

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**İNSAN TESTİKÜLER GERM HÜCRE TÜMÖRLERİNDE
UYGULANAN KLASİK BEP TEDAVİSİNDE BEVACİZUMAB'IN
TEDAVİYİ ARTTIRICI ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI: İN
VİTRO ÇALIŞMA**

EMRE KOÇ

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. MURAT TOSUN

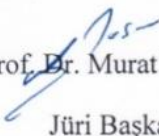
**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 17.SAĞ.BİL.03 proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez No:2018/003

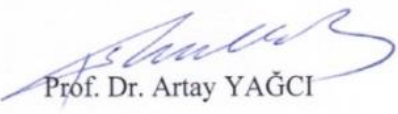
2018-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

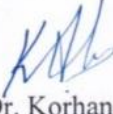
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: .../.../...


Prof. Dr. Murat TOSUN

Jüri Başkanı


Prof. Dr. Artay YAĞCI

Üye


Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

Üye

Tıp Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi EMRE KOÇ'un “ İnsan Testiküler germ hücre tümörlerinde uygulanan klasik BEP tedavisinde Bevacizumab'ın tedaviyi artırıcı etkinliğinin araştırılması: in vitro çalışma.” başlıklı tezi/.../..... günü saat 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, gelecekteki meslek hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli Danışman Hocam Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat TOSUN'a; tez çalışmam sürecinde hücre kültürü çalışmalarına katkıda bulunan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e; yüksek lisans eğitimime ve laboratuvar uygulamalarım katkıları değerli bilgilerle yardımını esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Dr. Esra ASLAN'a; çalışmamın istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Prof. Dr. İsmet DOĞAN'a ve kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım, bana her zaman güvendiğini bildiğim ebediyete intikal etmiş Değerli Annem Fatma DENİZ'e; çalışma sürecinde tüm zorlukları benimle göğüsleyen hayatımın her evresinde bana destek olan, bu hayattaki en büyük şansım değerli ablalarım Suzan KOLCU ve Yeliz ALTUN'a; ikizim Yunus KOÇ'a ve küçük kardeşlerime en içten duygularıyla teşekkür ve saygılarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vi
Resimler	vii
Tablolar	ix

1.GİRİŞ	1
1.1.1.İç genital organlar	2
1.1.2.Dış genital organlar	4
1.2.Erkek Genital Sistem Histolojisi.....	4
1.2.1.Testislerin Histolojisi	4
1.2.2.Spermatogenez	9
1.2.3. Erkek Genital Sisteminin İletici kısımlarının Histolojisi:	12
1.2.3.1. Tubuli Recti;	12
1.2.3.2. Duktuli Efferentes;	12
1.2.3.3. Duktus Epididimis;.....	13
1.2.3.4. Duktus Deferens;.....	14
1.2.3.5. Üretra;	15
1.2.3.6. Vesikula Seminalis;.....	15
1.2.3.7. Prostat;	16
1.2.3.8. Bulboüretral Bezler;	17
1.2.3.9. Penis;	18
1.3. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi	18
1.3.1. İndifferent Dönemde Testislerin Gelişimi:	18
1.3.2. İleri Haftalarda Testislerin Gelişimi:	20
1.3.3. Erkek Genital Sisteminin İletici Kısımlarının Embriyolojisi:.....	21
1.3.3.1. Duktuli Efferentesin Gelişimi;	21
1.3.3.2. Duktus Epididimisin Gelişimi;.....	21
1.3.3.3. Duktus Deferensin Gelişimi;.....	21
1.3.3.4. Duktus Ejakulatoriusun Gelişimi;	22
1.3.4. Dış Genital Organların Gelişimi;	22
1.4.Kanser	22
1.4.1.Kanser Nedenleri.....	23
1.4.2.Testis Tümörleri	23
1.4.2.1. Germ Hücre Tümörleri.....	24
1.4.2.2.Testis Kanseri Tanı Yöntemleri :.....	26
1.4.2.3. Testis Kanseri Tedavisi	26
1.4.2.4. Monoklonal Antikorlar	27
1.4.2.4.1. Bevacizumab	28

2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
2.1.Etik Kurul.....	30
2.2.Kullanılan Materyaller	30
2.3.Deney Grupları ve Hücre Kültürü.....	31
2.3.1. BEP Hücre Kültür Dozu Belirlenmesi	31
2.3.2. Hücre Pasajı	32
2.3.3. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi.....	32
2.3.4. Immunositokimyasal Boyama.....	32
2.3.5. Preparatların Değerlendirilmesi ve Görüntü Analizi	33
2.3.6. İstatistiksel Analiz.....	34
3.BULGULAR	35
3.1. MTT test sonuçları:	35
3.3.İstatistiksel Analiz Sonuçları	45
4.TARTIŞMA	47
5.SONUÇ.....	51
ÖZET.....	52
SUMMARY	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androjen bağlayıcı proteinler
AEC	3-amino-9-etilkarbozol
AFP	Alfa –feto protein
AV	Arteriyovenöz
BEP	Bleomisin,Etoposit, Cisplatin
Bev	Bevacizumab
FSH	Hormon stimulan hormon
GCTT	Testiküler germ hücre tümörü
HCG	Human koriyonik gonodotropin
HRP	Horsedish peroksidaz kit
LDH	Laktat dehidrojenaz
MIS	Müller inhibe edici faktör
PBS	Phosphate tampon çözelti
SPSS	Statistical package for the social sciences
SRY	Sexdetermining region on Y
TDF	Testis belirleyici faktör
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Erkek genital sisteminde yer alan iç ve dış genital organlar.....	3
Şekil 1.2. Seminifer epitelde spermatojenik hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin yerleşimleri.....	9
Şekil 1.3.Spermiogenez sürecinde spermatidlerin değişim süreci.....	11
Şekil 1.4.Embriyonik gelişimin 5. haftasında primordial germ hücrelerinin göçü.	19
Şekil 1.5. Gelişimin 4. ayında erkek genital sistem öğelerinin görünümü.....	20
Şekil 3.1. Bevazicumab uygulanan gruplarda ortalama MTT sonuçları.....	35
Şekil 3.2. Kullanılan parametrelerde İmmunopozitif ve İmmunonegatif Hücre Oranları.....	36

