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü sağlanır. Aktif kaspazlar birbirlerini aktive ederek proteolitik kaskadı tetiklerler.

Ekstresek yolak ile apopitoziste kaspaz 8 büyük rol oynar. DISC kompleksinin oluşmasından sonra aktif kaspaz 8 oluşur. Bu aşamadan sonra apopitozisin ilerleme fazı başlar. Başlatıcı kaspazlardan olan aktif kaspaz 8, infazı gerçekleştirecek olan infaz yolağını başlatan prokaspaz 3'ü aktifleştirir. Bunun için iki farklı yol vardır. Bunlar; direkt ve endirekt yoldur. Direkt yolda, aktif kaspaz 8 prokaspaz 3'ü direkt olarak parçalar ve aktif hale getirir. İndirekt yolda ise mitokondrial yolağı uyararak aktif hale geçen kaspaz 9 tarafından prokaspaz 3 aktifleştirilir.^{71,87}

İntrensek/Mitokondriyal Yolak

Hücre dışından herhangi bir ölüm uyarısı alınmadan, hücrede oluşan bir takım stres koşulları sonucunda mitokondrion tarafından başlatılan apopitozisin iç yolağıdır.

Mitokondrion, hücrenin enerji deposudur. Ayrıca hücre ölümünün gerçekleşmesi gereken durumlarda apoptozisi aktive eden çeşitli proapoptotik faktörleri sitoplazmaya salar. Apoptozisi indükleyen ve mitokondriondan salınan faktörler; sitokrom c, AIF, Smac, Omi/HtrA2, endonükleaz G ve çok sayıda kaspazlardır (prokaspaz 2, 3, 9).⁷¹

Sitokrom c; mitokondrial elektron iletim sisteminin önemli bir parçasıdır. Mitokondri iç ve dış membran arasındaki bölgede bulunur. Kaspazların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. Sitokrom c, sitoplazma proteini olan Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır. Apaf-1 'de ATP'ye ve prokaspaz-9' a bağlanır. 'Apoptozom' olarak isimlendirilen bir kompleks oluşur. Oluşan bu kompleks prokaspaz-9'u aktive eder. Aktif kaspaz-9 efektör kaspazlardan prokaspaz-3 ve prokaspaz 7'i aktive eder.⁸⁸

Smac; IAP'lerin (apoptoz inhibitör proteinleri) Kaspaz-9 aktivitesi üzerindeki inhibitör etkilerini baskılayarak apoptozisin ilerlemesine neden olur. Apoptozun gerçekleşebilmesi için ortamda IAP inhibitörlerinin olması gerekir. Smac proteinleri ile aynı görevi yapan HtrA2/Omi proteinleride IAP'ların BIR bölgeleri ile bağlantı kurar ve onları inhibe eder.⁸⁸

AIF (apoptozis indükleyici faktör); Mitokondri iç ve dış membran arasındaki bölgede bulunur. Kaspazlardan bağımsız olarak apoptozisi indükler. Doğrudan çekirdeğe etki ederek, kromatin yoğunlaşmasına ve nüklear fragmentasyona neden olur. Ayrıca hücre membranı (fosfatidilserinlerin translokasyonu) ve mitokondri membranında değişikliklere neden olur.⁸⁶

Endonükleaz G; kaspazlardan bağımsız olarak oligonükleozomal DNA parçalarının oluşmasından sorumludur.

Perforin/Granzim Yolağı

Virüs veya bakteri ile enfekte olmuş hücreler ve tümör hücreleri sitotoksik T lenfositler tarafından tanınır ve öldürülür. Tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında NK (natural killer) hücreleride görev alır. Hedef hücrelerin ortadan kaldırılmasında iki yol vardır. Bunlar; ekstrensek yolak ve perforin/granzim yolağıdır.

Ekstrensek yolak; sitotoksik T hücrelerin yüzeyinde bulunan Fas ligandın hücredeki Fas reseptörüne bağlanması sonucu gerçekleşen reseptör aracılı yolağıdır.

Perforin ve granzimler sitotoksik T hücrelerinin ve NK hücrelerinin sitoplazmik salgı granüllerinde bulunan proteinlerdir. Sitotoksik T hücreleri hedef hücreye bağlandığında ilk olarak perforin içeren granüller salar.

Perforin hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirir. Porlardan hücre içerisinde Ca^{+2} iyonları girer ve granzim içeren granüllerde hücre içersine girer. Granzim A; sitotoksik T hücresi ile başlatılmış kaspaz bağımsız yolağıta aktif rol oynar. DNA kodlarını aktive eden NM23-H1 geninin inhibisyonunu ortadan kaldırır. Bu genin aktive olması ile tümör baskılayıcı gen üretilir ve apoptozis uyarılır.

Granzim B; direkt olarak inaktif prokaspaz 3 ve 10'u aktive eder. Mitokondriden sitokrom c salınımını artırır ve ICAD gibi faktörleri inhibe ederek apoptozisi aktive eder.^{88,89}

İnfaz yolağı

Tüm bu yollar apoptozisin son basamağı olan infaz yolağında birleşir. İnfaz yolağının başlangıcı infazı gerçekleştirecek olan kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazların aktivasyonudur. Bu kaspazlar apoptozise özgü morfolojik ve biyokimyasal yapıların meydana gelmesinden sorumludur. Aktif kaspaz 3 ve 7 nükleus içerisine girer. Kaspaz 3, kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktive eder böylece ICAD'a bağlı kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz (CAD/DFF-40) serbestleşir. CAD/DFF-40 DNaz aktivitesine sahiptir ve apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan oligonükleozomal DNA kırıklarına ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz 3 ayrıca hücre membranının bütünlüğünün korunmasından sorumlu jelsolini parçalar. Bu parçalanma ile hücre membran tomurcukları oluşur. Aynı zamanda PDK-2 (p21 aktive kinaz-2) 'yi aktive eder. PDK-2 hücre iskelet proteinlerini parçalar. Hücre içinde bulunan fosfatidilserinler hücre dışına çıkar. Membran bütünlüğü bozulur ve hücre apoptotik cisimlere parçalanır. Oluşan apoptotik cisimlerde apoptozisin son aşaması olarak fagositler tarafından tanınır ve ortadan kaldırılır.⁶⁷

2.8. Antioksidanlar

Tüm hücrelerde normal metabolik faaliyetler sonucu aerobik hücre metabolizmasının bir ürünü olarak serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikallerin ömürleri çok kısa olsada yüksek derecede reaktiftir. Canlı sistemindeki protein, lipid, DNA, karbonhidrat ve nükleotid koenzimler gibi bir çok biyolojik materyalle kolayca reaksiyona girerek hücre yapı ve işlevlarına zarar verebilmektedir.⁹⁰

Serbest radikaller canlı metabolizmasının doğal bir ürünü olarak ortaya çıkabildiği gibi çevre kirliliği, radyasyon, pestisitler, kontamine, sular, ısı, ağır egzersiz, inflamasyon, enfeksiyon, ateşli hastalıklar, hava kirliliği, sigara dumanı, kemoterapötik ajanlar gibi vücut dışından gelen pek çok faktörün etkisi ile de oluşabilir.^{90, 91}

Açığa çıkan serbest radikallerin vücutta meydana getireceği zararlı etkilerden korunmak ve oluşabilecek hasarı azaltmak için SR'lerle reaksiyona girerek onları nötralize eden çeşitli savunma sistemleri gelişmiştir. Bunlara anti-oksidan savunma sistemleri veya anti-oksidanlar denir.

Özel bir maddenin oksidasyonunu engelleyen ya da geciktiren maddeler olarak da tanımlanan anti-oksidanlar SR'leri yakalar ve SR'lerin neden olduğu oksidasyonları önler.^{90,92}

SR'lerin oluşum hızı ile bunların anti- oksidanlar tarafından nötralize edilmesi hızı arasında bir denge bulunmaktadır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, SR'den etkilenmemektedir. Oluşan serbest radikaller belirli bir düzeyin üzerinde oluşursa veya antioksidanlar yetersiz olduğu takdirde ikisi arasında var olan denge bozulur. Oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulması sonucu hücre yapı ve işlevlerinde protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve yararlı enzimler üzerine etki ederek hücrelerde olumsuz gelişmelere yol açar. Bu meydana gelen oksidatif hasara 'oksidatif stres' denir. Oksidatif stres patofizyolojik olayların ve bir çok dejeneratif hastalıkların gelişmesinde önemli rol oynar. Bu sebeple organizmanın canlılığının ve hücre homeostazinin sürdürülmesinde anti-oksidanlar SR'lerin meydana getireceği kimyasal hasarlara karşı hücreyi koruduğu için SR ve anti-oksidanlar arasındaki dengenin korunması son derece önemlidir.⁹²

2.8.1. Serbest Radikaller ve Etki Mekanizmaları

SR'ler uyarılmış moleküllerin ve iyonların ayrılmaları sonucu oluşan dış yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektrona sahip atom veya moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronlardan dolayı SR'ler bir başka radikalın elektronunu alır veya bir elektron transferi yaparak daha kararlı hale gelme eğilimindedir. Bu sebeple SR'ler elektron alıcı (oksitleyici) ya da elektron verici (redükleyici) özelliklere sahip, son derece reaktif yapıda ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşime girme özelliği gösterirler. Organik veya inorganik yapıda olabilirler. Yarı ömürleri oldukça kısadır. Yüksek enerjili stabil olmayan bileşiklerdir.^{90,91,92,93}

SR'ler normal moleküllerin elektron kaybetmesi sonucu negatif yüklü normal moleküllere elektron eklenmesi sonucu pozitif yüklü veya kovalent bağların parçalanması sonucu elektriksel olarak yüksüz olabilirler.⁹¹

SR'ler kararlı hale gelebilmek için daha çok radikal olmayan maddeler ile tepkimeye girer ve elektron alışverişinde bulunurlar. Bu durumda radikal olmayan maddeleri de kararsız hale getirirler. Bu tepkimeler sonucunda reaktif ve kararsız yeni SR'ler oluşur.⁹⁴

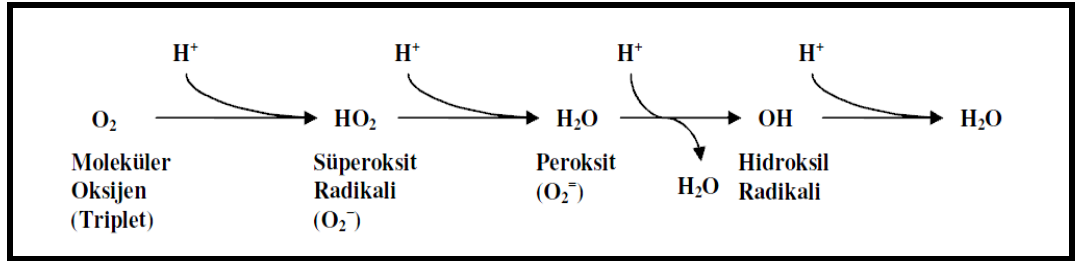
SR'ler; hidroksil, süperoksit, lipid peroksit ve nitrik asit, alkoksil radikalleri gibi farklı kimyasal yapılara sahiptirler.

Hücreleri hasara uğratabilen serbest radikal türleri;⁹¹

1. Oksijen merkezli ajanlar, moleküler oksijen, süperoksit radikali, hidroksil radikali, alkoksil radikali, peroksil radikali.
2. Oksijen merkezli olmayan ajanlar; karbon merkezli olanlar (Lipid radikalleri, alkoksil radikalleri), kükürt merkezli olanlar (Thiyl), hidrojen merkezli olanlar (Hidrojen atomu), demir merkezli olanlar (Perferin radikali).
3. Reaktif oksijen metabolitleri (ROM); ozon, hidrojen peroksit, lipid peroksit, hipokloriz asit (HOCl), koraminler.

Biyolojik sistemlerde önemli başlıca SR'ler oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler oksijen; aerobik enerji metabolizmasında görevli, hayati öneme sahip bir moleküldür. Moleküler oksijenin herhangi bir toksik etkisi yoktur. Ancak doğada dioksijen (O_2) olarak bulunur. Enerji düzeylerinde bulunan e^- yapısından kaynaklı kararsız bir elementtir. Moleküler oksijenin bu biradikal doğasından dolayı aerobik hücre metabolizması sonucu serbest oksijen radikaline dönüşür. SOR'de bir takım enzim reaksiyonları sonucu reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşür.

Biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan oksijen türevli radikaller şekil 12' de gösterilmiştir.



Şekil 12. Oksijen türevli radikaller⁹²

ROS, SR zincir reaksiyonlarını başlatabilir ve hücrede peroksit radikalleri ($ROO^\cdot$), karbon merkezli organik radikalleri ($R^\cdot$), alkoksil radikalleri ($RO^\cdot$), sülfürik radikalleri ($RSO^\cdot$), tiyol radikalleri ($RS^\cdot$), tiyol peroksit radikalleri ($RSO_2^\cdot$) gibi çeşitli serbest radikallerini oluşturma yeteneğindedirler.

Biyolojik sistemlerde bulunan başlıca SOR ürünleri ve öncülleri şunlardır; moleküler oksijen (O_2), singlet oksijen (1O_2), süperoksit

anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksil veya perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$), alkilperoksit radikali ($RO_2^{\cdot}$), hipoklorit (ClO^-) ve nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)'tir. SOR terimi, OH ve O_2 gibi reaktif oksijen radikallerini kapsadığı kadar, HOCl, H_2O_2 ve 1O_2 gibi oksijenin radikal olmayan öncüllerini de kapsamaktadır.⁹⁴

Serbest radikaller, organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluşabildiği gibi, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarakta oluşabilir.^{92,95}

Ekzojen kaynaklı etmenler; iyonize ve non-iyonize radyasyon, antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, cisplatin, adriyamisin), hava kirleticileri, sigara dumanı, zehirli gazlar, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), bazı ilaçlar, kanserojen maddeler, alkol, anestezikler, patojenik bakteri, virüsler ve pestisitler en önemli başlıca ekzojen serbest radikal üretim kaynaklarıdır.

Endojen kaynaklı etmenler ise; metabolik olayların ilerleyebilmesi için metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller üretilir. Bunlardan başlıcaları, mitokondrionlarda elektron transportu sırasında, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri sırasında, redoks döngüsünde, araşidonik asit metabolizması, fagositoz, otooksidasyon ve oksidan enzimlerin reaksiyonlarında serbest radikaller açığa çıkar.

Hücrede serbest radikallerin olumsuz etkilerinden koruyacak savunma sistemleri yetersiz olduğunda ve serbest radikallerin üretimi arttığı durumda hücredeki nükleik asitleri, karbonhidratları, lipitleri, proteinleri etkileyen patolojik bir süreç başlar. Kanser, iltihabi hastalıklar, otoimmün hastalıklar, radyasyon hasarı, göz rahatsızlıkları, yaşlanma, Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, iskemi, Down sendromu, diyabet, astım gibi pek çok hastalığın kaynağı olarak serbest radikallerin etkili olabileceği gösterilmiştir.⁹⁰

2.8.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücreler, SR meydana getireceği zararlardan antioksidan savunma sistemleri sayesinde korunur. Antioksidanlar, hidroksil, alkoksil ve peroksil gibi serbest radikalleri ortadan kaldırır. Reaktif oksijen veya O_2^- hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerinin konsantrasyonunu düşürür, ortamdan uzaklaştırır veya oluşumunu engeller. Lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu inhibe ederek lipit peroksidasyonunu engeller. Hücrede karbonhidrat, protein ve lipitlerin oksidasyonu ile oluşacak zararı önler.^{95,96}

Antioksidanlar'ın SR üzerine etkileri dört şekilde gerçekleşir.⁹⁶

1. Toplayıcı etki (scavenging)
2. Baskılayıcı etki (guencher)
3. Zincir kırıcı etki (chain breaking)
4. Onarıcı etki (repairing)

Toplayıcı etki; serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu tip bir etki gösterirler.

Baskılayıcı etki; SR'e bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemidir.

Zincir kırıcı etki; SR zincirlerini kırarak işlevlerini engeller ve SR kendilerine bağlar.

Onarıcı etki; SR'nin oluşturdukları hasarın onarılması ve tamirin sağlanması şeklindedir.

2.8.3. Antioksidanların Sınıflandırılması

Doğadaki antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir:

2.8.3.1.Kaynaklarına göre;

Endojen antioksidanlar: vücudun kendisinin SR karşı ürettiği doğal bileşiklerdir. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, bilirubin, ürik asit, sistein, histidin, albümin, hemoglobin, transferrin gibi.

Ekzojen antioksidanlar; vitamin, ilaç ve gıda gibi dışarıdan alınan bileşiklerdir. Bunlar; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, NOS inhibitörleri, lokal anestezikler, rekombinant süperoksit dismutaz, barbitüratlar gibi.

2.8.3.2. Yapılarına göre;

Enzimatik olan antioksidanlar; sitokrom oksidaz, glutatyon redüktaz, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, hidroperoksidaz gibi.

Enzimatik olmayan antioksidanlar; askorbik asit, seruloplazmin, retinoidler, glutatyon, askorbik asit, E vitamini, A vitamini, keratinoidler, ubikinonlar, flavanoidler, melatonin, ürik asit, albümin gibi.

2.8.3.3. Çözünürlüklerine göre;

Suda çözünenler: Glutatyon, C vitamini, ürik asit gibi.

Lipidlerde çözünenler: A vitamini, E vitamini, ubikinonlar gibi.

2.8.3.4. Yerleşimlerine göre;

Hücre içinde bulunanlar; katalaz, peroksidaz, ferritin gibi.

Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar; transferrin, laktoferrin, seroloftazmin, haemopeksin, albumin gibi.

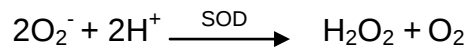
2.8.3.5. Enzimatik Antioksidanlar

Vücudumuzda doğal olarak bulunan enzimatik antioksidanlar organizma açısından işlevel öneme sahiptir.

2.8.3.5.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi, süper oksit anyonunu (O_2^-) daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ederek süperoksit radikale karşı koruyucu bir enzimdir. Süperoksit serbest radikali, oksijenin potansiyel toksik etkisinden sorumludur. Bu sebeple hücredeki süperoksit düzeylerini kontrol eder.

SR karşı gelişen ilk antioksidan savunma sistemi SOD enzimi ile gerçekleşir.



Aerobik canlıların bütün doku, hücre sitoplazması ve hücre mitokondrionunda SOD enzimi bulunmaktadır. SOD enziminin aktivitesi dokudan dokuya farklılık gösterirken karaciğer, böbrek üstü bezi, böbrek

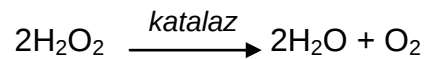
ve dalakta SOD enzim aktivitesi en yüksek düzeydedir. Hücre içi oksijen konsantrasyonlarının artması veya ROS türlerinin artmasına paralel olarak SOD enzim aktivitesinde artış gösterir.

2.8.3.5.2.Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi aktif bölgesinde hem'a bağlı demir içeren, metalloenzim olarak bilinen, redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalizlerinden biridir. %80 oranında peroksizomlarda bulunurken, %20 oranında sitozolde, mitokondride, mikrozomlarda yer alır.

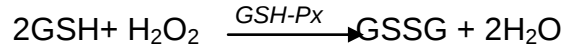
SOD enziminin faaliyeti sonucu H_2O_2 oluştuğunda SR'ler tam olarak giderilmiş sayılmaz. Çünkü H_2O_2 demir katalizörlüğünde reaksiyona girerek en toksik SR olan OH^{-1} 'i oluşturur. Bu sebeple toksik H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dönüşmesi gerekir. Bunu sağlayanda katalaz enzimidir.

Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde katalaz enzimi diğer dokulara göre daha yüksek aktivite gösterir. Katalaz enzimi yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında aktive olur. H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğunda toksik H_2O_2 glutatyon peroksidaz tarafından yıkılır. Yine aynı şekilde H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür.



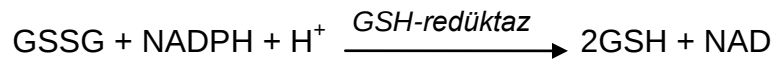
2.8.3.5.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Hidrojen peroksitlerin yanı sıra organik hidroperoksitlerinde indirgenmesini sağlar.



Hidrojen peroksitlerin ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesi sırasında GSH'yi kullanır. Tepkimeye giren glutasyonlar disülfid bağları ile birbirlerine bağlanarak indirgeyici özelliklerini yitirir ve yükseltgenmiş glutatyon dönüşür.

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksitleri ve hidroperoksitleri indirgeye bilmesi için ortamda GSH' nin bulunması gerekir. Bu sebeple yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), GSH'ye indirgenir. Bu tepkime NADPH bağımlı bir enzim olan glutasyon redüktaz (GSHR) tarafından gerçekleştirilir.

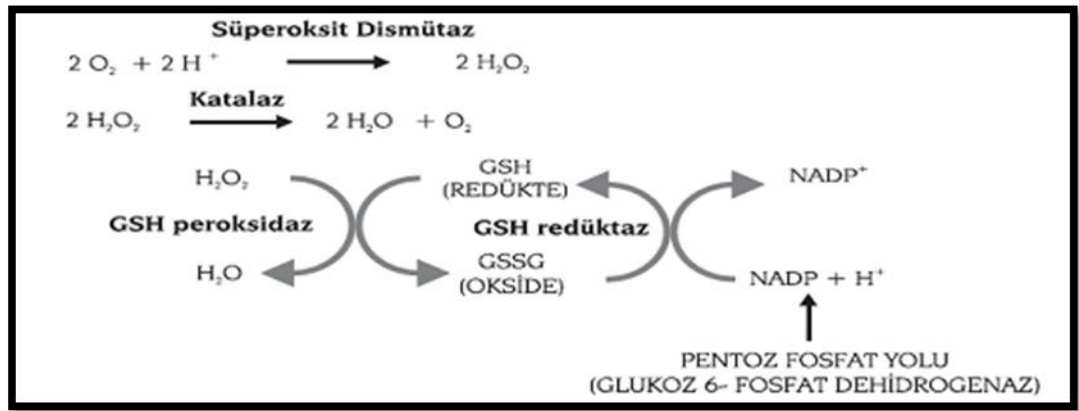


GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini sağlayan kofaktör NADPH'dir. NADPH'nin yeniden sentezlenebilmesi içinde devreye glikoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimi girer. Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD);

pentoz-fosfat yolunun ilk aşamasını katalizler ve NADPH'nin devamlılığından sorumludur. Eksikliğinde yetersiz NADPH ve yetersiz redükte glutatyon düzeyine neden olur.

GSH-Px daha çok sitozolde yer alır. Karaciğerde en aktif iken, kalp, beyin ve akciğerlerde orta derecede aktiftir, kaslarda ise aktivitesi azdır.

GSH-Px; SR peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde gözlenen oksidan strese karşı koruyucu etki gösterir. (Şekil 13)



Şekil 13. Antioksidan Mekanizmalar

2.8.3.6. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.8.3.6.1. Diyetle alınan antioksidanlar:

C vitamini, tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler, selenyum, bakır, çinko, taurin ve hipotaurin, glutatyon

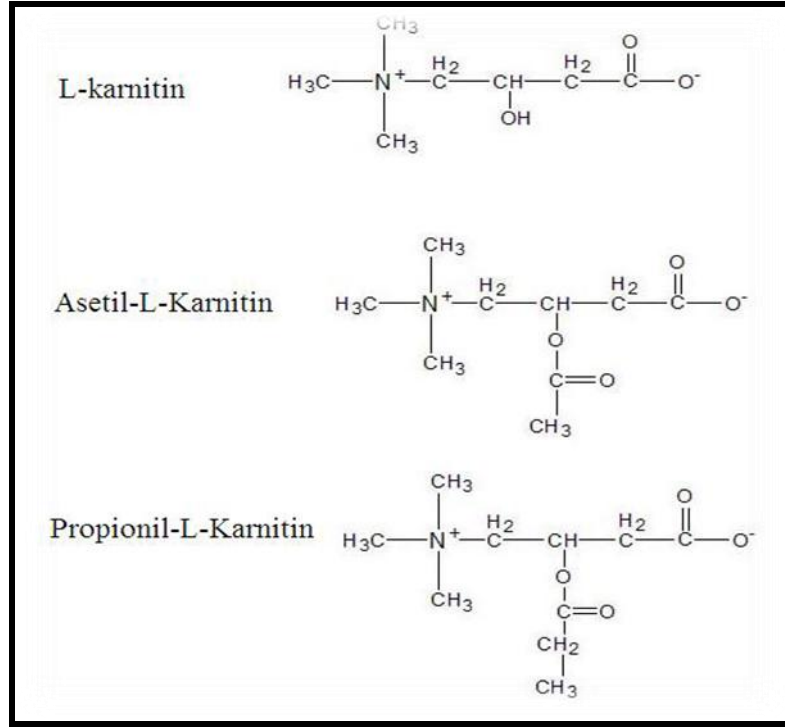
2.8.3.6.2. Diğer antioksidanlar:

Bilirubin, dihidrolipoat, fibrinojen, koenzim Q, nitrik oksit, ürik asit, melatonin, L-Karnitin^{91,92,93,94,95,96}

2.9. L-Carnitin

L-carnitin ilk kez 1905 yılında hayvan kaslarından izole edilmiştir. 1927’de ise kimyasal yapısı belirlenmiştir. Bu yapıya göre karnitin, amino asitlere benzeyen ancak hiçbir protein yapısına girmediği için gerçek bir amino asit olarak kabul edilmeyen vitamin benzeri bir amindir.^{97,98}

Suda çözünebilen L- carnitin kimyasal formülü 3-hidroksi-4-N-trimetilamino-bütirat’tır. L-carnitin’in diğer kimyasal formları, asetil-L-carnitin ve propionil-L-carnitin’dir. (Şekil 14)^{98,99}



Şekil 14. L-carnitin ve diğer kimyasal formlarının yapısı

L-carnitin, tüm memelilerde bulunan önemli bir endojen moleküldür. Başlıca kaynağı diyet (%75) olmakla birlikte, %25'i karaciğer ve böbrekte lizin ve metiyoninden sentezlenir. L- carnitin sentezi yapmayan organlar, ihtiyaçlarını kana verilen karnitinden karşılarlar. L-carnitin özellikle et, süt ve süt ürünlerinde bol bulunur, bitkisel besinlerde ise çok az seviyededir.⁹⁹

Endojen L-carnitin sentezi için başlıca lizin ve metiyonin, kofaktör olarak da askorbik asit (vitamin C), nikotinik asit, demir, magnezyum, B3 ve B6 vitaminleri, alfa ketoglutarat ve S-adenozilmetiyonin (SAM) gerekmektedir.

L-carnitin biyosentezi beş basamakta gerçekleşmektedir. Sentezin ilk basamağı proteine bağlı lizinin metilasyonudur. Metilleyici ajan SAM, tepkime sonucu oluşan madde ise trimetillizindir. İkinci basamakta 3-hidroksitrimetillizin oluşur. Üçüncü basamakta deoksikarnitinaldehit, dördüncü basamakta ise deoksikarnitin oluşur. Son basamakta ise deoksikarnitin hidroksilaz enziminin katalizörlüğünde carnitin oluşur.^{100,101} L-carnitinin insanlardaki günlük sentez seviyesi 0,16 mg/kg ile 0,48 mg/kg arasında değişmektedir. Böylece yaklaşık 70 kg ağırlığındaki bir insan günde 11-34 mg L-carnitin sentezi yapabilir.¹⁰¹

Endojen olarak sentezlendikten sonra iskelet ve kalp kaslarına taşınır.¹⁰² Plazma veya dokularda serbest formda ya da yağ asitlerine bağlı olarak yani ester formunda (açıl L-carnitin, propiyonil L-carnitin, Palmitoil L-carnitin) bulunur. Vücutta L-carnitin, esterleri ile birlikte total L-carnitin havuzunu oluşturur. Açıl L-carnitin vücutta en yaygın dağılım gösteren esterdir. L-carnitin gibi o da beyinde ve özellikle hipotalamusta yüksek düzeylerde bulunur.¹⁰³

Serbest L-carnitin'in plazma konsantrasyonu 30-70 $\mu\text{mol/L}$ aralığındadır. Kalp, iskelet kası, karaciğer, böbrekler, yağ dokusu, epididimis ve seminal sıvıda carnitin için spesifik transport sistemleri bulunur ki karnitin bu dokular içinde yoğunlaşır. Testosteronun etkisi ile epididimiste L-carnitin düzeyi plazmadan sağlanarak artmaktadır. Kan yolu ile taşınan L-carnitin ağırlıklı olarak kalp ve iskelet kasında depolanır.¹⁰⁴

L-carnitin memeli metabolizmasında ATP üretiminde, organik asitlerin detoksifikasyonunda ve uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonu için sitoplazmadan mitokondrinin iç membranına geçişinde

görev alan bir bileşiktir. L-carnitinin işlevi ile ilgili bir bozukluk yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasını kısıtlayarak sitoplazmada yağ asitlerinin birikimini artırır. Mitokondrionlarda yağ asitlerinin azalan düzeyi beta oksidasyonunu sınırlar ve daha az ATP oluşumuna yol açar. Carnitin desteği ile yağ asidi taşınmasını sağlayarak enerji üretimini artırılır. Koenzim A (KoA)'lara karşı geçirgen olmayan mitokondrion membranından uzun zincirli yağ asitlerinin taşınmasını aktive eder ve sonrasında beta oksidasyon ile ATP sağlanır. Birçok hücresel metabolik yolda kullanılan KoA'ların çoğu mitokondrion içinde bulunur. L-carnitin, beta oksidasyonu hızlandırarak asetil-KoA miktarını artırır. Toksik etkili asetil-KoA gruplarını tamponlayarak trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde KoA'ların yeniden kullanılmasını sağlar. Bu şekilde asetil-KoA/KoA oranını düzenler. İntramitokondriyal asetil-KoA'ların birikimi başta sitrat döngüsündeki enzimler olmak üzere glikoneogenez, üre döngüsü ve yağ asit oksidasyonu gibi birçok mekanizmanın enzimlerini inhibe edebilir. Bu nedenle hücrede asetil-KoA/KoA oranı çok önemlidir.¹⁰⁵

L-carnitinin önemli bir özelliği de antioksidan aktivite göstermesidir. Yaşa bağlı oksidatif zedelenme ve mitokondrional bozukluk L-carnitin verilmesi ile düzeltilmektedir. L-carnitin, bir antioksidan olarak antioksidan savunma mekanizmasında görevli SOD, GPx ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerini korur. Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan bozuklukları en aza indirdiği saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, L-carnitin nitrikoksit miktarını, hücresel solunumu düzenlediği belirtilmiştir. L-carnitin ve carnitin türevlerinin enerji üretimine aracılık eden molekülleri oksidatif hasardan koruduğu ve hasarlı biyomoleküllerin tamirine yardımcı olduğu bilinmektedir. L-carnitin, lipid peroksidasyonunu indükleyen demir iyonlarının miktarını azaltmaktadır. L-carnitin glutatyon miktarını arttırdığı söylenmektedir.¹⁰⁵

L- carnitin eksikliğinde; astrosit sitoplazmasında şişme, mitokondride genişleme ve beyaz cevherde miyelin bozukluğu, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu oluşur. Yağ asitleri sitoplazmada birikir, serbest yağ asitlerinde ve trigliseritlerde artma gözlenir, kaslarda yağlanma meydana gelir, kalp ve iskelet kaslarında enerji ihtiyacı açığa çıkar, toksik etkiye bağlı metabolik bozukluklar gözlenir, karbonhidratların aşırı kullanılmasına bağlı hipoglisemi oluşur, çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği ve tekrarlayan enfeksiyonlar gözlenir. Ayrıca siroz, kronik böbrek yetmezliği, bağırsak rezeksiyonu, valproik asit tedavisi, diyabet, kalp yetmezliği, Alzheimer Hastalığı ve kanser gibi hastalıklar L-carnitin eksikliğinde gözlenir. Ayrıca anoreksi, kronik yorgunluk, kardiyovasküler hastalıklar, difteri, hipoglisemi, musküler myopati, erkek infertilitesi gibi durumlarda dışarıdan verilen L-carnitinin faydası gösterilmiştir. ^{105,106}

Yapılan bir çalışmada, sperm hareketliliğinde azalma teşhisi konulan erkek hastalara ekzojen L-carnitin desteği verilmiş ve sperm hareketliliğinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Son zamanlarda L-carnitinin immünmodilatör özelliklerinin de olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. L-carnitin tedavisinin yaşlı inflamatuvar hücrelerde kemotaktik ve fagositik aktiviteleri arttırdığı bildirilmiştir. ^{105,106}

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)'nden sağlanan Wistar Albino cinsi, 24 adet, 200-250 gram ağırlığında erkek sıçanlar kullanıldı.

Denekler laboratuvar ortamında 3 gün süresince 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde ve $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklıkta tutuldular. Tüm deneklerin su ve besine serbest erişimi sağlandı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar 4 gruba ayrıldılar:

1.Grup (Kontrol grubu) (n=6): Birinci gün ilk olarak 5ml/kg/doz salin intraperitoneal (i.p) uygulandı. Kontrol grubunda diğer gruplarla aynı stres koşullarını oluşturmak amacıyla, 30 dakika sonra cisplatin solüsyonu ile aynı hacimde salin i.p uygulandı. Son olarak 30 dakika sonra L-carnitinle eşit hacimde salin subkutan (s.c) uygulandı. İkinci ve üçüncü gün aynı uygulamalar tekrarlandı.

2.Grup (L-carnitin grubu) (n=6): Birinci gün ilk olarak 5ml/kg/doz salin i.p uygulandı, 30 dakika sonra cisplatin solüsyonu ile aynı hacimde salin i.p uygulandı. Son olarak 30 dakika sonra L-carnitin

200mg/kg/doz s.c uygulandı. İkinci ve üçüncü gün aynı uygulamalar tekrarlandı.

3.Grup (Cisplatin grubu) (n=6): Birinci gün ilk olarak 5ml/kg/doz salin i.p uygulandı, 30 dakika sonra 0,5 mg/mL salin içinde hazırlanmış 13 mg/kg/doz cisplatin bir saatlik intraperitoneal infüzyonla uygulandı. Son olarak L-carnitinle eşit hacimde salin s.c uygulandı. 2. ve 3. gün aynı uygulamalar cisplatin verilmesi dışında tekrarlandı. Her iki gün de cisplatin uygulamaları yerine cisplatin solüsyonu ile aynı hacimde salin i.p uygulandı.

4. Grup (L-carnitin+cisplatin grubu) (n=6): Birinci gün ilk olarak 5ml/kg/doz salin i.p uygulandı, daha sonra 0,5 mg/ml salin içinde hazırlanmış 13 mg/kg/doz cisplatin bir saatlik intraperitoneal infüzyonla uygulandı. En son olarak L-carnitin 200 mg/kg/doz s.c uygulandı. İkinci ve üçüncü gün aynı uygulamalar cisplatin verilmesi dışında tekrarlandı. Her iki günde de cisplatin uygulamaları yerine cisplatin solüsyonu ile aynı hacimde salin i.p uygulandı.

Cisplatin uygulamasından 72 saat sonra (4.gün) sıçanlar ketamin (44 mg/kg) ve ksilazin enjeksiyonu ile uyutularak ötenazileri gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası sıçanların testisleri alındı. Her gruptan 1. ve 2. hayvaların testisleri TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) yöntemi için besi yeri içeren petri kaplarına aktarıldı. Işık mikroskopik incelemeleri içinde diğer hayvanlardan alınan doku örnekleri %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi. Daha sonra alışlagelmiş histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı.

3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal boyamalar için testis dokusu bloklarından polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 37°C' deki etüvde bir gece tutuldu, daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57°C' ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, son olarakta 61 °C' de 20 dakika bekletildi.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96,%90, %80 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirildi.

Dehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara 1µ sitrat tamponu (pH 6.0) (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retriiver işlemi uygulandı. Mikrodalgadan çıkan sitrat tamponundaki dokular 20 dakika dışarıda soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ile camlar yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika UltraV block (Cat: TA-125-UB, Lot: AUB100129, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikör aşamasına geçildi.

Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/100 oranında hazırlanan Caspase-9 (Caspase 9 Ab-4, Cat: RB-1205-P, Lot: 1205 P 1002B), Caspase-3 (Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Cat: RB-1197-P, Lot: 1197 P 909N) primer antikörlerine etkin bırakılarak 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada dokulara uygulanan Caspase-8 (Caspase 8, Cat: ab4052, Lot: GR1367-2) primer antikoru +4 derecede 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün işlemlere devam edildi. Primer antikordan sonra camlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 10 dakika biotinli sekonder antikör (Cat:TP-125-BN, Lot: PBN100121, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin biotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim (Cat: TS-125- HR, Lot: SHR100406, Lab Vision, Thermo Scientific) kompleksine etkin bırakıldı. İşlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.

Son olarak ortama diaminobenzedin içeren (DAB) substratı (Cat: DABS-125, Lot: 90824B, Spring Bioscience) içeren kromojen DAB (Cat: DABC-004, Lot: 90428, Spring Bioscience) eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilin'i kullanıldı.

DAB ile boyanan camlar azalan alkol serilerinden geçirildi.

Son olarak da 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entallan ile lamel ile kapatıldı. Kesitler bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

3.3. TUNEL Yöntemi

DNA fragmantasyonu ile gelişen apoptozisi saptamak için TUNEL yöntemi uygulandı.

Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutuldu daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, son olarakta 61 °C' de 20 dakika bekletildi.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96, %90, % 80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Kesitler alkolden arındırılmak için iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildi.

Sudan çıktıktan sonra etrafı PAP-pen ile çevrelenen dokular, 25 dakika boyunca 37 °C'de 20 µg/ml proteinaz K(REF: 03115836001, Lot: 11403400, Roche Diagnostics, GmbH) ile inkübe edildi. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 60 dakika 37 °C nemli ve karanlık ortamda TUNEL kiti (450 µL Label

solüsyon, 50 µL Enzim solüsyon) (Roche, In Suti Cell Death Detection Kit, AP Cat: 116489910) ile inkübe edildi. Kalan 100 µL Label solüsyonu negatif kontroller için kullanıldı. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Ardından dokular converter-POD (Cat: 11684817910, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA, 001) solüsyonu ile nemli ortamda, 37 derecede 30 dakika inkübe edildi. Tekrar dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilen'i kullanıldı.

Boyanan camlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Son olarak da 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile lamelle kapatıldılar. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi.