RESİMLER

Resim 1.1. Seminifer tübüllerde kan-testis bariyerinde oluşturan bazolateral bağlantılar ve tight junctionların histolojik görünümü	7
Resim 1.2. Duktus epididimisin histolojik görünümü Hematoksilen Eozin. X10.....	13
Resi 3.1A. Kontrol grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor. 1/50 X20.....	37
Resim 3.2A. G1 grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor. 1/50 X20	38
Resim 3.3A. G2 grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor. 1/50 X20	38
Resim 3.4A. G3 grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor.1/50 X20	39
Resim 3.1B. Kontrol grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.....	39
Resim 3.2B. G1 grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.....	40
Resim 3.3B. G2 grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.....	40
Resim 3.4B. G3 grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.....	41
Resim 3.1C. Kontrol grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Caspase-3 Primer antikor.1/50 X20	41
Resim 3.2C. G1 grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler.Anti- Caspase3 Primer antikor.1/50X20	42
Resim 3.3C. G2 grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler.Anti- Caspase-3 Primer antikor.1/50 X20	42
Resim 3.4C. G3 grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler.Anti- Caspase-3 Primer antikor.1/50 X20	43
Resim 3.1D. Kontrol grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti- VEGF Primer antikor.1/50. X20.....	43

Resim 3.2D. G1 grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20.....	44
Resim 3.3D. G2 grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20.....	44
Resim 3.4D. G3 grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20.....	45



TABLÖLAR

Tablo 3.1. Gruplar arasında istatiksöl farklılıkların gösterildiği SPSS PostHoc (Tukey) tablosu ve Kruskal-Wallis testi sonuçları.....46

Tablo 3.2. Aynı sütunda farklı harfler gruplar arasında fark olduğunu gösterir.....46



1.GİRİŞ

Testis tümörleri tedavisi mümkün olan ve yüksek oranda kesin tedavi elde edilebilen genç ve orta yaşlı erkeklerde daha sık rastlanan tümörlerdir. Erkeklerde görülen kanserlerin %1 'ini oluşturur. Görülme insidensi ilerleyen yaşa bağlı olarak iki katına çıkabilmektedir. Testis kanseri hücresel yapılarına göre karakterize edilir ve tedavi tümör cinsine göre yapılır. Tümörlerin %95'i germinal dokudan kaynaklanır. Testiküler germ hücre tümörlerinde tedavi olarak ikili ya da üçlü ilaç kokteyli uygulanır. En yaygın olarak kullanılanı ise üçlü ilaç kokteyli olan cisplatin, etoposid ve bleomisin (BEP) kombinasyonudur.

İnsan testiküler germ hücre tümörlerinde (GCTT) uygulanan klasik BEP tedavisi hastaların yaşam süresini %90 oranında arttırıcı etkinliğe sahiptir. Ancak BEP tedavisindeki bu 3 ilacın önemli yan etkileri olmaktadır. Bu neden bu 3'lü tedavinin etkinliğini arttıracak ve dolayısıyla yan etkiyi azaltacak bir ek ilacın olabileceği öngörüsünden yola çıkarak olası ek ama toksik etkileri daha az olan molekülleri araştırdığımızda son dönemde yaygın olarak kullanılan bir anti-kanser ilaç olan Bevacizumab'ın etkinliğinin yüksek olabileceğini düşündük. Bevacizumab birçok tümör tipinin tedavisinde kullanılan anti -tümör bir ilaç olup tümör hücrelerine doğrudan etki etmek yerine onları besleyen damarları hedef alır. Bevacizumab, neoplastik angiogenezis kilit rol oynayan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) adı verilen yeni kan damarları üremesini tetikleyen kimyasal sinyali bloke etmektedir. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak Bevacizumab+BEP kullanılan tümör tedavisine dair literatürde rastlamadık. Burada yapacağımız çalışma in vitro bir çalışma olduğu için bu konuyla ilgili gelecekteki in vivo çalışmalara ışık tutacaktır. Tümör hücreleri kontrolsüzce ürerken onları besleyen damarlarda genişler. Tümör damarlanmasında VEGF' e karşı geliştirilmiş Bevacizumab birçok tümör tipinin tedavisinde kullanılan anti-tümör bir ilaçtır. Tümör hücrelerine doğrudan etki etmek yerine onları besleyen damarları hedef alır. Bevacizumab VEGF adı verilen yeni kan damarları üremesini tetikleyen kimyasal sinyali bloke etmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak Bevacizumab'ın GCTT tedavisinde önemli bir potansiyalize edici etkiye sahip olabileceği hipotezini ortaya koyduk. Hipotezden yola çıkarak planladığımız bu çalışmada; Bevacizumab'ın

GCTT tedavisinde kullanılan klasik BEP kemoterapisinin etkinliğini arttırıp arttırmayacağını inceleyip, bunu literatüre uygun hale getirerek in vivo çalışmalarda kullanılmasını sağlamayı amaçlamaktayız.

1.1.Erkek genital sistem anatomisi

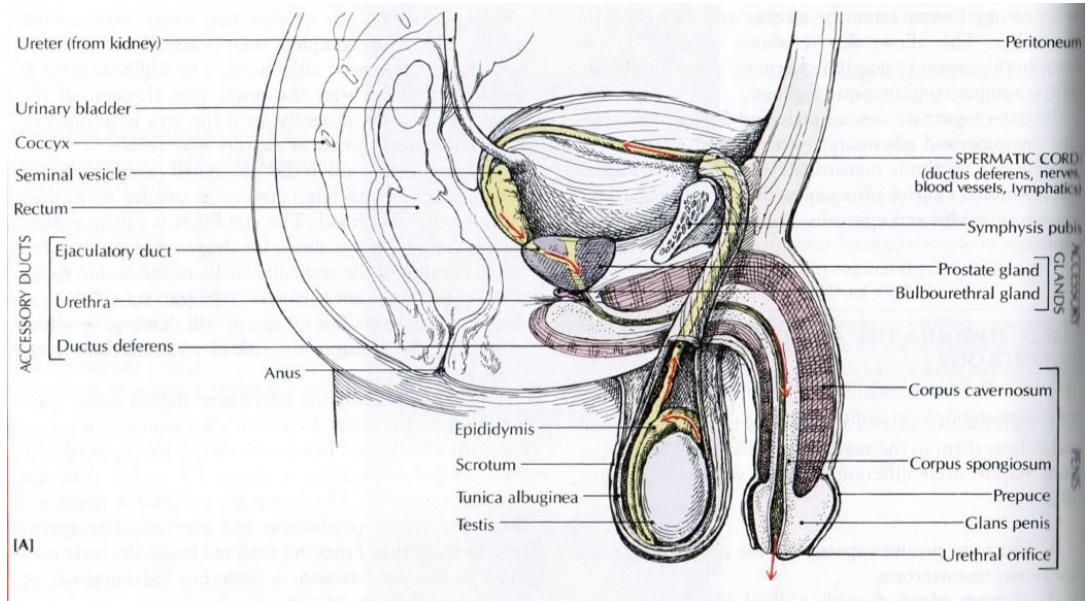
Erkek genital (üreme) organları sperm üreten kısım (testis hücreleri), sperm canlılığını sağlayan salgıları üreten bezler ve spermin taşınmasında görev alan kanallar olmak üzere üç farklı yapı içerir. Erkek genital organları bulundukları yerler göz önüne alınarak iç ve dış genital organlar diye iki gruba ayrılarak incelenir (Şekil 1.1).

1.1.1.İç genital organlar

Kısmen pelvis boşluğunda ve kısmen de perineumda bulunurlar. İç genital organlar:

- Testis
- Epididimis
- Duktus deferens
- Vesikula seminalis
- Duktus ejaculatorius
- Prostat (glandula prostatica)
- Glandula bulbourethralis (cowper bezi)
- Funiculus spermaticus

Testisler; Skrotum içinde bulunan, sperm ve cinsiyet hormonlarının yapıldığı, 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında bir çift organdır. Her biri yaklaşık 10-15 gram ağırlığında olan yumurta şekline sahip organlardır. Testisler skrotum içinde funiculus spermaticusa asılı konumda bulunurlar. Dış ve iç (facies lateralis, facies medialis) iki yüzü, ön ve arka (margo anterior, margo posterior) iki kenarı, alt ve üst (extremitas inferior, extremitas superior) iki ucu vardır. Sol testis sağ testisin konumuna göre biraz daha aşağıda bulunur ve arka kenara epididimis tutunur. Testisler fetal hayatta karın boşluğu içinde retroperitonel olarak fascia transversalis ile periton arasında gelişim göstermektedir. Fakat doğumdan önce gubernaculum testis (fibröz bir yapı ile belirlenen yol) adı verilen yolu takip edip canalis inguinalisten geçerek skrotum içine yerleşir. Bu yerleşiminde karın ön duvarı



Şekil 1.1. Erkek genital sisteminde yer alan iç ve dış genital organlar (Marieb, 2000).

tabakalarını da beraberinde sürükler. Testisler tunica albuginea denilen çok sağlam bir bağ dokusu kılıfı ile çevrelenmişlerdir. Epididimisin tutunduğu arka kenarında mediastinum testis bulunur ve buradan testisin damar ve sinirleri giriş çıkış yapar. Tunica albuginea uzantıları (septula testis) testisi lobuli testis olarak adlandırılan lobüllere ayırır.

Epididimis; testislerin arka kenarında bulunup, spermleri ileten yolun testislerden sonra gelen ve yaklaşık 6 metre uzunluğunda olan kısımdır. Epididimisin genişlemiş üst caput, orta parça corpus ve alt parça cauda epididimis olmak üzere üç kısmı vardır. Üretilen spermiumlar'ın olgunlaşması ve depolanması epididimiste gerçekleşir.