3.4. TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) Yöntemi

Her gruptan iki hayvanın testisleri TESE yöntemi için fertilizasyon medyası (G-IVF™ PLUS, REF: 10135, Lot: 502683) içeren petri kabına aktarıldı. Aynı sıvı içerisinde insülin enjektör uçları ile dokular parçalara ayrıldı. Bu işlem esnasında kanallar içerisindeki sperm hücreleri fertilizasyon medyası içerisine dağıldı. Spermiyumları içeren fertilizasyon medyumunu gradient medyumuna aktarıldı.(Gradient medyası hazırlamak için; G-IVF™ PLUS medyasından 1 ml alındı, İSOLATE (REF: 99.306, Lot: 99306100701) medyasından 9 ml alındı ve %90'lık gradient oluşturuldu. G-IVF™ PLUS medyasından 3 ml, İSOLATE medyasından 7 ml alındı ve %70'lik gradient oluşturuldu. G-IVF™ PLUS medyasından 1

ml, İSOLATE medyasından 1 ml alındı ve %50'lik gradient oluşturuldu. Oluşan gradientlerden en altta %90, onun üzerinde %70 ve en üstte %50'lik olacak şekilde hazırlanan gradientlerden sıra ile 1'er ml alındı ve 3 ml olacak şekilde konik dipli steril santrifüj tüplerine aktarıldı.) Spermiyumları içeren gradient medyumları 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından dibe çökmüş spermiyumlar gradient medyasından arındırılmak için fertilizasyon medyasında 2 kez 1300 rpm'de santrifüj edildi. Yıkama işleminin ardından dibe çökmüş spermiyumlar lama yayıldı. Lama yayılmış spermiyumlar KRUGER yöntemi ile boyanarak sperm morfolojileri incelendi.

3.5. İstatistiksel Yöntem

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan ratların ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tübül çapı ve tübül epitelinin boyu ölçüldü, ikili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Deneyimizde Cisplatin grubuna ait bir hayvan deney sonlandırılmadan önce ölmüştür. Bu sebeple deney bulguları 23 hayvan üzerinden yorumlanmıştır. (Tablo 8)

	I. Uygulama (24 erkek rat)	
	Canlı	Ölü
Kontrol	6	0
L-carnitin	6	0
Cisplatin	5	1
L-carnitin+ Cisplatin	6	0

Tablo 8. Deney sonunda elde edilen canlı ve ölü hayvan verileri

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Testis Histomorfolojisi

Kontrol grubuna ait testis dokusunda seminifer tübüller, seminifer tübüller arasındaki bağ dokusu bölmeleri belirgin olarak izlendi. Bağ dokusunda damarlar çevresinde Leydig hücreleri belirgin olarak gözlemlendi. Seminifer tübül' de bazal laminanın belirgin olduğu, bazal lamina

üzerinde oldukça düzenli spermatogenik hücre serilerinin belirginliği dikkat çekti. Sertoli hücreleri piramidal yapıları ile izlenirken, apikal sitoplazmaya gömülü spermatidler belirgin olarak izlendi. (Fotoğraf 1,2)

Yalın L-carnitin uygulaması yapılan gruba ait testis dokuları histomorfolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna eş değer görünüm izlendi. (Fotoğraf 3,4)

Yalın Cisplatin uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, cisplatin grubuna ait testislerde periferde dejenerasyon ve spermatogenik hücre serilerinin tübül duvarından ayrıldığı ve seminifer tübül lümeninde serbest hale gelen hücresel döküntüler birlikte izlendi. (Fotoğraf 5,6)

Aynı gruba ait yapılan incelemelerde belirgin bir şekilde merkezi intersitisyel ödemin olduğu dikkati çekti. Seminifer tübül çapında belirgin azalma izlendi. Seminifer tübül çapındaki azalmaya bağlı olarak birbirlerinden uzaklaşmış seminifer tübüller ayırt edildi. Hücreler arası ve hücre bazal membran arası bağlantı birimlerinin dejenerasyonuna bağlı olarak germ hücrelerinin bazal membrandan uzaklaşması sonucu oluşan boşluklar ilgiyi çekti. Seminifer tübüllerde spermatogenik hücre katmanında azalma olduğu buna bağlı olarak seminifer tübül lümeninin genişlediği belirgin olarak izlendi. (Fotoğraf 7,8)

L-carnitin+cisplatin grubu testis doku örnekleri morfolojik olarak değerlendirildiğinde, elde edilen bulgular kontrol ve yalın L-carnitin uygulanan gruplara eşdeğer olduğu görüldü. (Fotoğraf 9,10)

4.1.2. Spermiyum Morfolojisi

Cisplatinin spermiyumlar üzerine yarattığı etkiyi morfolojik olarak belirlemek amacı ile TESE uygulaması sonrası her gruptan elde edilen spermiyum örnekleri KRUGER tekniği uygulanarak incelendi.

139,140

Kontrol ve yalın L-carnitin uygulaması yapılan gruplarda normal spermiyum morfolojisi izlenirken, yalın Cisplatin uygulanan grupta bükülmüş başlı (bend head) sperm, orta parça anomali olan kement benzeri (lasso-like) spermiyum, orta parça (midpiece) anomali olan sperm, dönük orta parçaya sahip (looping midpiece) spermiyumlar, sitoplazmik dropletlere sahip spermiyum örnekleri dikkati çekti.

Buna karşın L-carnitin+cisplatin grubuna ait spermiyum morfolojileri incelendiğinde, kontrol ve yalın L-carnitin gruplarındakine eşdeğer olduğu gözlemlendi. (Fotoğraf 11)

4.2. **İmmünohistokimyasal Bulgular**

Kontrol grubu ve yalın L-carnitin grubuna ait testis dokuları incelendiğinde seminifer tübül epitelinde yer alan Sertoli hücreleri ve testiküler germ hücre serilerinde caspaz 9 tutulumunun olmadığı görüldü.

Cisplatin uygulanan grupta, koyu ve açık tip spermatogoniumlarda ve spermatosit l'lerde sitoplazmada caspaz 9 immünreaktivitesinin yoğun olduğu gözlemlendi. Sertoli hücrelerinde ise caspaz 9 tutulumu izlenmedi.

L-carnitin+cisplatin grubuna ait testis dokusundaki caspaz 9 immünreaktivitesi incelendiğinde az sayıda bulunan spermatosit l'lerde pozitif tutulum gözlenirken, Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlarda caspaz 9 immün tutulumu gözlenmedi. (Fotoğraf 12)

Caspase 8 tutulumu incelendiğinde, cisplatin dışında kalan tüm gruplarda tutulum gözlenmezken, cisplatin grubunda; Sertoli hücrelerinde tutulum gözlenmedi ancak spermatogonium ve spermatosit l'lerde belirgin pozitif sitoplazmik tutulum olduğu belirlendi. (Fotoğraf 13)

Caspaz 3 tutulumuna bakıldığında tüm gruplarda aktif caspaz 3'ün Sertoli hücrelerinde ve germ hücre serilerinde tutulumunun negatif olduğu görüldü. (Fotoğraf 14)

DNA fragmentasyonunu belirlemek için yapılan TUNEL boyaması sonucu kontrol grubunda tutulum gözlenmedi, yalnız L-carnitin ve L-carnitin+cisplatin grupların da çok az sayıda spermatogonium ve spermatosit l'lerde TUNEL pozitif hücreler görüldü. Cisplatin uygulanan grupta ise çok sayıda spermatogonium ve spermatosit l'de TUNEL pozitif hücreler gözlemlendi. (Fotoğraf 15)

4.3. İstatistiksel Bulgular

4.3.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan ratların ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0.05$ 'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmamızda yer alan gruplar analiz aşaması sırasıyla; Kontrol Grubu; L-carnitin uygulaması yapılan deney grubu; Cisplatin uygulaması yapılan deney grubu; L-carnitin+Cisplatin uygulaması yapılan deney grubu olarak adlandırıldı.

Başlangıç ağırlıklarına bakıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları Wilcoxon sıralı işaretler testi ile; kontrol grubunda 235.50 ± 11.05 gr, L-carnitin grubunda 239.00 ± 3.16 gr, Cisplatin grubunda 259.60 ± 4.50 gr, L-carnitin+Cisplatin grubunda 257.33 ± 5.31 gr olarak saptandı.

Deney sonu ağırlıklarına baktıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları Wilcoxon sıralı işaretler testi ile; kontrol grubunda 239.66 ± 10.94 gr, L-carnitin grubunda 226.16 ± 4.70 gr, Cisplatin grubunda 214.20 ± 9.09 gr, L-carnitin+Cisplatin grubunda 216.50 ± 6.89 gr olarak saptandı. (Grafik 1)

Kontrol grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. (P= 0.046)

L-CARNITIN grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi. (P=0.027)

CİSPLATİN grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi. (P=0.041)

L-CARNITIN+CİSPLATİN grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi. (P=0.027) (Tablo 2)

Mann Whitney U Testi ile gruplar arası deney öncesi ve sonrası ağırlık farkları karşılaştırıldı. (Tablo 3)

Kontrol grubu ile L-carnitin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.004)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.006)

Kontrol grubu ile L-carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.004)

L-carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.006)

L-carnitin grubu ile L-carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.004)

Cisplatin grubu ile L-carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi.(P=0.231)

4.3.2. Tübül Çapı ve Tübül Epiteli Boyutlarının Değerlendirilmesi

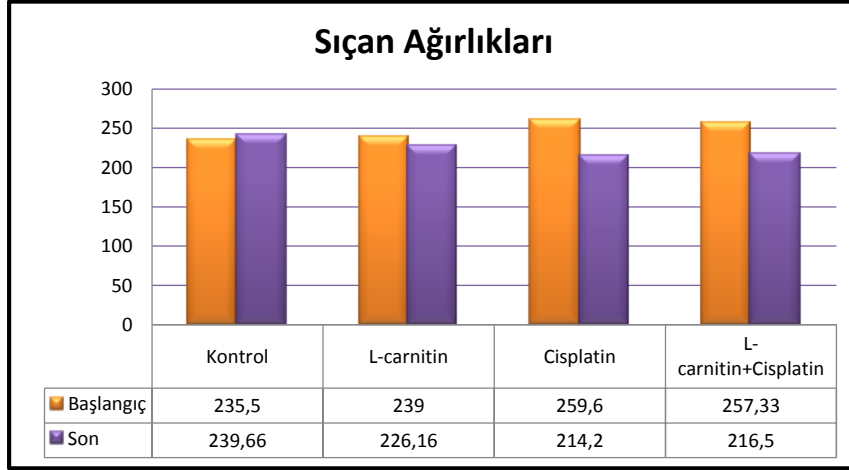
Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasındaki tübül çap ve tübül epiteli boyu arasındaki fark anlamlı olarak bulundu (p=0.000). İkili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı.

İkili gruplar arasında yapılan karşılaştırmada Kontrol ve L-Carnitin grupları arasında tübül çapı ve tübül epiteli boyu arasında anlamlı fark gözlemlenmedi.

Cisplatin grubunun epitel çapının diğ er gruplara göre anlamlı olarak azaldığı gözlendi.

L-Carnitin+Cisplatin grubunun ise Cisplatin grubuna göre tübül çap ve tübül epitel boyunun daha yüksek olduğu, ancak Kontrol ve L+Carnitin grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu, Cisplatin ile L-Carnitin grubu arasında da anlamlı fark olduğu gözlendi. (Grafik 2,3) (Tablo 4,5,6,7)

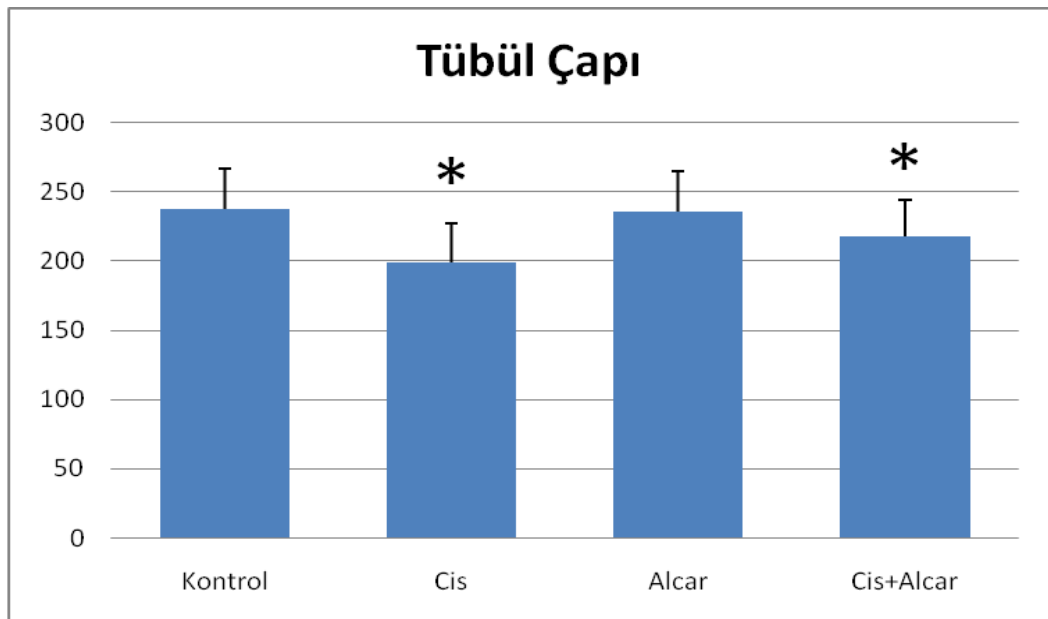
Grafik 1: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları



Grafik 2. Seminifer tübül çapları dağılımı

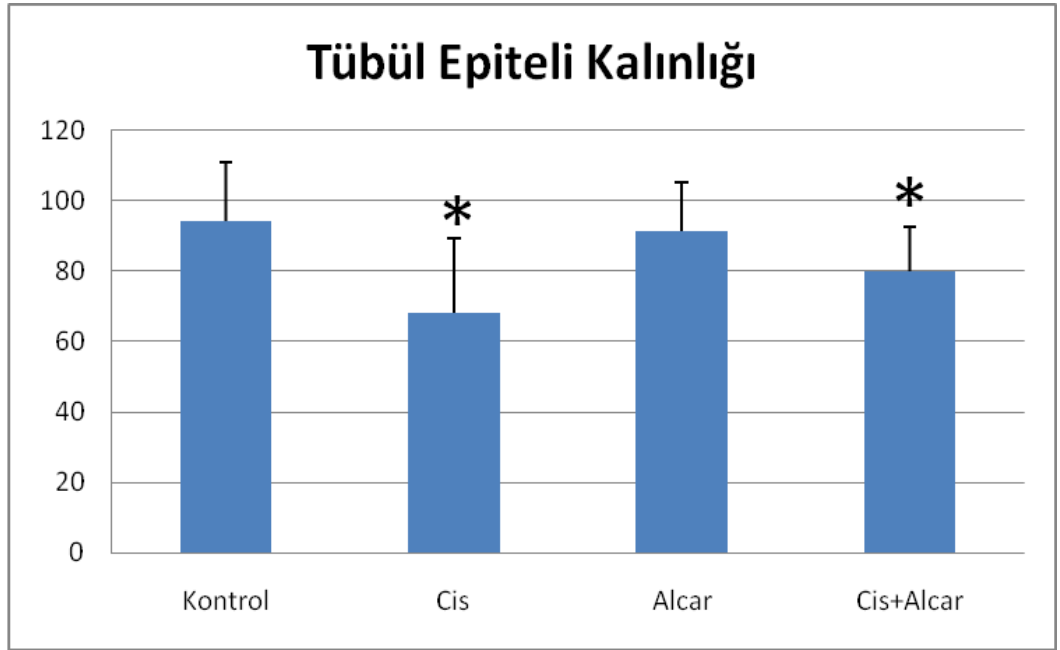
Mann Whitney U testi kullanıldı.

* Cisplatin ile L-carnitin+Cisplatin gruplarının, Kontrol ve L-carnitin grubuna göre tübül çapı arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi. ($p < 0.05$)



Grafik 3. Seminifer tübül epiteli kalınlık ölçümleri dağılımları
Mann Whitney U testi kullanıldı.

* Cisplatin ile L-carnitin+Cisplatin gruplarının, Kontrol ve L-carnitin grubuna göre tübül epiteli kalınlığı arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiştir. ($p<0.05$)



Tablo 2: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının istatistiksel farklılıkları ($P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.) * Wilcoxon sıralı işaretler testi.

		N	Ortalama	Standart Sapma	Varyans	Minimum Değer	Medyan	Maksimum Değer	P*
KONTROL	İlk gün	6	235,50	11,05	122,30	222	236	250	0,046
	Son gün		239,66	10,94	119,86	227	239	253	
L-carnitin	İlk gün	6	239	3,16	10,00	235	240,50	242	0,027
	Son gün		226,16	4,70	22,16	221	225,50	233	
CISPLATİN	İlk gün	5	259,60	4,50	20,30	253	260	265	0,041
	Son gün		214,20	9,09	82,70	202	219	222	
L-carnitin+Cisplatin	İlk gün	6	257,33	5,31	28,26	250	259	264	0,027
	Son gün		216,50	6,89	47,50	211	213,50	229	

Tablo 3: Gruplar arası deney öncesi ve sonrası ağırlık farklarının karşılaştırılması. ($P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.)

* Mann Whitney U Testi

+ Artış

- Azalış

	Ağırlık Değişimleri	P*
Kontrol	3,33 gr +	0,004
L-carnitin	12,83 gr -	
Kontrol	3,33 gr +	0,006
Cisplatin	45,40 gr -	
Kontrol	3,33 gr +	0,004
L-carnitin+Cisplatin	40,83 gr -	
L-carnitin	12,83 gr -	0,006
Cisplatin	45,40 gr -	
L-carnitin	12,83 gr -	0,004
L-carnitin+Cisplatin	40,83 gr -	
Cisplatin	45,40 gr -	0,231
L-carnitin+Cisplatin	40,83 gr -	

Tablo 4. Gruplara ait seminifer tübül çapı ölçümlerine ilişkin tamamlayıcı istatistik değerleri.

	Kontrol	Cisplatin	L-carnitin	L-carnitin+Cisplatin
Ortalama	237,8	198,6	236,1	217,8
Standart Sapma	28,5	28,4	29	26,4

Tablo 5. Gruplar arası seminifer tübül çapı ölçümlerinin istatistiksel değerleri.

	Anlamlılık Değerleri
Kontrol / Cisplatin	P= 0.000
Kontrol / L-carnitin	P= 0.755
Kontrol / L-carnitin+Cisplatin	P= 0.000
L-carnitin / Cisplatin	P= 0.000
Cisplatin/ L-carnitin+Cisplatin	P= 0.000

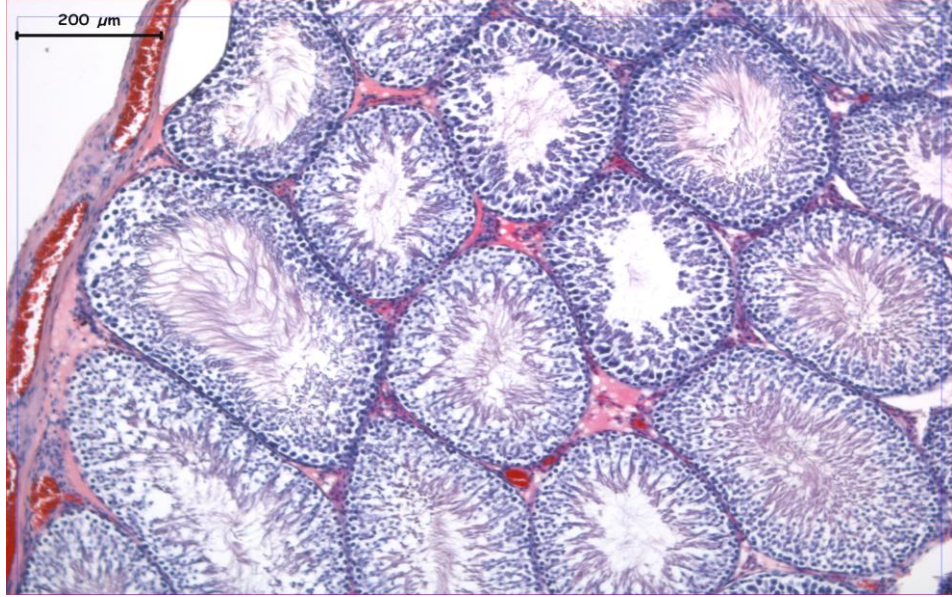
Tablo 6. Gruplara ait seminifer tübül kalınlığı ölçümlerine ilişkin tamamlayıcı istatistik değerleri.