Duktus deferens; Spermleri ileten yolun cauda epididimisten sonra gelen kısımdır. Sadece iletim ile görevli yaklaşık 45 cm uzunluğunda bir kanaldır.

Vesikula seminalis; Mesanenin arka tarafına yerleşmiş konunda bulunan tubuler yapıda bir çift bezdir.

Duktus ejakulatorius; Vesikula seminalisin kanalı olana duktus excretorius ile duktus deferensin birleşmesi ile oluşan bir kanaldır. Yaklaşık olarak 2cm uzunluğundadır. Utriculus prostaticusun yan taraflarından uretraya açılır.

Prostat (glandula prostatica); Erkek genital sisteminin en büyük bezi olup yüksekliği 3cm, genişliği 4 cm ve kalınlığı 2 cm'dir. Ortalama ağırlığı 20 gram olan prostat küçük pelviste, symphysis pubicanın arkasında, rectumun önünde, mesanenin altında, diaphragma urogenitalenin üstünde bulunur.

Glandula bulbourethralis (Cowper bezleri); Yuvarlak, 1 cm çapında diaphragma urogenitale içinde urethranın arka dış tarafında yer alan bir çift bezdir.

Funiculus spermaticus; Canalis inguinaliste seyreden ve içinde duktus deferens gibi önemli yapıları bulunduran oluşumdur (Arifoğlu, 2017).

1.1.2.Dış genital organlar

Urogenital diaphragmanın ve arcus pubicusun aşağısında yer alırlar. Skrotum testis, funiculus spermaticusun alt bölümü ve epididimisi içinde barındıran torba şeklindeki yapıya denir. Symphysis pubisin hemen altında uyluğun üst kısmının ön tarafında yer alır ve sol yarısı sağ yarısına göre biraz daha aşağı konumda bulunur. Penis ise erkek çiftleşme organı ve idrarın dışarı atılmasında görevli olan organdır. Penisin perineumda bulunan ve dışardan görünmeyen kısmına radix penis, dışardan görülen ve çiftleşmeye yarayan kısmına ise corpus penis adı verilir ve penis ucundan pubise kadar uzanır. Yetişkinlerde penis uzunluğu 8-10 cm uzunluğunda, 2-3 cm çapında iken ereksiyon halindeyken boyutları 1,5 -2 katına çıkar (Unur ve ark, 2017).

1.2.Erkek Genital Sistem Histolojisi

Erkek üreme sistemi sperm (spermatozoon) yapımı, erkek seks hormonlarının üretimi ve gamet hücrelerinin dişi üreme sistemine iletilmesi işlevini görür(Gartner, Hiatt –atlas, 2009). Puberte ile başlayan spermatogenez ve spermiyogenez sonucunda spermatogonyumların her birinden 4 adet sağlıklı spermatozoon meydana gelir. Yardımcı bezlerin de katkısı ile hareket kazanan spermler, dişi genital sistemine girdikten sonra kapasitasyon geçirerek oositi dölleme yeteneğine sahip hale gelirler (Eşrefoğlu, 2016).

1.2.1.Testislerin Histolojisi

Testis hem ekzokrin hem de endokrin salgılama fonksiyonuna sahip olmasından dolayı karma bir bezdir (Eşrefoğlu, 2009). Ekzokrin fonksiyonunda sperm üretimi ve atılımı ile holokrin tipte sekresyon gerçekleşirken, endokrin fonksiyonunda ise

özelleşmiş hücreler tarafından sentez edilen testosteron hormonu üretimi gerçekleşir (Ross ve Pawlina, 2014).

Testisler, karın boşluğunun dışında skrotum içine yerleşmiş bir çift organdır. Skrotum içinde bulunmaları testislerin vücut ısısından 2-3⁰C daha düşük ısıda olmalarını sağlar (Kierszenbaum, 2006). Normal spermatogenez için en uygun ısının 34 ile 35⁰C arasında olması gerekmektedir (Ovalle ve Nahirney, 2009). Her bir testis anteriör abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren ve skrotumun içerisine uzanan uzun bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılı konumda yer almaktadır (Ross ve Pawlina, 2014). Testisler, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile sarılmıştır. Tabakalar ;

1. Tunika Vaginalis: Kapsülün en dışında bulunan ve düzleşmiş mezotelyal hücrelerden oluşan tek bir tabakadır. Tunika vajinalis testislerin karın boşluğundan skrotuma inerken birlikte sürükledikleri abdominal peritondan kökenlenmiş seröz kesedir . Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyip, yüzeyde skrotum üzerinde uzanarak tunika vaginalisin visseral ve paryetal tabakasını oluşturur. İki tabaka arasında cavitas seroza bulunur. Cavitas seroza içerisinde testislerin kolay hareket edebilmesini sağlayan sıvı bulunur.
2. Tunika Albuginea: Kapsülün en belirgin tabakası olan tunike albuginea düz kas hücreleri içeren yoğun bir fibroelastik bağ dokusu tabakası olup bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılmıştır. Bu düz kas hücreleri daha yoğun olarak epididimise komşu olan posterior yüzeyde bulunur. Tunike albuginea tabakasında, testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar bulunur. Bu tabaka testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur.
3. Tunika Vasküloza: En iç tabakada yer alan damarlardan zengin gevşek bir bağ dokusu özelliğine sahiptir (Eşrefoğlu, 2009; Gartner ve Hiatt, 2016).

Kapsülden testis içine doğru ince, fibröz uzantılar testisi insanda iç kısmını sayıları 250 kadar olan piramidal kompartmanlara böler. Bu bölmelere lobuli testis (testis lobülleri) adı verilir. Testis lobülleri tamamlanmamış septum ile birbirinden ayrılan, haberleşmeyi sağlayan piramidal şekilli bağlantılı bölümlerdir. Her testis

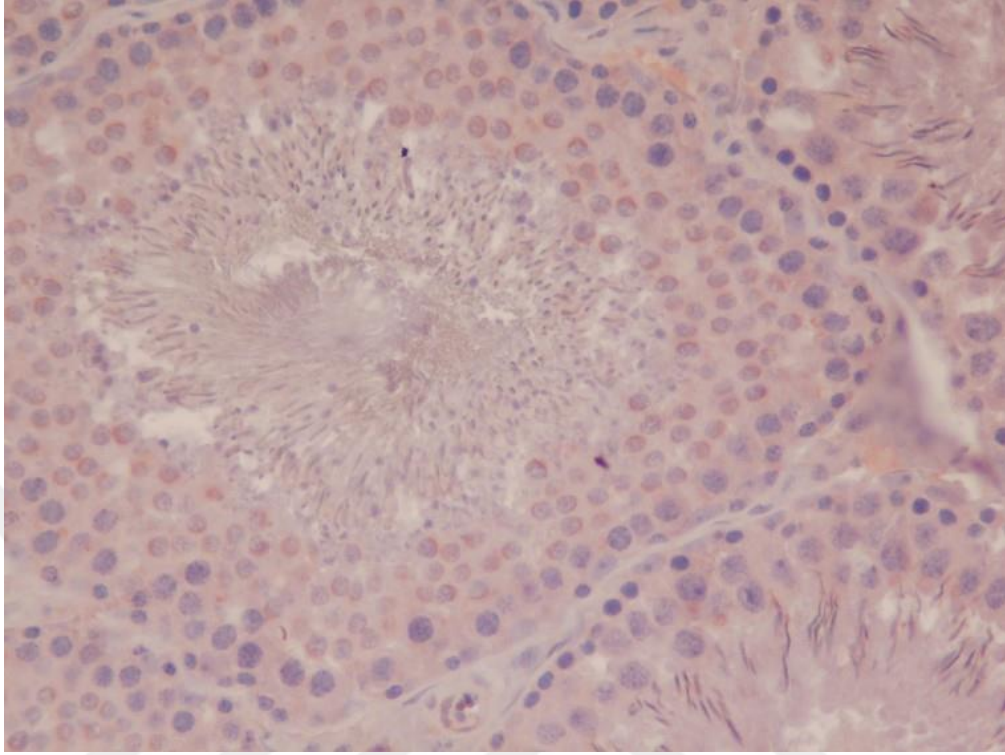
lobülünde kan damarları, sinirleri ve interstisyel (Leydig hücreleri) hücreler olmak üzere pek çok tip hücre içeren, gevşek bağ dokusu ile sarılı seminifer tübüllerden oluşur. Leydig hücreleri büyük olup çoğunlukla gruplar halinde düzenlenmiş hücrelerdir ve endokrin fonksiyonlarından dolayı oldukça büyük öneme sahiptirler. Her bir lobül sayıları 1-4 arasında değişen spermlerin üretildiği seminifer tübül içerir. Seminifer tübüllerin mediastinum testiste yer alan düz kısımlarına tubulus recti (düz tübüller) denir. Tubulus recti mediastinum testiste rete testis denilen anastomoz gösteren kanallar sistemi ile devam eder (Tekelioğlu, 2002; Kierszenbaum, 2006). Seminifer tübüllerin lümeni kalın kompleks bir epitel (seminiferöz ya da germinal epitel) ile döşelidir ve bazal membran üzerine oturmuş iki tür hücre bulunur. Bunlar;

1. Sertoli hücreleri (besleyici ve destekleyici hücreler)
2. Spermatogenik (germ hücreleri) hücreleridir (Junquera ve Carneiro, 2006; Gartner ve Hiatt, 2009).

Sertoli hücreleri spermatogenik hücreler arasına düzenli aralıklarla yerleşen, sayıları az prizmatik hücrelerdir. Tabanları bazal membran üzerine oturur, apeksleri ise tüp lümenine kadar uzanır. Sertoli hücrelerinin, lateral uzantıları spermatogenik seri hücrelerini çevrelediği için hücre sınırları belirsizdir. Bu hücrelerin çok fazla katlanmış girintiler gösteren oval ve soluk boyanan bir çekirdeği ve büyük bir nükleolusu vardır. Nukleuslarının bir kısmı bazalde ve hücre uzun eksenine paralel konumdadır. Apikal sitoplazma spermatid'lerin gömülmesine uygun girinti ve çıkıntılara sahiptir (Gartner ve Hiatt, 2016).