	Kontrol	Cisplatin	L-carnitin	L-carnitin+Cisplatin
Ort	94,2	68,2	91,4	79,8
SS	16,6	21,2	13,7	12,8

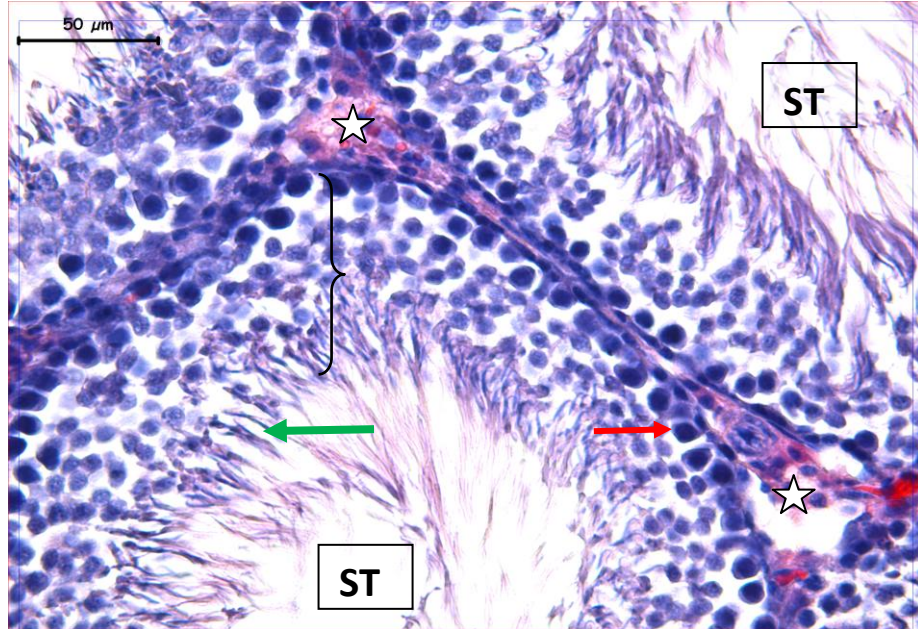
Tablo 7. Gruplar arası seminifer tübül epiteli kalınlığı ölçümlerinin istatistiksel değerleri.

	Anlamlılık Değerleri
Kontrol / Cisplatin	P= 0.000
Kontrol / L-carnitin	P= 0.310
Kontrol / L-carnitin+Cisplatin	P= 0.000
L-carnitin / Cisplatin	P= 0.000
Cisplatin/ L-carnitin+Cisplatin	P= 0.015
L-carnitin / L-carnitin+Cisplatin	P=0.001

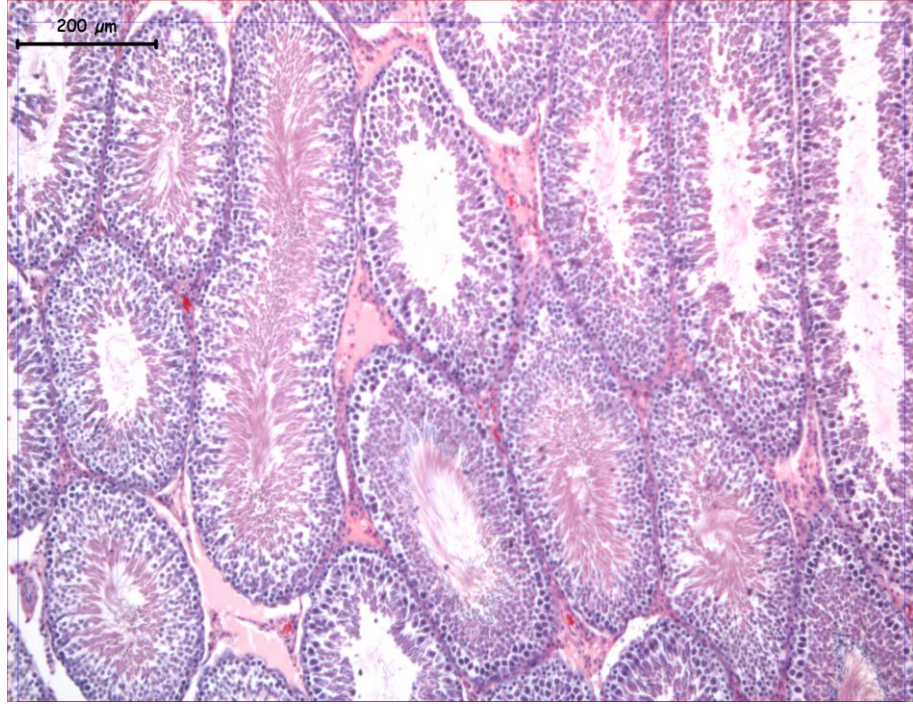
FOTOĞRAFLAR



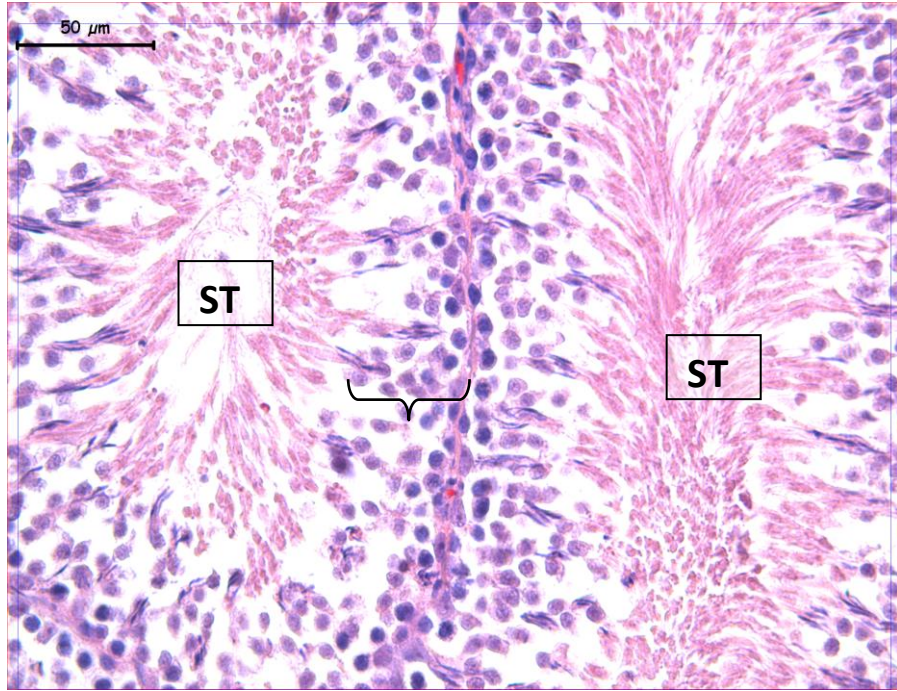
Fotoğraf 1. Normal görünümde kontrol grubu testis dokusu H&E



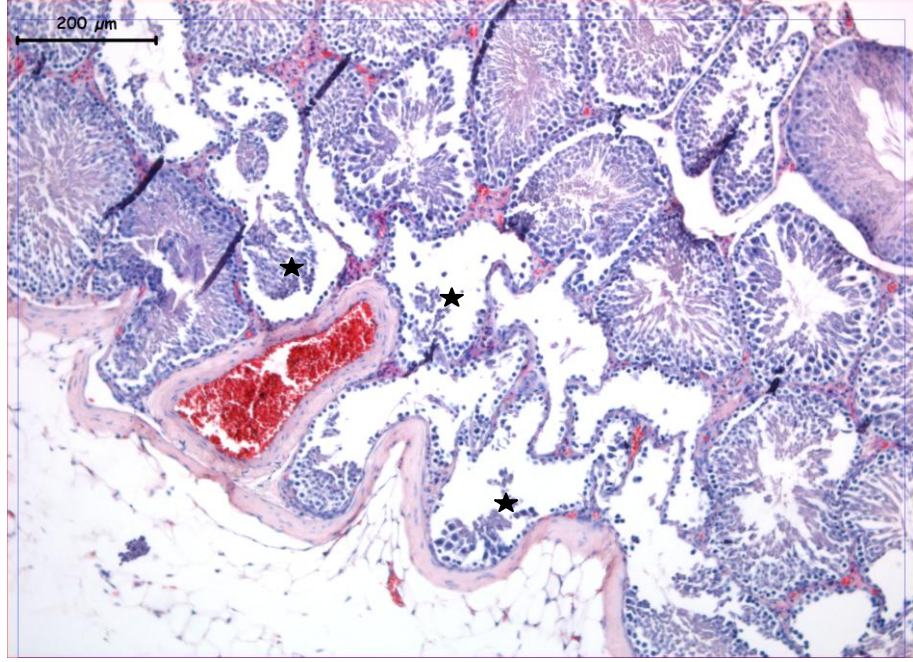
Fotoğraf 2. Kontrol grubunda intersitisyum (yıldızlar) ve seminifer tübüller (ST) normal görünümde Sertoli hücreleri (kırmızı ok), germ hücre serileri (siyah ok) ve spermatidler (yeşil ok). H&E



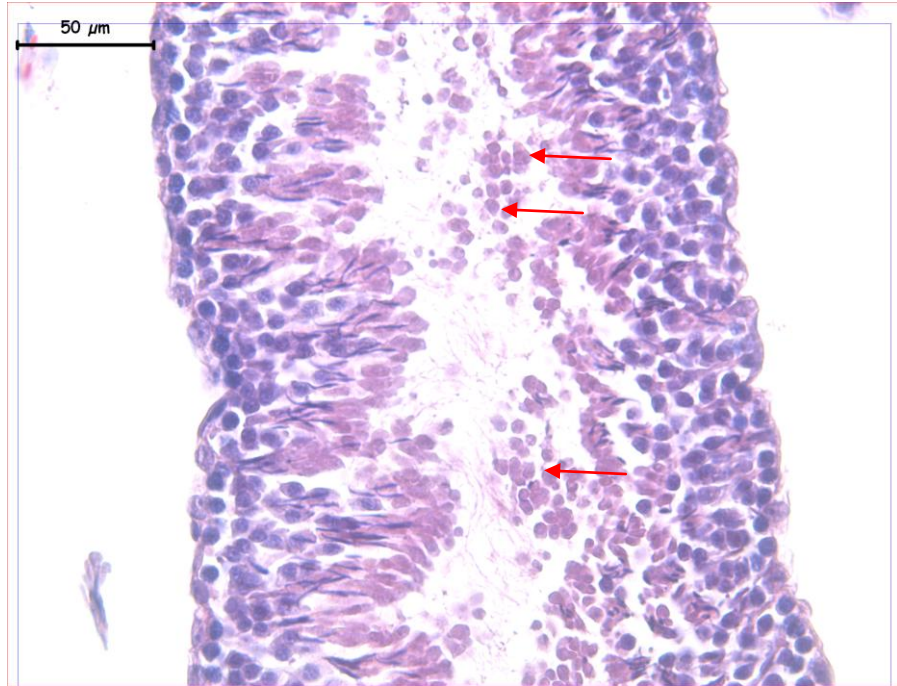
Fotoğraf 3. Yalın L-carnitin grubundan alınan testis doku örnekleri kontrol grubunda olduğu gibi normal görünümdeydi. H&E



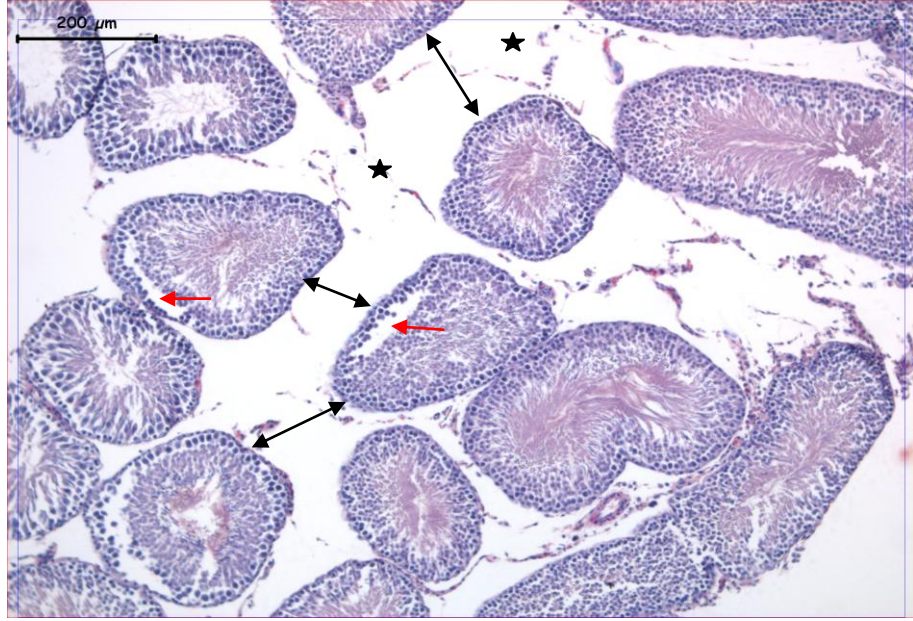
Fotoğraf 4. Yalın L-carnitin grubunda normal görünümde seminifer tübüller (ST) ve germ hücre serileri (siyah ok). H&E



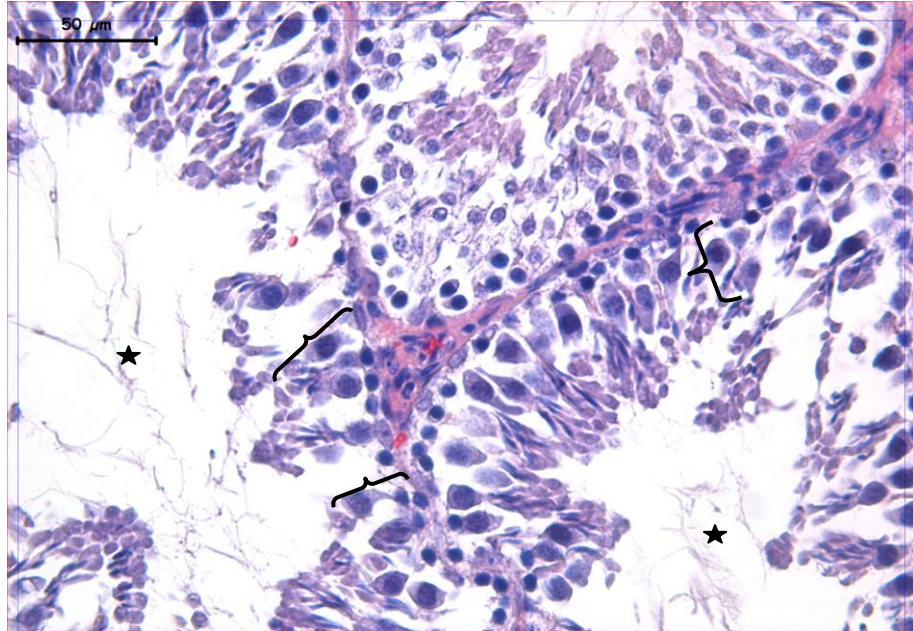
Fotoğraf 5. Yalın cisplatin grubundan elde edilen testis dokularında periferik dejenerasyon ve seminifer tübüllerde germ hücre deskuamasyonu (yıldız). H&E



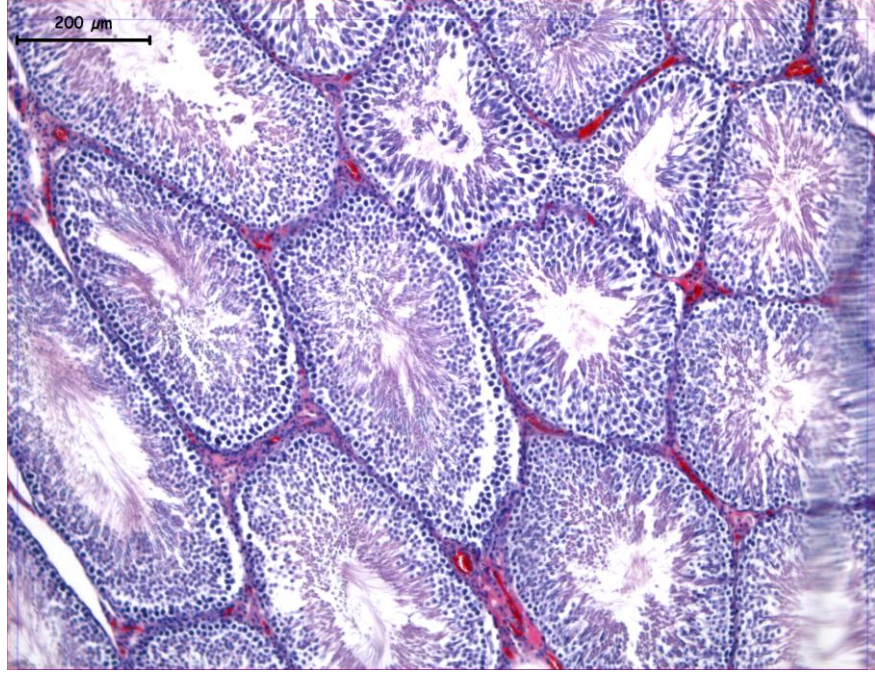
Fotoğraf 6. Yalın cisplatin grubundaki seminifer tübüllerde germinal desquamasyon (kırmızı oklar) H&E



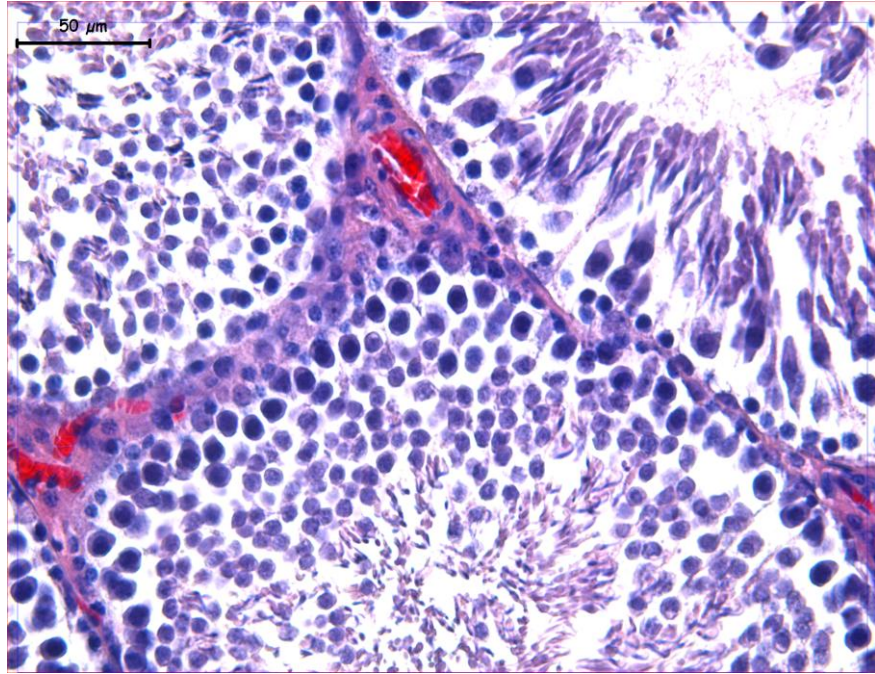
Fotoğraf 7. Yalın cisplatin grubundaki testislerde merkezi ödem (yıldız) ve tübül çapındaki azalma nedeniyle birbirlerinden uzaklaşmış seminifer tübüller (siyah ok), bağlantı birimlerinin dejenerasyonuna bağlı olarak germ hücrelerinin bazal membrandan uzaklaşması (kırmızı ok). H&E