Bazolateral okludens bağlantıları seminifer epitelyumu bir bazal ve bir adluminal kompartmana bölerler. Spermatogenez sırasında spermatogoniumlardan oluşan ve sertoli hücrelerinin yan duvarları boyunca kayarak lümene doğru ilerleyen spermatogenik seriye ait hücreler vardır. Sertoli hücreleri intratübüler ve ekstratübüler aralıklar arasında zonula okludensler sayesinde makromoleküllerin geçişini önler. Böylece intratübüler aralıkta bulunan germ hücrelerinin proteinleri kana ulaşmadığı için bunlara karşı antikor yapılmaz. Peritübüler doku ve sertoli hücreleri etrafındaki zonula okludensler birlikte, gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerini oluştururlar (Resim 1.1). Sertoli hücreleri arasında hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişlerini sağlayan gap junction tipi birleşmeler de vardır. Bu gap junction birleşmeler

seminifer epitelyum siklusunun koordinasyonunda oldukça önemlidir (Tekelioğlu, 2002; Kierszenbaum, 2006).



Resim 1.1. Seminifer tübüllerde kan-testis bariyerinde oluşturan bazolateral bağlantılar ve tight junctionların histolojik görünümü. (Claudin-1 primer antikor 1/50). X10(Dr. Murat TOSUN'un izniyle)

Sertoli hücreleri olgun testiste bölünme göstermeyip ısı, radyasyon, toksik, enfeksiyon ve beslenme yetersizliği gibi etkenlere karşı oldukça dayanıklıdır. Sertoli hücrelerinin başlıca fonksiyonları:

a) Gelişmekte olan spermatozooları destekler, korur ve besler. Bu hücrelerin beslenmeleri ve desteklenmeleri sertoli hücrelerinin sitoplazmik dallanmaları ile gerçekleştirilir. Çünkü spermatosit I ve II, spermatid ve spermatozoonlar kan testis bariyerinden dolayı kan desteğinden izole edilmişlerdir. Sertoli hücreleri aynı zamanda bu hücreler farklılaşırken ortaya çıkan proteinler vücut için yabancı olduğundan bunlara karşı beklenen otoimmün reaksiyonların gelişmesini önler.

b) Fagositoz; spermatidlerin olgunlaşmasında ortaya çıkan artık cisimleri fagosit eder.

c) Sekresyon; seminifer tübüllerden genital kanallar boyunca spermatozooların taşınmasını kolaylaştıran ve besleyen fruktozdan zengin bir

salgıyı lümene salgırlar. Androjen bağlayıcı proteinler (ABP), testosteronu bağlayarak tüp içinde birikmesini sağlar ve spermatogenezin ilerlemesini sağlar. FSH'nın sentezini ve salınımını durduran bir hormon olan inhibin adlı bir polipeptid salgırlar. Aynı zamanda ön hipofizden FSH sekresyonunu yüksek miktarda salgılatan aktivin sekresyonu da sertoli hücreleri tarafından yapılır.

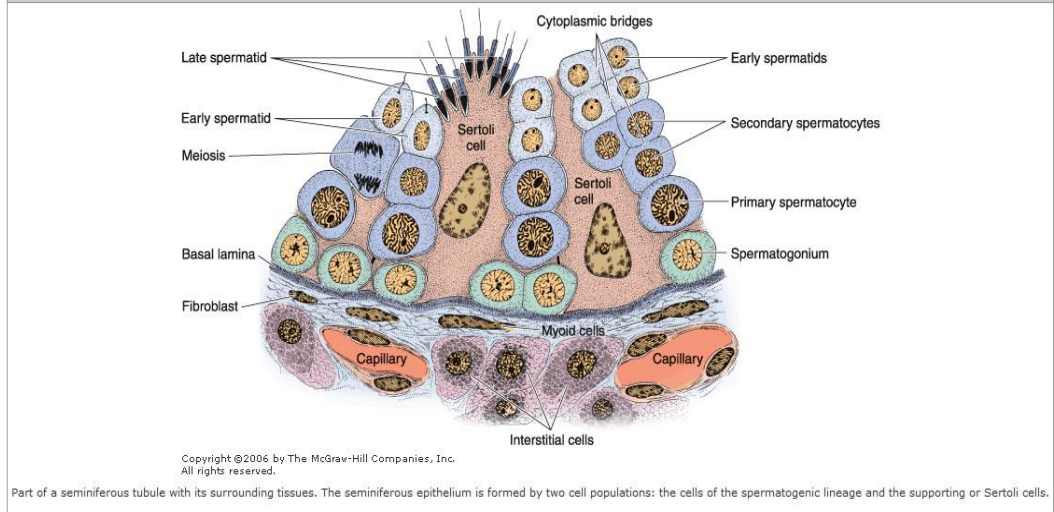
d) Fetal gelişim dönemde; müller kanallarının gerilemesini sağlayan anti – müllerian hormon salgırlar (Kierszenbaum, 2006; Gartner ve Hiatt, 2009).

Spermatogonik hücreler seminifer tübülün bazal membranı ile lümeni arasına yerleşmiş 4-8 katlı diploid germ hücreleridir. Ve bu hücreler çoğalıp farklılaşarak (spermatogenez olayı) spermatozoonları oluştururlar. Spermatogonik seride bulunan hücreler;

Spermatogoniumlar: Bazal membran üzerine yerleşmişlerdir. Puberte başlayana kadar tüpün duvarında sadece bu hücreler bulunur. Puberteden itibaren hormonal etki ile çoğalarak diğer tip hücrelere dönüşümleri gerçekleşir. Nükleus özelliklerine göre üç tip spermatogonyum tanımlanmıştır.

Tip A koyu spermatogonyumlar ince granüler kromatine sahip yoğun bazofolik nükleuslu hücrelerdir. Bu hücrelerin diğer spermatogonik hücreleri oluşturan kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Çeşitli aralıklarda gerçekleşen bölünme ile ya yine bir Tip A koyu spermatogonyum ya da Tip A açık spermatogonyum oluştururlar. Tip A koyu spermatogonyum kök hücre olarak kalırken, Tip A açık spermatogonyum farklılaşıp olgunlaşarak spermiyum haline gelir. Tip A açık spermatogonyumların granülleri, açık boyanan nükleusları ile koyu spermatogonyumlardan ayrılırlar. Bu hücrelerde pek çok kez mitoz geçirip sayılarını arttırırlar. Pek çok bölünmeden sonra Tip A spermatogonyumlar, Tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar.

Tip B spermatogonyumlar kromatini nüklear kılıf boyunca ve nükleolus çevresinde kaba kümeler yapan yuvarlak nükleuslu hücrelerdir. Tip B spermatogonyumların görülmesi spermatogonyal dönemin son olaylarını temsil etmektedir. Bu hücreler primer spermatositleri oluşturmak üzere bölünmeye giderler (Tosun, 1999; Karateke, 2013; Ross ve Pawlina, 2014), (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Seminifer epitelde spermatogenik hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin yerleşimleri (Ros ve Pawlina, 2014)

Spermatozot I (primer spermatozot): Küre veya oval biçimlidir. Duvardaki en büyük hücredir. Birinci mayotik bölünmenin profaz evresine girer ve bu durumlarını uzun süre muhafaza etmelerinden dolayı kesitlerde sıkça görülürler. 46 kromozomlu (diploid) hücrelerdir.

Spermatozot II (Sekonder spermatozot): Primer spermatozotun mayotik bölünmesi sonucu oluşan, onun yarısı büyüklüğünde olan hücrelerdir. 23 kromozoma (haploid) sahiptirler. Kısa süre sonra hemen ikinci mayotik bölünmeye uğradıklarından dolayı kesitlerde seyrek görünürler. Ve bu hücrelerin bölünmesiyle spermatid'ler oluşur.

Spermatid: Spermatozot II'nin yarısı büyüklüğünde olup haploid kromozoma sahiptirler. Birbirleriyle sitoplazmik bağlantı yapan sinsityal hücre kümesi oluştururlar (Junquera ve Carneiro, 2006; Eşrefoğlu, 2009).

1.2.2.Spermatogenez

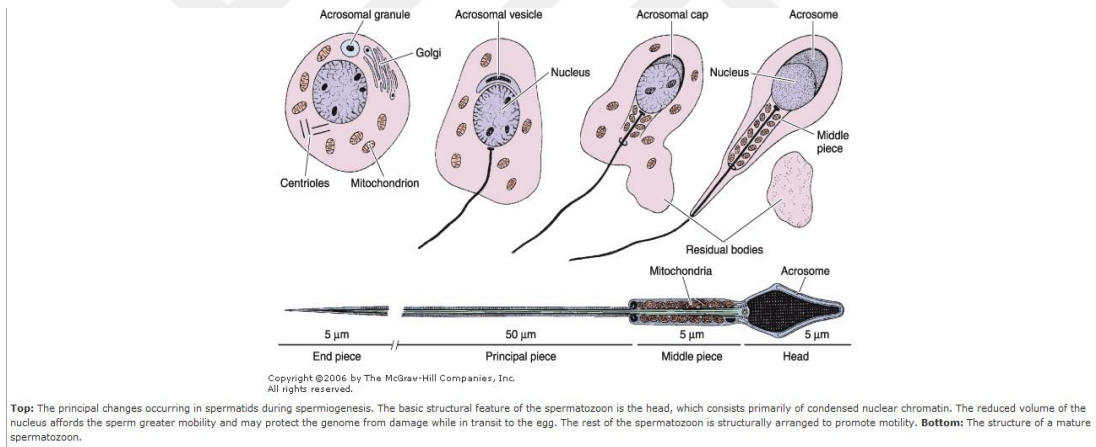
Spermatogoniumların mitozla bölünerek primer spermatozotları oluşturduğu dönemdir. Spermatidlerin sertoli hücresi püsküllerine gömülüp farklılaşarak hareketli spermatozoonlara (sperm) dönüşmesi olayı ise spermiyogenezis olarak adlandırılır. Yeni oluşmuş spermatidin merkezi konumlu yuvarlak bir nükleusu, iyi gelişmiş golgi aygıtı, çok sayıda mitokondriyonları ve bir çift sentriolü vardır. Tüm bu yapılarda spermiyogenezisde değişimler ortaya çıkar. Spermatidler sertoli hücrelerinin luminal yüzlerindeki sitoplazma girintilerine (püsküllerine) gömülerek

hem beslenmelerini hem de farklılaşmalarını tamamlarlar. Spermiyogenezde hücrelerin yeni özellikler kazanarak değişmesi dört dönemde incelenir (Şekil 1.3).