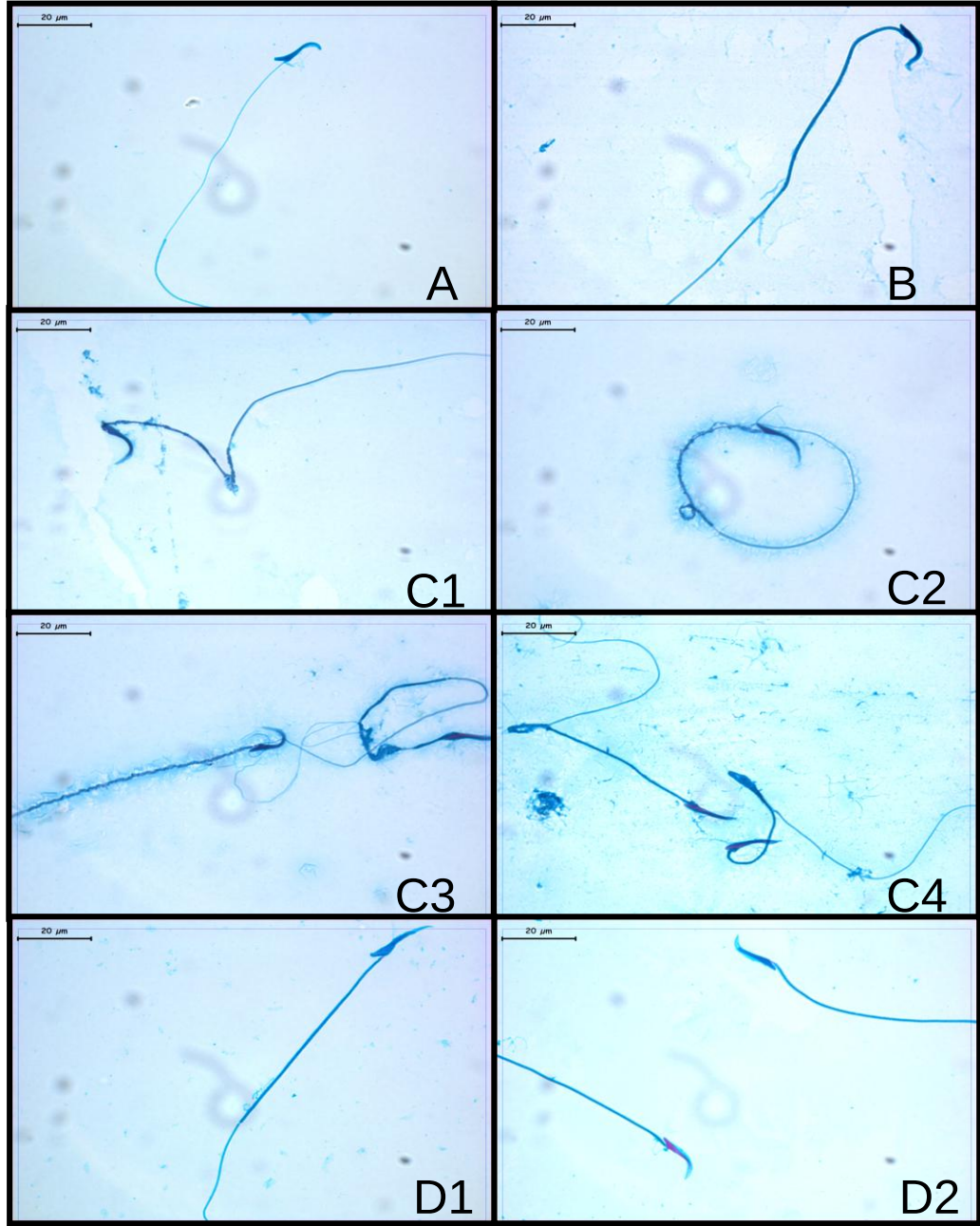
Fotoğraf 8. Yalın cisplatin grubundaki seminifer tübüllerde germinal hücre katmanında azalma (siyah ok) ve lümende genişleme (yıldız). H&E



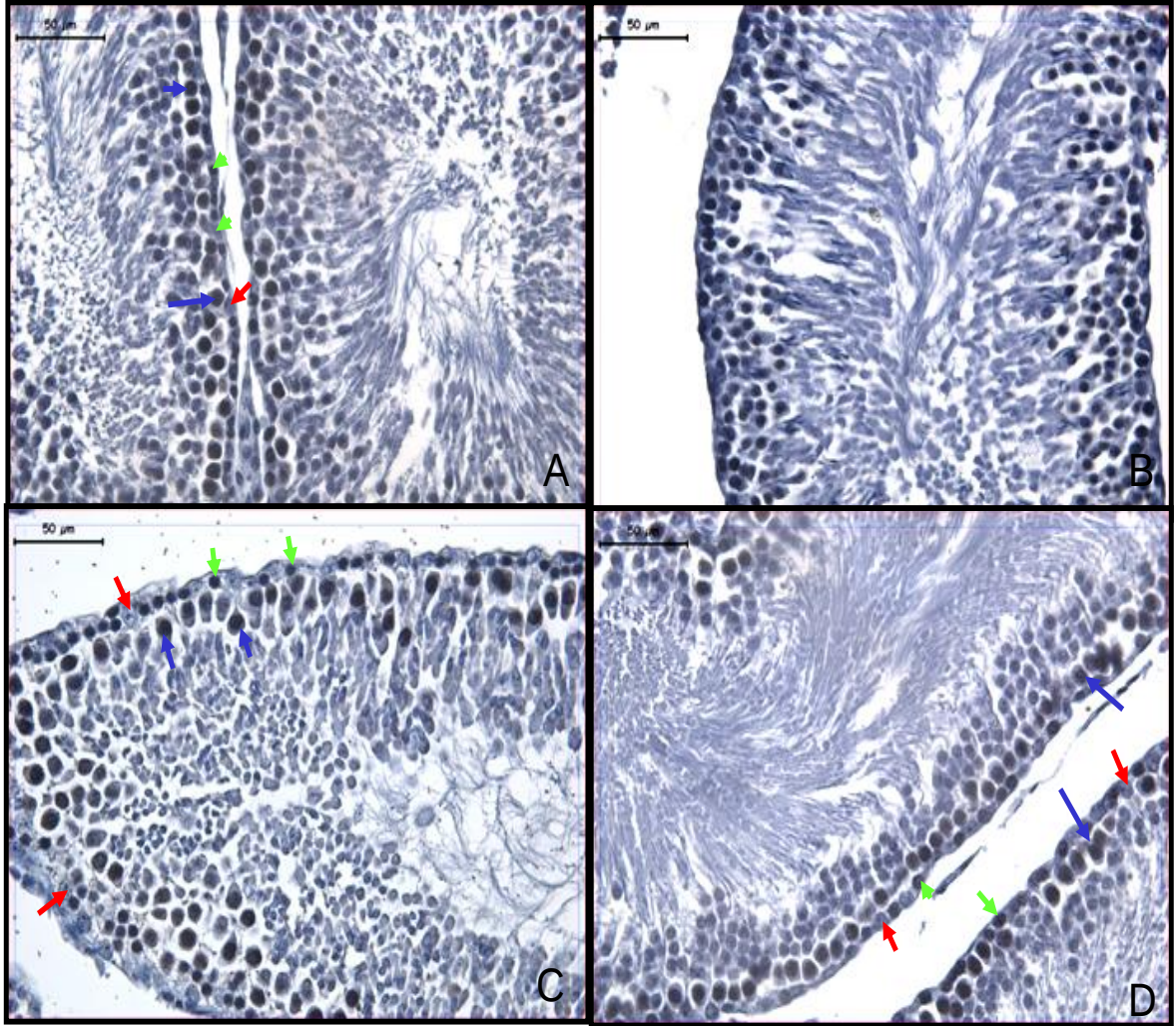
Fotoğraf 9. L-carnitin+cisplatin grubu testis doku örneklerindeki bulgular kontrol ve yalın L-carnitin grubu ile benzer görünümde. H&E



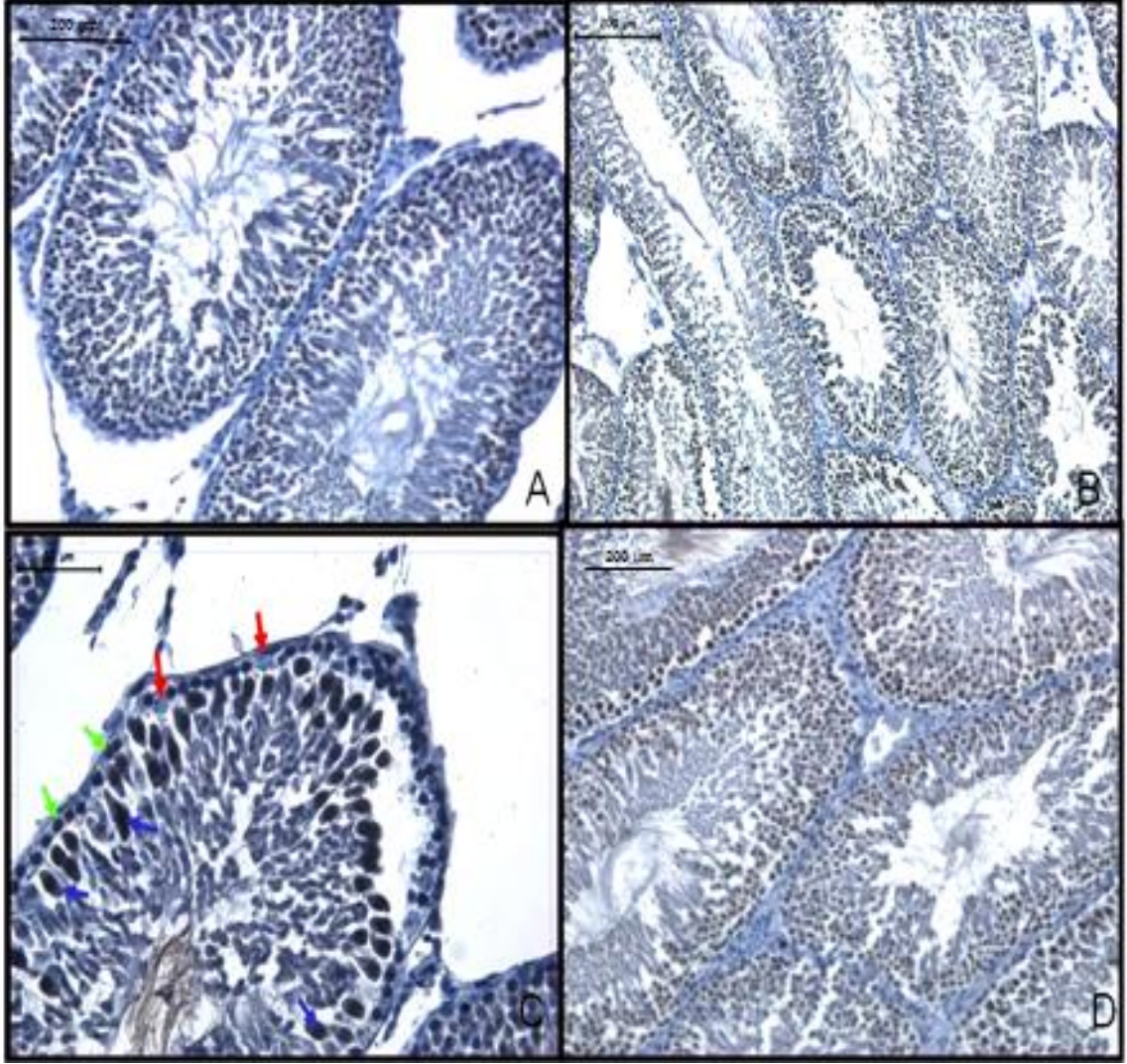
Fotoğraf 10. L-carnitin+cisplatin grubunda germ hücre desquamasyonu, germinal epitelin bazal membrandan uzaklaşması, lümen genişlemesi, periferik ve merkezi intersitisyel ödem gözlenmedi. H&E



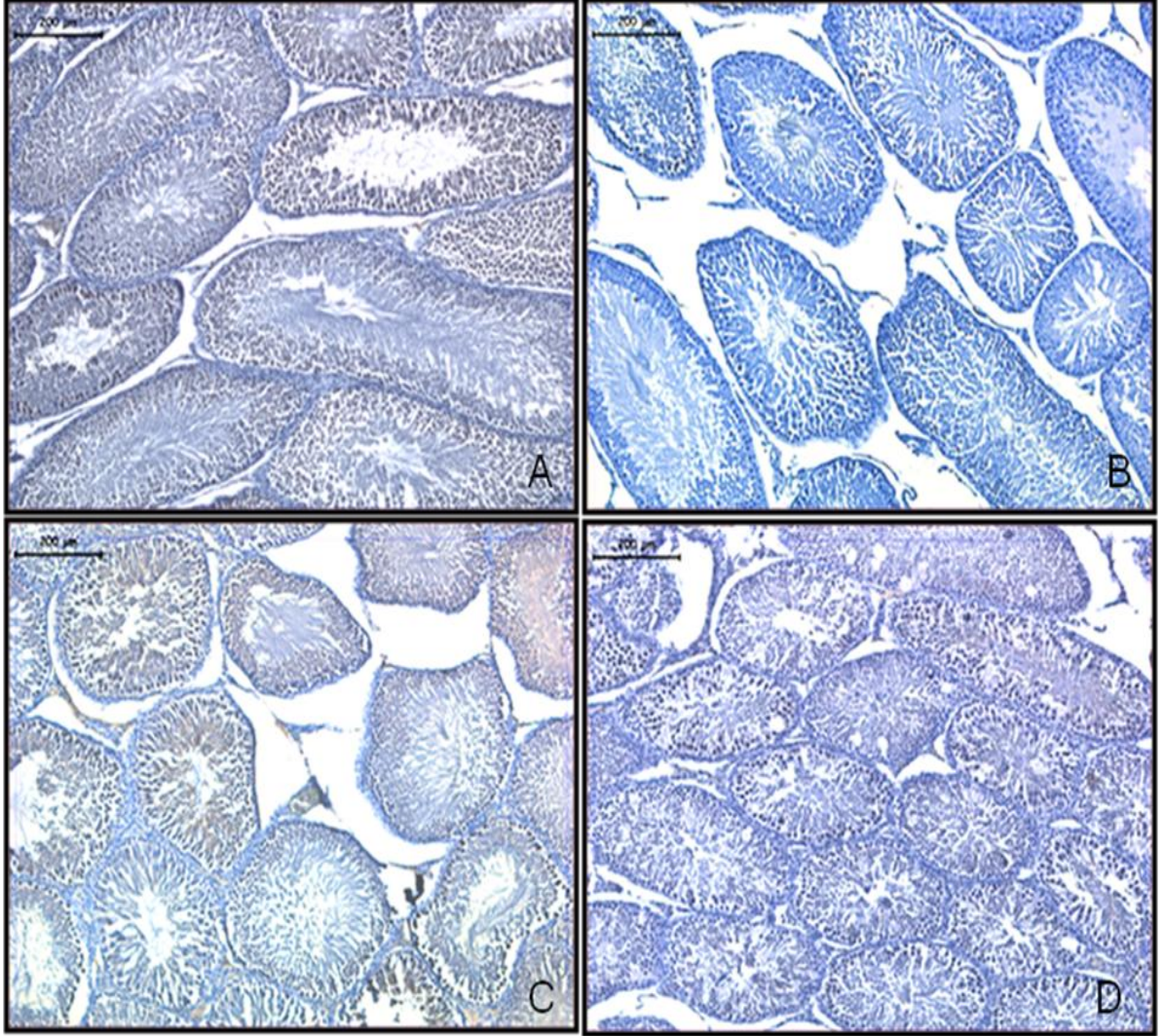
Fotoğraf 11. TESE uygulaması sonucu KRUGER tekniği uygulanan spermiyum örnekleri. A-B: Kontrol ve L-Carnitin gruplarında normal spermiyumlar, C: cisplatin grubu; C1: bükülmüş başlı (bend head) spermiyum, C2: orta parça anomalisi olan kement benzeri (lasso-like) spermiyum, C3: orta parça (midpeace) anomalisi olan spermiyum, C4: dönük orta parçaya sahip (looping midpeace) spermiyumlar, D1 ve D2: L-carnitin + cisplatin grubunda normal görünümde spermiyumlar.