1. Golgi dönemi; Çok sayıdaki Golgi kompleksinin bulunduğu bölgede PAS +granüllerin birikmesi ile karakterize bir dönemdir. Golgi aygıtından sentezlenen glikoproteinden zengin granüller (preakrozomal granüller) birbirleriyle birleşerek, etrafları membranla sarılı tek ve iri bir granül oluştururlar. Bu granül akrozomal granül (akrozomal vezikül) olarak adlandırılır. Akrozomal vezikül çekirdek dış zarına yapışır ve onu bir kep gibi sararak akrozom adını alır. Akrozomal veziküllerin bulunduğu bölge gelişen spermin ön kutbunu belirler. Akrozom birçok hidrolitik enzim içermesinden dolayı fertilizasyon sırasında korona radiata hücrelerinin birlerinden ayrılmasında ve zona pellusidanın yumuşatılmasında görev alır.
2. Kep dönemi; Akrozomal vezikül nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyip şapkaya benzer şekilde bu bölümü kuşatır(akrozomal kep). Çekirdeğin bir kutbunda akrozom şekillenirken diğer kutbunda bir çift olan sentriol bölünerek proksimal ve distal sentriol çiftlerini oluşturur. Proksimal sentriolden gelişen flagellum uzaması sonucu kalın fibriler kılıf oluşur. Ve bu spermatozoonun kuyruk kısmını oluşturur. Bunun proksimal bölümü etrafına mitokondrionlar düzenli şekilde dizilerek orta parçayı şekillendirirler. Distal sentriol ise orta parçanın sonlarına doğru göç ederek, kuyruğun başlangıcında flagellumu bir halka gibi kuşatır(anulus).
3. Akrozom dönemi; Vesikül akrozom şeklinde yoğunlaşmıştır ve çekirdek üzerinde baş şapkasını meydana getirir. Tabakaları arasında akrozom bulunur. Akrozom; hyaluronidaz, asit fosfataz, nöraminidaz ve tripsin benzeri proteaz olan akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir. Çekirdek yoğunlaşır, hafifçe düzleşir ve inceliyor uzar, hücre membranının üzerine doğru ilerler ve burada tam bir sperm başını oluşturur. Bu ana kadar sitoplazma içerisinde değişikliklere uğramış olan mitokondriyonlar bazal sentriol ve annulus arasındaki bölgeye geçer, burada flagellumun etrafında spiral ya da heliks şeklinde düzenlenerek mitokondriyal kılıfı oluşturur. Böylece sitoplazmanın büyük bir kısmı kalıntı haline gelir Sitoplazmanın bir kısmı kuyruk yönünde kayarak orta parçayı kuşatır. Geri kalan kısmı ise dışarı atılır. Sertoli hücreleri tarafından fagosite

edilip ortadan kaldırılır. Farklılaşma ilerledikçe sitoplazma fazlası atılmaya devam eder. Sitoplazma miktarı sadece çekirdek, orta parça ve kuyruğun pars prensipalisini saracak kadar kalmaktadır.

4. Olgunlaşma dönemi (maturasyon); Residüel (kalıntı) cisimcikler atılması sonucu olgun spermatozoon'un çekirdek, orta parça ve kuyruğu etrafında yalnızca çok ince bir sitoplazma kalmıştır. Residüel cisimciklerin Sertoli hücreleri tarafından fagositozinden sonra germ hücrelerinin lipid içeriği Sertoli hücreleri sitoplazmasında tutulur. Kuyruk yapısal yönden bir silyuma benzer, içerisinde aynı sayı ve düzenlenmede longitudinal filamanlar yer alır. Spermatozoon olgunlaşmasının son basamağı kapasitasyon olarak bilinir ki bu da dişilere ejakülasyondan sonra görülür. Olgun spermatozoonlar baş-boyun, orta parça ve kuyruk gibi bölümlere sahiptir (Erbengi, 1985; Demir, 1995; Beresford, 1977; Ovalle ve Nahirney, 2009).



Şekil 1.3. Spermiogenez sürecinde spermatidlerin değişim süreci (Ros ve Pawlina, 2014)

Testiste seminifer tüpler arasındaki gevşek bağ dokusundan oluşan interstisyumda bol kan ve lenf kapillerleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, retiküler iplikler ve farklılaşmamış mezenşimal hücreler bulunur. Pencere tip kapiller mevcuttur. Puberteden sonra interstisyel hücreler Leydig hücrelerine dönüşür. Leydig hücreleri farklılaşarak erken fetal hayatta testosteron salgılamaya başlarlar. Testosteron embriyonik dönemde erkek fetüste gonad gelişimi için esas hormon olup pubertede ise sperm üretiminin başlaması, aksesuar bezlerin sekresyonu

ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Testosteron, yetişkinlerde spermatogenezin, aksesuar bezlerin, genital kanalların ve sekonder seks karakterlerinin devamlılığı için gereklidir. Erkek fetüste erken dönemde farklılaşan Leydig hücreleri fetal hayatın 5. ayında inaktif konuma geçen Leydig hücrelerini fibroblastlardan ayırmak zordur. Pubertede salınan gonadotropinlerin etkisiyle tekrar aktifleşen Leydig hücreleri androjen salgılamaya başlarlar (Junqueira ve Carneiro, 2006; Eşrefoğlu, 2009).

1.2.3. Erkek Genital Sisteminin İletici kısımlarının Histolojisi:

1.2.3.1. Tubuli Recti;