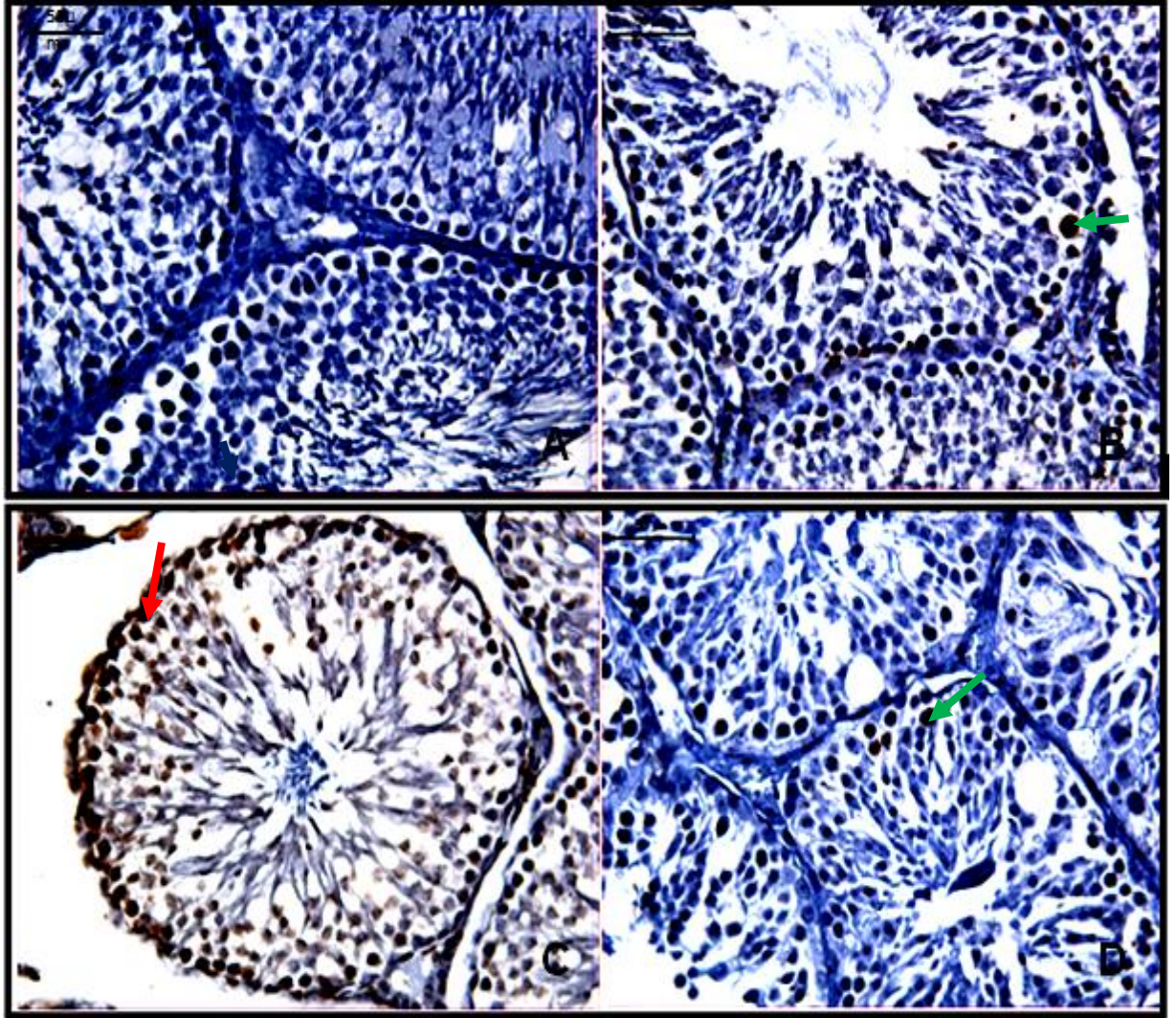
Fotoğraf 12. Kaspaz 9 immünişaretleme yapılan gruplar: (A) Kontrol grubu ve (B) yalın L-carnitin grubunda immün pozitif hücre gözlenmedi.(C) cisplatin grubunda ise immünreaksiyon göstermeyen Sertoli hücreleri (kırmızı oklar), pozitif reaksiyon gösteren spermatogoniumlar (yeşil oklar) ve spermatosit I' ler (mavi oklar), (D) L-carnitin+Cisplatin grubunda ise pozitif tutulum sadece spermatosit I' lerde gözlemlendi. (DAB&Hematoksilen)



Fotoğraf 13. Kaspaz 8 immünişaretleme yapılan gruplar: (A) Kontrol grubu ve (B) yalın L-carnitin grubunda immün pozitif hücre gözlenmedi. (C) Cisplatin grubunda ise immünreaksiyon göstermeyen Sertoli hücreleri (kırmızı oklar), spermatogoniumlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyon gösteren spermatosit I' ler (mavi oklar) gözlemlendi. (D) L-carnitin+cisplatin grubunun kontrol ve L-karnitin gruplarına eşteş olduğu görüldü. (DAB&Hematoksilen)



Fotoğraf 14. Aktif Kaspaz 3 immünreaktivitesi tüm gruplarda negatif olarak gözlemlendi. (DAB&Hematoksilen)



Fotoğraf 15. TUNEL yöntemi uygulanan gruplar: (A) Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücre gözlenmedi. (B) yalın L-carnitin grubunda primer spermatositlerde (yeşil ok) TUNEL pozitif hücre gözlemlendi. (C) Cisplatin grubunda spermatagonia (mavi ok) ve primer spermatositlerde (kırmızı ok) TUNEL pozitif hücreler gözlemlendi. (D) L-carnitin+cisplatin grubunda ise, TUNEL pozitif hücrelerin sayısında azalma olduğu gözlemlendi. (DAB&Hematoksilen)

5. TARTIŞMA

Gonadotoksinler erkeklerde görülen infertilitenin önemli nedenlerindendir. Gonadotoksinler zararlı etkilerini testisteki germ hücrelerini doğrudan etkileyerek veya destek sağlayan Sertoli hücre işlevlerini baskılayarak yaparlar.¹⁰⁷

Spermatogenetik hücreler kemoterapötik ilaçların zararlı etkilerine çok duyarlıdır. Kök hücre topluluğunda onarılamayan hasara yol açarak kalıcı infertiliteye yol açabilirler. En duyarlı hücreler aktif bölünen spermatogonia ve pre-leptoten fazına kadar ki spermatositlerdir. Kemoterapötik ajanlardan en gonadotoksik olanları alkilleyiciler (siklofosfamid, mustin, klorambusil, melfelan, busulfan, lamustin, karmustin), antimetabolitler (sitarabin), vinka alkaloidler(vinblastin) ve diğerleri (prokarbazine, cisplatin, nitrojen mustart) olarak bilinir. ² Spermatogenezisdeki bozulmanın ciddiyeti ve düzelebilirliği ajanların yapısına, toplam dozuna ve tedavi şekline bağlıdır. ^{107,121}

Alkilleyici ajanların ve prokarbazinin testiküler hasar yaptığı saptanmıştır. Siklofosfamid içeren birden fazla kemoteropik ajanın bulunduğu ilaçlarla tedavi sonrasında hastaların %35 -100'ünde uzun süreli azospermi görülmüştür. Spermatogenezisin tekrar normale dönmesinin ortalama 2 yıl sürdüğü gözlenmiştir. Birden fazla kemoterapötik ajanla tedavi edilen testis kanserli hastalarda %17-68 arasında değişen uzun süreli azospermi görülmektedir. Testiküler kanserli hastalarda %25 oranında spermatogenik defekt tespit edilmiştir. Testis tümörlü hastaların kemoterapi sonrası gebe bırakma oranları % 13-31 arasında olduğu belirtilmiştir. ^{107,120,121}

Kemoterapinin testislerin endokrin işlevi üzerine etkileri tartışmalıdır. Sertoli ve Leydig hücrelerinin nispeten yavaş bölünen hücreler olduğu ve kemoterapi ilaçlarının etkilerine dirençli oldukları bildirilmektedir. Leydig hücreleri dirençli olmasına rağmen tedavi sonrasında disfonksiyon olduğu, LH seviyelerinde yükselme ve testosteron düzeylerinde düşme görüldüğü saptanmıştır. Kemoterapi tedavisini takiben oluşan en sık hormonal değişiklik FSH yükselmesidir. Serum FSH seviyeleri tedavi sonrası spermatogenezin takibinde bir göstergedir.^{107,108,109,110,124}

Testis kanseri için verilen kemoterapinin spermatogenez ve Leydig hücre işlevleri üzerinde akut etkileri vardır; kemoterapi germinal epiteli direkt olarak etkilemektedir ve Leydig hücre yetersizliği sık görülmektedir. Hastaların büyük çoğunluğu tedaviyi izleyen ilk 12 ay süresinde yükselmiş serum gonadotropin düzeyleri ile beraber azospermi gözlenir. Bu toksik etkiler çoğu hastada geri dönüşlüdür, bununla beraber yaklaşık %50' sinde tedaviden sonraki 2 yıl içinde spermatogenez ve Leydig hücre işlevlerinin düzeldiği görülmüştür. Spermatogenezin düzelme ihtimalini azaltan bazı faktörler vardır; bunlar 30 yaşın üzerinde olmak, tedavi süresinin 6 aydan uzun sürmesi ve abdominal radyoterapi almış olmaktır. Kemoterapi sonrası persistan oligospermi, anormal formlar ve motilite bozukluğu bildirilmiştir.^{107,110,111,112,124}

Roth ve arkadaşlarının 229 hastayı içeren retrospektif çalışmasında, sadece kemoterapiyle tedavi edilen hastaların en az 1/3'ünün sağlıklı çocuk sahibi olduğunu belirtmişlerdir.¹¹⁴

Platin içerikli ilaçlar; ovarian, testiküler, akciğer ve karaciğerdeki solid tümör tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle testis kanserinin kemoterapisinde 1970' lerde Cisplatin' in kullanıma girmesi en önemli aşamayı oluşturmaktadır.^{107,113,124}

Bohlen ve arkadaşları yüksek riskli evre I germ hücreli tümörü olan hastalara uygulanan 2 siklus cisplatin bazlı kemoterapinin fertilite ve seksüel işlevleri olumsuz etkilemediğini bildirmişlerdir.¹¹⁵

Lampe ve arkadaşları 170 hasta ile yaptıkları çalışmalarında, orşiyektomi ve cisplatin bazlı kemoterapi sonrasında spermatogenezis ihtimalinin 2 yıl içinde %48' e, 5 yıl içinde ise %80' e yükseldiğini bildirmişlerdir.¹¹⁶

Buna karşın bir çok çalışmada cisplatinin spermatotoksik olduğu bildirilmiştir. Leydig hücrelerine olası direkt etkisinden dolayı cisplatin kullanımı serum testosteron seviyelerinde azalmaya yol açmaktadır. Cisplatin bazlı kemoterapide hastaların çoğunda azospermi gözlemlendiği, fakat bunların çoğunda spermatogenezisin 4 yıl içinde geri döndüğü gösterilmiştir.¹¹⁷

X. Zhang ve arkadaşlarının Balb/c fareler ile yaptıkları çalışmalarında, uyguladıkları cisplatin sonrasında germ hücrelerinde doza bağlı olarak apoptozisin indüklendiğini bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada cisplatinin spermatogenik serideki hücrelerin olgunlaşma süreçlerini etkilediği, spermatogenezisi azalttığı ve azospermiye sebep olarak fertiliteyi etkilediklerini gözlemlemişlerdir.¹³

Oldukça geniş kullanım alanına sahip olan cisplatin; ürogenital sistem kanserleri, santral sinir sistemi tümörleri, ilerlemiş yumurtalık kanserleri, nonseminomatöz testis tümörleri, mesane, prostat, serviks, özafagus, meme ve baş-boyun kanserleri gibi erişkin çağda görülen bir çok kanser türünün yanı sıra, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastoma, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün de tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁶²

Cisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurarak, güçlü antitümöral aktivite göstererek tedavi edici etkisi bulunmaktadır. Ancak bu ilaçlar, normal hücre ile tümör hücreleri arasındaki yapısal benzerlikten dolayı normal hücrelerin de kemoterapi ile hasarlanmasına neden olmaktadır. Gonadotoksisite, nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi sık görülen ve istenmeyen, doz sınırlayıcı yan etkileri belirtilmiştir.^{66,67}

Cisplatin hücre içerisine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek hücrede apoptoz, nekroz, oksidatif stres, fibrojeniz, inflamasyon, hipoksi ve mitokondriyal hasara yol açarak sitotoksik etki gösterir.¹¹⁸

Apoptoz normal ve patolojik süreçlerde hücre ölümünün önemli bir yoludur. Hücre ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrinsik yolak, mitokondri üzerinden işleyen intrinsik yolak ve endoplazmik retikulum (ER)- stres yolağı apoptozisteki başlıca yolaklardır. Ekstrinsik yolağın aktivasyonu ile aktive hale gelen kaspaz 8, mitokondriyal sitoplazmaya sitokrom c salınımını aktive eder ve bir dizi etkileşim sonucu

kaspaz 9 aktive hale gelir. Kaspaz 8 ve 9 apopitozda kritik bir role sahip olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozisin geri dönüşümsüz olarak başlamasına neden olur.^{119,133}

Kaspaz-3, aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir. Kaspazlara karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak, sitoplazmik kaspaz ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, apopitozisin tespitinde sık kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. TUNEL yöntemi ise apoptozis tayininde kullanılan bir diğer yöntemdir. Apoptozisin karakteristiği olan DNA fragmatasyonunun, TUNEL yöntemi ile gösterilmeye başlanması, toksisite çalışmalarında bu tekniğin kullanılmasını sağlamıştır. TUNEL apoptozisin erken aşamasındaki apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlayan özel bir yöntemdir.

Bizde çalışmamızda, bu bilgiler ışığında literatürle uyumlu olarak cisplatin gonadotoksitesinde kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesini immünohistokimyasal olarak inceledik. Bunun yanı sıra, apoptozisin en önemli özelliklerinden biri DNA parçalanması olduğu için, endonükleazlarca internükleozomal birimlerin ayrılması sonucu gerçekleşen DNA parçalanmasını, çalışmamızda histokimyasal olarak TUNEL (Terminal deoxynükleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) yöntemi ile gösterdik.

Toksisiteye bağlı erkek infertilitesinin patogenezinde oksidatif stresin önemi kanıtlandıktan sonra, antioksidanların bu alanda koruyucu amaçlı kullanımını ile çok sayıda çalışma dizayn edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda, seminal plazmanın serbest radikal süpürücü kapasitesini

arttırmaya yönelik antioksidan desteği yapılmış ve üreme sistemi üzerine faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir.⁹²

Serbest oksijen radikallerinin hasar yapıcı özelliklerine karşı hücreler doğal olarak oksidatif hasarı azaltmaya veya sınırlamaya yeteneklidirler. Bu hücre koruyucu mekanizmalar oksijen radikallerini gidermek ve detoksifiye etmek üzere düzenlenmiş birkaç enzim sistemini içerir. Ancak bu savunma sistemleri yetersiz kalınca, serbest oksijen radikalleri zararlı etkiler yapabilirler. Serbest oksijen radikali temizleyicilerinin deneysel ve klinik kullanımının etkinliğini gösteren çalışmalardan özellikle önemi anlaşılan antioksidanlar son zamanlarda en yaygın yapılan çalışmalar arasına girmiştir.^{88,91,93}

Assayed ve arkadaşlarının Wistar türü sıçanlarla yaptığı çalışmada, sentetik böcek zehiri olan cypermethrin (CYP)'nin testisteki toksikolojik özellikleri ve infertilite parametreleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Aynı çalışmada doğal elementlerden sarımsak özütünün (GRE) ve C vitamini (VTC) 'nin böcek ilacı toksisitesine karşı koruyucu özelliklerini de incelenmiştir. CYP sonrası testis dokusu Ateşşahin ve arkadaşlarının ve Lirdi ve arkadaşlarının cisplatin ile yaptığı çalışmalardaki bulgulara eş değer bulgular elde etmişlerdir. Sonuç olarak CYP' nin erkek üreme işlevlerini olumsuz etkilediği saptanmıştır. Bu olumsuzluklar anormal spermatozoal parametreleri ve testis dokusunda histopatolojik değişiklikler olarak gözlenmiştir. . Diğer bir sonuçta GRE ve VTC 'nin koruyucu ve iyileştirici etkisinin açıkça gözlemlendiğidir. Bu elementlerin CYP'nin toksikolojik etkisine karşı yalnız verilmesi yada kombinasyon halinde verilmesi sonucunda sarımsak özütünün böcek zehirinin toksisitesine karşı, vitamin C'den koruyucu özelliğinin daha fazla

olduğu saptanmıştır. Ayrıca her iki doğal maddenin birlikte verilmesinin, ayrı ayrı verilmesine karşı daha avantajlı olduğu belirtilmiştir.¹³⁶

Bizde çalışmamızda antioksidan özelliği olduğu bilinen L-carnitin'in testis üzerine etkisini araştırdık.

Bir çalışmada L-carnitin yüklemesinin periferik kanda lenfosit proliferasyonunu arttırdığı ve periferik kan lenfositlerini hücreler tarafından açığa çıkarılan oksidatif strese koruduğu gösterilmiştir.¹²¹

Monti ve arkadaşları insan lenfositlerini in vitro olarak H₂O₂ ile inkübe etmişler, daha sonra ortama L-carnitin eklemişler ve L-carnitin'in hücreleri reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasardan koruduğunu bulmuşlardır.¹²² L-propiyonal karnitin miyokardı, endoteli ve eritrositleri peroksidatif hasarlanmadan koruduğunu, hasarlanmış hücre membranını stabilize ettiğini ve MDA düzeyinin düştüğünü bulan çalışmalarda bulunmaktadır.¹²³

L-Carnitin'in, serbest radikal kaynaklı mitokondrial ve nükleer DNA hasarına karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir. L-carnitin'in yaşlı ratlarda oksidan üretimini azaltmak ve antioksidan durumunu arttırmak suretiyle, yaşlanma esnasında oluşan oksidatif stres aracılı DNA hasarını indirgeyerek mitokondriyal işlevleri iyileştirdiği gösterilmiştir.¹⁰⁵

Ishii ve arkadaşları 2000 yılında L-asetil karnitin ilavesinin kültüre edilmiş nöronlarda DNA fragmentasyonu ve nükleer kondansasyonu azalttığını bildirmişlerdir.¹²⁵

Sundaram ve arkadaşları ise yaşlı ratların iskelet kaslarında artmış olan DNA tek zincir kırıklarının L-carnitin uygulaması ile azaltılabileceğini göstermişlerdir. Bunların yanı sıra son çalışmalar ile L-carnitin, DNA onarıcı enzim poly (ADP-ribozil) polimeraz'ın aktivitesini arttırdığını gösterilmiştir.¹²⁶

İnfertil hastaların seminal sıvısında L-carnitin konsantrasyonunun azaldığı ve ekzojen L-carnitin tedavisiyle sperm canlılığının, sperm motilitesinin ve spontan gebelik oranının arttırıldığını gösteren çalışmalar temel alınarak, son zamanlarda erkek infertilitesinin tedavisinde L-carnitin ve türevlerinin kullanılarak tedavi edilmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.^{104,105,106}

Zohre Zare ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada, L- carnitinle muamele edilen farelerde vücut ve testis ağırlıkları testis dokusu, sayımı, motilitisi, viabilitisi ve epididimal spermin kromatin kalitesi, testisin her gramında testiküler spermatid sayısı (TSN) ve günlük sperm üretimi (DSP) araştırılmıştır. Bu çalışmada olgun NMRI fareler kullanılmıştır. Deney sonucunda sperm morfolojisi papanicula boyamasıyla incelenmiştir.Sperm kromatin kalitesi aniline-blue boyamasıyla incelenmiş. Sol testis Bouins solüsyonunda histolojik deney için fiske edilmiş ve H&E ile boyanmış. Sonuç olarak L-carnitin uygulanan normospermi hayvanlarda vücut ağırlığında anlamlı derecede azalma gözlenmiş. ($p < 0.05$). Kromatin kalitesinde ise artış indüklemiştir ($p < 0.05$). Diğer gruplarda ise incelenen parametrelerde anlamlı bir değişiklik

gözlenmemiştir. Bu sonuçlar normal spermatogenezisli farelere L karnitinin oral uygulanmasının üreme sistemine anlamlı etkisi olduğunu göstermektedir.¹⁴⁴

Bizde çalışmamızda, testisler üzerinde L-carnitin etkisi ve cisplatinin yol açtığı etkilere karşın L-carnitin'in sperm morfolojisine, seminifer tübüle ve spermatogenik hücrelere olan koruyucu etkisini inceledik.

Spermatozoa normal metabolik aktivitesi sırasında ROS üretir. ROS insan spermatozoasının patofizyolojisinde önemli rol oynar. Bundan dolayı oksidatif stres insan infertilitesinde majör faktör olarak görülür. İnfertil erkeklerin seminal ROS seviyeleri büyük oranda yüksektir. Spermatozoa ve seminal plazma yüksek oranda ROS temizleyicileri, Süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri içermektedir. Bununla birlikte spermatozoa ve seminal plazmada farklı antioksidan aktivite gösteren, Tokoferol, askorbik asid ve karnitin gibi maddeler de vardır. Bundan dolayı birçok infertil erkek böyle vitaminler ve vitamin benzeri maddelerle tedavi edilmektedir.^{92,121,124}

En fazla L-carnitin konsantrasyonu epididimal sıvı içerisinde olup sirkülasyondaki kandan 2000 kez daha fazladır. Yapılan çalışmalar epididim içindeki L-carnitin'in spermatozoa maturasyonunda rolü olduğunu göstermiştir.^{104,105}

Bizim çalışmamızda da karnitin ile tedavi ettiğimiz gruplarda, spermatogenetik hücrelerin bütün serileri (spermatogonia, primer

spermatosit, sekonder spermatosit ve spermium) izlendi. Çalışmamızda, spermatogoniumlara ait apoptotik değişikliklerin L-carnitin tedavisi ile azaldığı görüldü.

Costa ve arkadaşları L-carnitinin hem kantitatif hem de kalitatif olarak sperm motilitesini arttırdığını ve sperm morfolojisinin düzgün olduğunu göstermişlerdir.¹²⁷

Claudette Jeulin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada memelilerin olgun spermatazoalarının L- carnitin ve serbest L-carnitini almasındaki önemi açıklanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada ökaryotik hücre metabolizmasında serbest L-carnitin ve carnitin esterlerinin görevleri farklı bir bakış açısıyla desteklenmiştir. Yine aynı çalışmada hücrelerel organeller de spesifik carnitin açıltransferazın, yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasındaki ve açıl koenzim A (Co-A) 'nın ayarlanmasındaki görevi incelenmiştir. Memelilerde serbest L-carnitin kan yoluyla alındığı ve epididimal lümende yoğunlaştığı belirtilmiştir.¹³⁷

Topcu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmaya göre Gama radyasyonu uygulamasını takiben L-carnitinin germ-hücre azalmasını minimize ettiği belirtilmiştir. Ayrıca L-carnitinin rat testislerinde hücrelerin morfolojik hasarlarını azalttığı belirtilmiştir. Morfolojik analizlerde Gama radyasyonu uygulanmış testislerde germ hücrelerinde düzensizlik ve azalma, spermatogeneziste duraksama ve germinal epitelde vakuolizasyon gözlenmişken, L-carnitin uygulamasından sonra radyoterapinin neden olduğu hasara karşı koruyucu olduğu saptanmıştır.¹³⁸

Antikanserojen ajanların pek çoğu, oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak, çeşitli organ ve dokularda toksisiteye neden olmaktadırlar.^{128,129}

Cisplatin toksisitesine karşı pek çok stratejiler geliştirilmiş, es zamanlı olarak koruyucu ajan takviyesiyle cisplatinin yan etkilerini önleyici pek çok çalışma yapılmıştır.¹³⁰

Aleise ve arkadaşları L-carnitin ile cisplatine bağlı nefrotoksosite arasındaki ilişkiyi toplam 40 rattan oluşan denek grubunda araştırdıkları çalışmada; cisplatin sonrası böbrek dokusunda total nitrat\nitrit düzeylerinde artış, total karnitin düzeylerinde ise azalma olduğunu, L-carnitin uygulanması ile cisplatine bağlı gelişen glomeruler ve tubuler hasarlanmada istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelme olduğunu bildirmişlerdir.¹³¹

Srivastava ve arkadaşlarının çalışmada, cisplatin tedavisi sonrası nitrik oksit sentaz artışı ile beraber serum üre ve kreatinin düzeylerinin ve hedef organlardaki lipid peroksidasyonunun önemli ölçüde arttığını, bu durumun nitrik oksit sentaz enzim inhibitörü tarafından önlendiğini bildirmişlerdir.¹³²

Bizde çalışmamızda sıçanlar üzerinde cisplatinin gonadotoksik etkilerinin L-carnitin ile tedavi olup olmadığını belirlemek amacı ile araştırmamızı bu yönde yaptık.

Ateşşahin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada cisplatin indüksiyonu ile oluşturdukları toksisiteye karşı melatoninin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Cisplatin uygulanan gruplarda sperm konsantrasyonunda azalma, sperm motilitesinde azalma, abnormal sperm oranında artış bulmuşlardır. Cisplatin uygulanan sıçanların seminifer epitelinde incelme, seminifer çapında azalma, germinal epitelde desquamasyon sonucu lümende germinal hücre döküntüleri görülmüş ve interstisyel alanda ödem gözlenmiştir.¹³⁴

Yine aynı çalışmada cisplatin gruplarında lipid peroksidasyonunda artış olduğu, GSH-Px aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Cisplatin verilmiş sıçanlara uygulanan melatonin sonrasında ise GSH-Px antioksidan savunma sisteminde artış olduğu, oluşan reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu rol oynadığı, abnormal sperm oranında azalma olduğu, sperm motilitesinde, epididimal sperm konsantrasyonunda cisplatin grubuna göre artış olduğu, interstisyel ödemin ise azalmış olduğu bulunmuştur.¹³⁴ Bizim yaptığımız çalışmada cisplatin uygulanan sıçanlarda aynı bulgular elde edilmiştir.

Lirdi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise cisplatin uygulanan sıçanlarda amifostinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Cisplatin uygulanan gruplarda tübül çapının azaldığı, interstisyel ödemin arttığı, lenfatik alan hacminin arttığı, abnormal morfolojiye sahip spermiyumların olduğu gözlenmiştir. Abnormal nükleer morfolojiye sahip hücrelerin TUNEL yöntemi uygulanarak TUNEL pozitif hücrelerin artmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Seminifer epitelin dejenere olduğu, lümende hücresel debrislerin olduğu, germinal hücrelerin periferinde fragmente ve kondanse kromatinlerin olduğu, germinal hücre katmanında azalma olduğu, tübül duvarının incelmesi, spermatogoniumların ve primer spermatositlerin

TUNEL pozitif olduğu, túbül duvarında kalan spermatogoniumların, dev (giant) spermatogonium formunda olduğu belirtilmiştir.¹³⁵ Bizim çalışmamızda cisplatin uygulanan sıçanlarda aynı bulgular elde edilmiştir ve cisplatin grubunda TUNEL pozitif hücrelerin fazlalığı dikkati çekmiştir.

Yine aynı çalışmada cisplatin sonrası uygulanan amifostin sonrası, lenfatik doku hacminin azaldığı, semnifer epitel kalınlığının artmış olduğu, seminifer çapında artma olduğu, abnormal nükleer morfolojideki hücrelerde azalma olması bununla birlikte TUNEL pozitif hücrelerin oranında azalma olduğu, interstisyel ödemde azalma olduğu bu sebeple cisplatin sonrası tedavi edici olduğu belirtilmiştir.¹³⁵

Yaptığımız çalışmada literatürde yapılmış benzer çalışmalara benzer sonuçların elde edildiği, cisplatin sonrası uygulanan ekzojen antioksidan olan L-carnitinin tedavi edici özelliği olduğu ve cisplatin grubunda gözlenen hasarın, L-carnitin+cisplatin grubunda gözlenmediği L-carnitin ve Kontrol grupları ile eşdeş olduğu bulunmuştur.

Günümüzde kemoterapi alan kanser hastalarında kemoterapinin etkilerinden korunabilmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Gonadotoksik etkiye sebep olduğu bilinen pek çok maddenin antioksidan destekli tedavi ile kullanılması oluşabilecek yan etkilere ve infertilite sorunlarına karşı koruyucu role sahip olduğu kanısını doğurmaktadır.

6. SONUÇ

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde ratların ağırlık ölçümleri yapıldı. Deney sonu ağırlıklarına bakıldığında kontrol grubunda anlamlı bir artış gözlenirken, L-carnitin, Cisplatin, L-carnitin+Cisplatin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Deneysel cisplatin gonadotoksitesisi oluşturulan ratların deney öncesi ve sonrası arasındaki ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı olduğu gözlemlendi.

Histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmelerde ise Cisplatin grubu testislerde merkezi intersitisyel ödemin olduğu, germ hücre serilerinin tübül duvarından ayrılarak lümende serbest hale geldiği, bazı tübüllerin lümeninde hücrel desquamasyonun olduğu gözlemlendi. Yine aynı grupta seminifer tübül duvarında incelme sonucu lümen genişlemesi dikkati çeken bulgular oldu. Bu bulguların hiçbiri kontrol ve yalın L-carnitin gruplarında gözlenmezken, L-carnitin+cisplatin grubunda az miktarda merkezi ödem dikkati çekmekteydi.

Spermiyum morfolojileri incelendiğinde Cisplatin uygulanan grupta, bükülmüş başlı (bend head) spermiyumlar, orta parça anomalisi olan kement benzeri (lasso-like) spermiyumlar, orta parça (midpeace) anomalisi olan spermiyumlar, dönük orta parçaya sahip (looping midpeace) spermiyumlar, sitoplazmik dropletlere sahip spermiyumlar izlendi.

Cisplatinin gonadotoksik etkisinin oluşturabileceği apoptotik etkileri incelemek ve apoptozun hangi yolakla tetiklendiğini belirlemek için yapılan caspaz işaretlemesi sonucu aktive caspaz 3 uygulamasında cisplatin uygulamasının üzerinden 72 saat geçtiği için anlamlı pozitiflik saptanmadı.

Aktive caspaz 3'ün aktif caspaz 8 ve 9 kaskadını başlattığı düşünüldü. Caspas 8 ve 9 antikoru uygulamaları sonucunda ise kontrol grubu, yalın L-carnitin grubu ve L-carnitin+cisplatin gruplarında tutulum gözlenmezken, cisplatin grubunda her iki antikorda da spermatogonium ve spermatosit I'lerde kuvvetli pozitif sitoplazmik tutulum gözlemlendi. Ancak pozitif tutulum gösteren spermatogonium ve spermatosit I hücre sayıları caspaz 8 grubuna göre caspaz 9 grubunda çok daha fazla sayıda olduğu belirlendi. Bu durumda cisplatin gonadotoksitesinde apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik olarak tetiklendiği ancak caspaz 9 işaretli hücrelerin daha çok sayıda olması nedeniyle intrinsik faktörlerin daha güçlü rol oynadığını düşündürdü. Aynı zamanda DNA fragmentasyonunu belirlemek için yapılan TUNEL boyaması sonucu cisplatin uygulanan grupta TUNEL pozitif hücre sayısının fazla olması cisplatinin testis germ hücrelerinde apoptozu indüklediğini gösterdi.

Ayrıca morfolometrik olarak yapılan ölçümlerde Cisplatin grubu ratların testislerindeki tübül çaplarının kalınlığı, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı olduğu istatistiksel analizlerle belirlendi. Tübül çaplarının azaldığı ve buna paralel tübül duvar kalınlığının da azaldığı gözlemlendi. Kontrol grubu, yalın L-carnitin grubu ve L-carnitin+cisplatin gruplarında ise tübül çapları ve duvar kalınlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak cisplatinin rat testis dokusunda oluşturduğu gonadotoksik etkiler gerek histomorfolojik ve morfometrik, gerekse apoptotik olarak antioksidan etkileri bilinen L-carnitinin profilaktik olarak uygulanması ile önlendiği kanısına varıldı.

Günümüzde kemoterapi alan kanser hastalarında testiküler kök hücrelerin kemoterapinin etkilerinden korunabilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışma sonucunda, profilaktik olarak uygulanan L-carnitin'in, Cisplatin'in gonadotoksik etkisiyle oluşan apoptozu engelleyici etkisi olduğu ve bu konuda yapılacak olan araştırmalara katkı sağlayabileceği düşüncesine ulaşılmıştır.

7. ÖZET

Oldukça geniş kullanım alanına sahip olan Cisplatin; ürogenital sistem kanserleri, santral sinir sistemi tümörleri, ilerlemiş yumurtalık kanserleri, nonseminomatöz testis tümörleri, mesane, prostat, serviks, özafagus, meme ve baş-boyun kanserleri gibi erişkin çağda görülen bir çok kanser türünün yanı sıra, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastoma, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün de tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁶²

Cisplatin'in güçlü antitümöral aktivitesine rağmen, gonadotoksisite, nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi sık görülen ve istenmeyen, doz sınırlayıcı yan etkileri belirtilmiştir.^{66,67} Cisplatin hücre içerisine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek hücrede apoptoz, nekroz, oksidatif stres, fibrojeniz, inflamasyon, hipoksi ve mitokondriyal hasara yol açarak ROS üretimini artırır.¹¹⁸

Bu çalışmada cisplatin uygulanan sıçanların testis dokusunda oluşabilecek yapısal değişikliklere karşı, antioksidan özelliği olduğu bilinen L-carnitin'in koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Organların değerlendirilmesi ereğiyle dokulara histokimyasal olarak morfolometri ve histomorfoloji analizleri için hematoksilin-eosin (H&E) boyama, immünohistokimyasal olarak caspaz 3, 8, 9 ve TUNEL yöntemi uygulandı. Ayrıca TESE yöntemi ile sperm morfolojileride incelendi.

Yapılan değerlendirmelerde Cisplatin uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı olduğu, testislerde merkezi intersitisyel ödemin olduğu, germ hücre serilerinin tübül duvarından ayrılarak lümende serbest hale geldiği, bazı tübüllerin lümeninde hücrel desquamasyonun ve seminifer tübül duvarında incelme sonucu lümen genişlemesinin olduğu gözlemlendi. Sperm morfolojilerin ise anormal olduğu dikkati çekti.

L-carnitin+cisplatin grubunda ise bu bulgularda anlamlı derecede azalma olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak cisplatinin rat testis dokusunda oluşturduğu gonadotoksik etkiler gerek histomorfolojik ve morfometrik, gerekse apoptotik olarak antioksidan etkileri bilinen L-carnitin'in profilaktik olarak uygulanmasıyla önlendiği kanısına varıldı.

Günümüzde kemoterapi alan kanser hastalarında testiküler kök hücrelerin kemoterapinin etkilerinden korunabilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışma sonucunda, profilaktik olarak uygulanan L-carnitin'in, Cisplatin'in gonadotoksik etkisiyle oluşan apoptozu engelleyici etkisi olduğu ve bu konuda yapılacak olan araştırmalara katkı sağlayabileceği düşüncesine ulaşılmıştır.

8. SUMMARY

Cisplatin with a wide usage area, is used widely in the treatment of various cancer types which can be seen in the adults such as the urogenital system cancers, central nervous system tumours, advanced ovarian cancers, nonseminomatosis testis tumours, vesica urinaria, prostate, cervix, esophagus, breast and head and neck cancers as well as the various childhood tumours such as the neuroblastoma, Wilms tumour, hepatoblastoma, brain tumours, germ cell tumours, osteosarcoma.⁶²

Despite the strong antitumor activity of cisplatin, some frequently seen and unintended, dose limiting adverse effects are specified such as gonadotoxicity, nephrotoxicity and neurotoxicity.^{66,67} After cisplatin enters in the cell, it activates lots of signal conduction pathways and increases ROS production by causing apoptosis, necrosis, oxidative stress, fibrogenesis, inflammation, hypoxia and mitochondrial damage in the cell.¹¹⁸

In this study, it is aimed to evaluate the protective effects of L-carnitine which is known with its antioxidant properties, on the structural changes which can occur on the testis tissues of the cisplatin-applied rats. In order to evaluate the organs; H&E, caspase 3, 8, 9 and TUNEL methods as immunochemically are applied on the tissues for their histochemical morphometry and morphology analysis. Also their sperm morphologies are evaluated by the TESE method.

In the evaluations performed; it is observed that statistically significant weight loss is present in the Cisplatin-applied group, central

interstitial edema is present in the testis, the germ cell series are separated from the tubule wall and they are free in the lumen, in the lumen of some tubules, a cell desquamation is present, and giant spermatogonium forms are observed in some of the spermatogonia which cannot be separated from the tubule wall, lumen extension is seen as a result of the dilation on the seminiferous tubule wall, and the sperm morphologies are seen abnormally.

In the L-carnitine+cisplatin group, it is determined that a significant decrease is present in these findings.

As a result, it is decided that the gonadotoxic effects which cisplatin has formed on the rat testis tissues have prevented the antioxidant effects of the gonadotoxic effects both by morphologically and morphometrically and by apoptotically by the prophylactic application of known L-carnitine.

Today, the studies regarding to the protection of the testicular root cells of the cancer patients receiving chemotherapy against the effects of chemotherapy still continue.

As a result of this study, we think that the preventive effect of the prophylactically applied L-carnitine on the apoptosis which is formed by the gonadotoxic effect of cisplatin can contribute in the investigations performed about this subject.

9. KAYNAKLAR

1. Brooks SA, Hannah LB, Kinch C, Nash G, Kieda C. Altered cell surface glycosylation function in mechanisms of cancer cell metastasis. Anadolu University Journal of Science and Technology 2009; 10 (1): 91-101.
2. Karakurt Ö, Melli M. Antineoplastik Kemoterapinin Bireyselleştirilmesi ve Farmakogenetik. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi 2005; 15 (3):156-164.
3. Kutluk T, Kars A. Kanseri Konusunda Genel Bilgiler. Ankara: Türk Kanseri Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları; 1992.
4. Bysal A, criss w. Kanseri tanıyalım. Ankara: Hatiboğlu yayınları; 2004. s.9-13.
5. <http://www.turkkanser.org.tr>
6. Şengelen M. Türkiye’de Kanseri İstatistikleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2002.
7. Türkiye istatistik yılığı, T.C. Basbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü; 2004
8. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-3417/kanser-istatistikleri-2003-2004-2005>

- 9.** Sönmezer M, Özkavukçu S. Fertility preservation in females with malignant disease-1: causes, clinical needs and indications. *Turkish Journal of Hematol* 2009; 26:106-13.
- 10.** Sönmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004; 10; 251-66.
- 11.** Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini MD, Benedetto MR, Motta PM. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgki's disease. *Hum Reprod* 1993; 8; 2080-2.
- 12.** Clerici WJ, et. al. Direct detection of ototoxicant – induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* 1996; 98: 116 - 124.
- 13.** Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I. Cisplatin-Induced Germ Cell Apoptosis In Mouse Testes. [Systems Biology in Reproductive Medicine](#) 2001; 46, (1): 43-49.
- 14.** Rybak LP, Whitworth CA. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today* 2005; 10 (19): 1313 – 1321.
- 15.** Arockia-Rani PJ, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(10):1713–1726.
- 16.** Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, Utsumi T, Doi Y, Inoue M, Utsumi K. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1037–1046.

- 17.** Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB, Farber JL. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. J Biol Chem 1993; 268: 13791–13798.
- 18.** Furlong JH. Acetyl-L-carnitine: metabolism and applications in clinical practice. Altern Med Rev 1996; 1: 85–93.
- 19.** Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çev), 9.Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
- 20.** Hatipoğlu MT, Hatipoğlu HG. Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. 1.Baskı. Ankara: Selvi Yayınevi; 2006.
- 21.** Hatiboğlu MT. Anatomi Sözlüğü. 6.Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2005.
- 22.** Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev), 6.Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
- 23.** Coşgun A, Aras D, editörler. Anatomi-Histoloji-Embriyoloji. Nobel Tıp Kitabevi; 1998.
- 24.** Ozan H. Ozan Anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004: 304-309.
- 25.** Ekin S, Hatipoğlu GH. Tıbbi Terminoloji. 1.Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2005.

26. Seymen CM. Ehrlich Ascites Tümör Olgularında Antioksidan Uygulamasını Testis Dokusuna Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.

27. Ensari E. Gebelikte Olaylanan Deneysel Hipokside Ginkgo Biloba'nın Testis Dokusunda Olası Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.

28. Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev), 6.Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.

29. Deliktaş H. Testis Torsiyonuyla Testiste Oluşan Hasarın Onarımında L-Karnitin'in Etkinliği. Uzmanlık Tezi. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi; 2007.

30. Ata C. Erişkin Erkek Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulmuş Bor Toksisitesi Üzerinde E Vitamininin Rolü. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi; 2009.

31. Çetinkaya M. Toluene İnhalasyonuna Bağlı Olarak Sıçanlarda Testis Ve Epididimiste Meydana Gelen Yapısal Değişikliklere E Vitamininin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.

32. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001.

33. Moore KL, Agur AML. Temel Klinik Anatomi. Elhan A (Çeviri Editörü), 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.

34. Yıldırım M. İnsan Anatomisi Cilt 2. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.

- 35.** Yücel HA. Erkek Genital Sistemi. Gökmen Gövsa F (editör). Sistematik Anatomi. İzmir: İzmir Güven Kitabevi; 2003: 549-551.
- 36.** Cumhuriyet M, Yener N, Tuncel M, editörler. Temel Anatomi. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık; 2001. S:287-291.
- 37.** Dere F. Anatomi Ders Kitabı. Cilt 1-2. Adana; 1988.
- 38.** Drake RL, Vogl W. GRAY'S Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Anatomi. Yıldırım M.(Çev ed.) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı. Güneş Kitabevi; 2007.
- 39.** Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Demir R (Çeviri editörü). Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
- 40.** Ross MH, Pawlina W. Histology- A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 5. Baskı. Philadelphia: Lippincott W&W; 2006.
- 41.** Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3. Baskı. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2007.
- 42.** Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri). 10. Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006.
- 43.** Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE. NMS Histology. 1. Baskı. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.

- 44.** Akay MT. Genel Histoloji. 5. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001.
- 45.** Kalaycı Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1986.
- 46.** Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Genel Histoloji. 3.Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2008.
- 47.** Fawcett DW. Bloom And Fawcett: Concise Histology. Chapman And Hall, USA; 1997.
- 48.** Fawcett DW. Histology. Twelfth Edition. Chapman And Hall, USA; 1994.
- 49.** Tekelioğlu M. Genel Tıp Histolojisi. Beta Basım Yayım Dağıtım. Ankara; 1989.
- 50.** Young B, Heath JW. Functional Histology. Churchill Livingstone; 2000.
- 51.** Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri editörleri), Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009.
- 52.** Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 15. Baskı. Ankara: Meteksan; 2005.
- 53.** Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyoloji Bilimler Derneği (Çev). 20.Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002: 415-418.

- 54.** Bullock J, Boyle J, Wang M. Fizyoloji. Hariri N (Çeviri Editörü). 2.Baskı. İzmir: Saray Tıp Kitabevi; 1994:375.
- 55.** Barry B. Lowitz and Denniz A. Casciato. Medical Oncology & Principles of Cancer Biology.
- 56.** Yeter K. Kemoterapi Alan Hastalara Verilen Eğitimin Yaşam Kalitesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi; 2006
- 57.** Ulukaya E. Akciğer Kanseri Tanı Ve Tedavide Temel İlkeler Ve Uygulamalar Bölüm III. Engin K, Özyardımcı N (editörler).
- 58.** Cabadak H. Hücre Siklusu ve Kanseri. ADÜ Tıp Fak Der 2008; 9 (3): 51-61.
- 59.** Türker FA, Kayaalp SO. Kanseri Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar. Kayaalp SO (Editör). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji'de Ankara: Feryal Matbaacılık; 2002. s.380-415.
- 60.** Akyol H. Kemoterapinin Temel İlkeleri. Dokuz Eylül Üniv Onk Ens. 18-22 Mayıs 2004. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanseri Kongresi, Hemşire Programı.
- 61.** Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. Mol Pharmacol. 2001; 59: 657-663.
- 62.** Nozaki Y, Furubo E, Matsuno T, Fukui R, Kizawa K, Kozaki T, Sanzen T. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 6)

Two-or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. J toxicol Sci 2009; 34: 73-81.

63. Sastry J, Kellie SJ, MB BS. Severe Neurotoxicity, Ototoxicity And Nephrotoxicity Following High-Dose Cisplatin And Amifostine. Pediatric Hematology and Oncology 2005; 22: 441–445.

64. Wang D, Lippart SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov 2005; 4: 307-320.

65. Patrick J, Loehrer MD, Lawrence H, Einhorn MD. Cisplatin. Annals of Internal Medicine 1984;100:704-713.

66. Rabik CA, Dolan ME. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. Cancer Treat Rev 2007; 33(1): 9–23.

67. Kanter M, Topçu Y, Uygun M. Cisplatin Nefrotoksisitesinde E Vitamininin Koruyucu Etkileri: Işık Ve Elektron Mikroskopik Çalışma. Tıp Araştırmaları Dergisi 2007; 5 (3): 83-90.

68. Tufekci Ö, Gunes D, Özoğul C, Kolatan E, Altun Z, Yılmaz O, Aktaş S, Erbayraktar Z, Kırkım G, Mutafoğlu K, Soylu A, Şerbetçioğlu B, Güneri EA, Olgun N. Evaluation of the Effect of Acetyl L - Carnitine on Experimental Cisplatin Nephrotoxicity. Chemotherapy 2009; 55: 451–459.

69. Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Alcalde RE, Matsumura T. The role of caspase family protease, caspase-3 on cisplatin-induced apoptosis in cisplatin-resistant A431 cell line. Cancer Chemother Pharmacol 2000; 46: 241-245.

70. F. Seaman, P. Sawhney, C. J. Giammona and J. H. Richburg. Cisplatin-induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. *Apoptosis* 2003; 8: 101–108.

71. Hikim A, Lue Y, Romero M, Yen P, Wang C, Swerdloff R. Deciphering The Pathways Of Germ Cell Apoptosis İn The Testis. *Journal Of Steroid Biochemistry&Molecular Biology* 2003; 85, 175-182

72. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2008; 36 (2): 120-130.

73. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. Malatya: 2002; 9(2): 143-148.

74. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003; 23: 499-508.

75. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Archives of Pulmonary* 2003; 4: 165-174.

76. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(5):365-72.

77. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2003; 81: 802-9.

78. Zhou P, Streutker C, Brojevic R, Wang Y, Croitoru K. IL-10 Modulates İntestinal Damage and Epithelial Cell Apptosis in T Cell-Mediated Enterpathy. Am J Physil Gastrointest Liver Physiol 2007; 287, 599-604.

79. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi. Toraks Dergisi 2001; 2: 91-95.

80. Hikim A, Swerdloff R. Hormonal And Genetic Control Of Germ Cell Apoptosis İn The Testis. Reviews Of Reproduction.1999; 4,38-40

81. Doğan Ş. Seminal plazma reaktif oksijen türlerinin (ros) sperm dna fragmentasyonu ve apopitozu sürecinde infertiliteye olan etkisinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2008.

82. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: function and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64 (4): 821-846.

83. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin İvest 2005; 115 (10): 2665-2672.

84. Burger H, Nooter K, Antonius W.M. Boersma AWM, Kortland CJ, Berg VD, Stoter G. Expression Of P53, P21/Waf/Cip, Bcl-2, Bax, Bcl-X, And Bak İn Radiation-Induced Apoptosis İn Testicular Germ Cell Tumor Lines. Int J Radiation Oncology Biol Phys 1998; 41(2):415-424.

85. Daham E. Spontan Düşük Sonucu Elde Edilen İnsan Dişi Ve Erkek Fetuslerinde 2.Trimester Süresince Karaciğer Dokusunda Meydana Gelen Histolojik Değişimler, P53 Ekspresyonu Ve Apoptozis. Yüksek Lisans Tezi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2009.

86. Mastanabad MF. Kaspaz promotör Bölge Polimorfizmleri ve Ovaryum Kanseri Arasındaki İlişki. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2009.

87. Gandini L ,Lombardo F, Paoli D,Caponecchia L. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15(4):830-39.

88. Koç A. Antioksidanların Cep Telefonu İle Olusturulmuş Testiküler Apoptozis ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri. Uzmanlık Tezi. Ankara: Fatih Üniversitesi; 2008.

89. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35(4):495-516.

90. Koca N, Karadeniz F. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları Ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri, Gıda Mühendisliği Dergisi: 32-36

91. Kozluca O. Serbest Radikaller Ve Kanser, Kartal Eğitim Ve Araştırma Klinikleri.

92. Tekcan M. Oksidatif Stres-Antioksidan Sistemler Ve Testis. İnfertilite Dergisi.

- 93.** Delibaş N , Özçankaya R. Serbest Radikaller. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 1995; 2(3): 11-17.
- 94.** Çetinkaya A. Ratlarda N-Asetil Sistein ve L-Karnitin'in Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Etkileri. Yan Dal Uzmanlık Tezi. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2009.
- 95.** Odabaşı D. L-karnitin'in Rat Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Akciğer ve Endotel Hasarı Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2006.
- 96.** Arslanbaş Ü. Sisplatine bağlı karaciğer hasarında üzüm çekirdeği özütü ve esansiyel kekik yağının etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2010.
- 97.** Bieber LL. Carnitine. Annu Rev Biochem 1988; 57: 261-83.
- 98.** Matera M, Bellinghieri G, Constantino G, Santoro D, Calvani M, Savica V. History of L-carnitine: Implications for renal disease. Journal of Renal Nutrition 2003; 13 (1): 2-14.
- 99.** Arslan A. diyabetik sıçanlarda karnitinin yara iyileşmesi ve flep yaşayabilirliğine etkisi: Deneyisel çalışma. Uzmanlık tezi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi; 2010.
- 100.** Vaz FM, Wanders RAJ. Carnitine biosynthesis in mammals. Journal of Biochemistry 2002; 361: 417-429.

101. Rebouche CJ. Carnitine. Nutrition in Health and Disease. 9. Edition. 1999; 505-512.

102. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid. Toxicology. 2006; 217: 213-220.

103. Llansola M, Erceg S, Hernandez-Viadel M, Felipe V. Prevention of ammonia and glutamate neurotoxicity by carnitine: molecular mechanisms. Metab Brain Dis 2002;17: 389-97.

104. Monograph. L-carnitine. Altern Med Rev 2005; 10: 42-50.

105. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B et al. Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. Dig Dis Sci. 2006;51:488-94.

106. Yeste M, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Bonet S. A diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Pietrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. Theriogenology 2010; 73: 577-586.

107. Dohle G. Male Infertility In Cancer Patients: Review Of The Literature. International Journal Of Urology 2010; 10:11-11.

108. Agarwal A, Said TM: Oxidative stress, DNA Damage And Apoptosis In Male Infertility: A Clinical Approach. BJU Int 2005; 95: 503-507

109. Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, Thomas AJ, Sikka SC: Characterization Of Oxidative Stress Status By

Evaluation Of Reactive Oxygen Species Levels In Whole Semen And Isolated Spermatozoa. Fertil Steril 2005; 83: 800-803.

110. Aitken RJ, Baker MA: Oxidative Stress, Sperm Survival And Fertility Control. Mol Cell Endocrinol 2006; 250: 66-69.

111. Sjöëblom T, West A And Laëhdetie J. Apoptotic Response Of Spermatogenic Cells To The Germ Cell Mutagens Etoposide, Adriamycin, And Diepoxybutane. Department Of Medical Genetics And Center For Reproductive And Developmental Medicine (CREDE), University Of Turku, Turku, Finland Environmental And Molecular Mutagenesis 1998, 31:133-148.

112. Boekelheide K. Mechanisms of Toxic Damage to Spermatogenesis. Damage To Fertility By Cancer And Its Treatments.

113. Elvan O, Öz Z. Sperm Hücrelerinde Apoptoz. Zonguldak Karaelmas Üniv. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ADB Tıbbi Biyoloji, Infertilite Dergisi.

114. Roth BJ, Greist A, Kubit PS, Et Al. Cisplatinbased Combination Chemotherapy For Disseminated Germ Cell Tumors: Long-Term Follow-Up. J Clin Oncol 1988; 6:1239-47.

115. Bohlen D, Burkhard F, Mills R, Sonntag R, Et Al. Fertility And Sexual Function Following Orchiectomy And 2 Cycles Of Chemotherapy For Stage I High-Risk Nonseminomatous Germ Cell Cancer. J Urol 2001;165:441-4.

116. Lampe H, Horwich A, Norman A, Et Al. Fertility After Chemotherapy For Testicular Germ Cell Cancers. J Clin Oncol 1997;15:239-45.

117. Drasga RE, Einhorn LH, Williams SD, Et Al: Fertility After Chemotherapy For Testicular Cancer. J Clin Oncol 1983;1: 179–183.

118. Perk H, Soyupek S, Oksay T. Erkek İnfertilitesine Neden Olan Fiziksel Ajanlar, İlaçlar Ve Toksinler. Oksay Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD İnfertilite Dergisi.

119. Pabla N, Dong Z. Cisplatin Nephrotoxicity: Mechanisms And Renoprotective Strategies. Kidney Int. 2008; 73: 994-1007.

120. Thompson ST. Prevention Of Male Infertility: An Update. Urol Clin North Am 1994;21:365-76.

121. Perk H, Soyupek S, Oksay T. Erkek İnfertilitesine Neden Olan Fiziksel Ajanlar, İlaçlar Ve Toksinler. Oksay Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD İnfertilite Dergisi.

122. Monti D, Troina L, Tropea F Et All. Apoptosis Programmed Cell Death; A Role İn The Aging Process. Am J Clin Nutr 55 (6 Suppl), 1992, 1208s-1214s.

123. Ronca F, Palmieri L, Malengo S, Bertelli A, Effect Of Propionil-L-Carnitine On İnvitro Membran Alteration Of Sickle Cell Anemia Erythrocytes, Int J Tissue React. 1994, 16 (4); 187.

124. Okutur K, Demir G. Testis Tümörlerinin Sistemik Kemoterapisine Bağlı Erken Ve Geç Yan Etkiler. İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İstanbul.

125. Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-Apoptotic Effect Of Acetyl-L-Carnitine And L-Carnitine İn Primary Cultured Neurons. Jpn J Pharmacol 2000; 83:119-24.

126. Sundaram K, Panneerselvam Ks. Oxidative Stres And DNA Single Strand Breaks İn Skletetal Muscle Of Aged Rats: Role Of Carnitine And Lipoicacid. Biogerontology 2006; 7:111-8.

127. Costa M, Canale D, Filicori M Et Al: L-Carnitine İn İdiopathic Asthenozoospermia: A Multicenter Study. Andrologia, 1994, 26: 155-159.

128. Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I. Protective Effects Of Erdosteine Against Doxorubicin-İnduced Cardiomyopathy İn Rats. J Appl Toxicol 2003; 23: 71-74.

129. Fadillioglu E, Erdogan H. Effects Of Erdosteine Treatment Against Doxorubicin-İnduced Toxicity Through Erythrocyte And Plasma Oxidant/ Antioxidant Status İn Rats. Pharm Res, 2003; 47: 317-322.

130. Drasga RE, Einhorn LH, Williams SD, Et Al: Fertility After Chemotherapy For Testicular Cancer. J Clin Oncol 1983;1: 179–183.

131. Aleisa AM, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, Al-Rajeie SS, Bakheet SA, Al-Shabanah OA Et Al. Reversal Of Cisplatin-İnduced

Carnitine Deficiency And Energy Starvation By Propionyl-Lcarnitine In Rat Kidney Tissues. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007;34:1252-9.

132. Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM. Evidence For The Involvement Of Nitric Oxide In Cisplatin-Induced Toxicity In Rats. Biometals 1996; 9:139-42.

133. Shin J, Mori C, Shiota K. Involvement Of Germ Cell Apoptosis In The Induction Of Testicular Toxicity Following Hydroxyurea Treatment. Toxicology And Applied Pharmacology 1998;155: 139-149.

134. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı A, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö. Chemoprotective Effect Of Melatonin Against Cisplatin-Induced Testicular Toxicity In Rats. Journal Of Pineal Research 2006; 41: 21-27.

135. Lirdi L, Stumpp T, Cerri E, Miraglia S. Amifostin Protective Effect On Cisplatin-Treated Rat Testis. The Anatomical Record 2008; 291: 797-808.

136. Assayed M, Salem H, Khalaf A. Protective Effects Of Garlic Extract And Vitamin C Against Cypermethrin Reproductive Toxicity In Male Rats. Research Journal Of Veterinary Sciences 2008; 1 (1): 1-15.

137. Jeulin C, Lewin L. Role Of Free L-Carnitin And Acetyl-L-Carnitine In Post-Gonadal Meturation Of Mammalian Spermatozoa. Human Reproduction Update 1996; Vol: 2, No: 2 Pp. 88-102.

138. Topçu Y, Kanter M, Uzal M. Role Of L-Carnitine In The Prevention Of Seminiferous Tubules Damage Induce By Gamma

Radiation: A Light And Electron Microscopic Study. Reproductive Toxicology 2009; 83:735-746.

139. Erdemir F, Fırat F, Yusuf G. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi Ve Klinik Önemi. Turk Urol Sem 2011;2:11-7.

140. Ward M. Intracytoplasmic Sperm Injection Effects In Infertile azh Mutant Mice. Biology Of Reproduction 2005;73, 193-100.

141. Rabik C, Dolan M. Molecular Mechanisms Of Resistance and Toxicity Associated With Platinating Agents. Cancer Treat Rev. 2007; 33(1):9-23.

142. Pil P, Lippard S. Cisplatin and Related Drugs. Massachusetts Institute of Tecnology; 1997, Elsevier Science.

143. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. YYÜ VET FAK DERG: 2008; 19(1):55-63.

144. Zare z, eimani h, mohammadi m, mofid m, dashtnavard. The effect of orally administered L-carnitine on testis tissue, sperm parameters and daily sperm production in adult mice. Yakhteh medical journal; 2010: 11(4):382-389.

10. EKLER

EK 1. ETİK KURUL RAPORU



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/15
KONU:

11.02/2010

Sayın
Prof.Dr.Candan ÖZOĞUL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

"Deneyisel Cisplatin Gonadotoksitesinde Asetil L-Carnitinin Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma öneriniz Başkanlığımız evrak kayıtlarına 11.02.2010 tarih ve 29 nolu kayıt numarasıyla giriş yapmıştır.

N. Güner
Nursel GÜNER

EK 2. KATILIM SERTİFİKASI



18-28 Nisan 2011

IX. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Neslihan COŞKUN

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi
Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve
Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından,
18-28 Nisan 2011 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu IX"a katılarak,
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
Rektör

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Merkez Müdürü

Sertifika No. 2011/09-28

11. TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN başta olmak üzere yüksek lisans öğrenimim süresince hoşgörüsü ve desteği ile her zaman yanımda olan çok değerli Danışmanım Prof. Dr. M. Tahir HATİPOĞLU' na, tez çalışmalarımda desteğini benden esirgemeyen değerli Hocam Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL' a, eğitmenlik yapan hocalarım Prof. Dr. Celal ILGAZ' a, Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU' a, Doç. Dr. Çiğdem ELMAS' a, Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU' na teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve her koşulda desteklerini yanımda hissettiğim Dr. Seda Nur AKYOL'a, canım arkadaşlarım Bahar KÜÇÜKOĞLU'na, Sanem ARIK'a ve Sema KURNAZ'a,

Anabilim Dalımız asistanlarına, yüksek lisans ve dönem arkadaşlarım'a, çalışmalarım süresince yardımcı olan Anabilim Dalı personelimiz Recep Orhan'a,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi olarak her zaman destekleyen, koşulsuz anlayış ve sevgi gösteren canım Annem Nuray COŞKUN' a, canım Babam Fehmi COŞKUN' a, sevgili Abim Celal COŞKUN' a ve Kuzenim Şeyma BAŞER'e sonsuz teşekkürlerimle.

Neslihan COŞKUN
Haziran 2011-ANKARA

12. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara’da doğdum. İlkokulu Anıttepe İlkokulunda (1993-1998), ortaokulu (1998-2001) Özel Arı Koleji’nde, lise’yi (2001-2004) Özel Arı Fen Lisesi’nde bitirdim. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım.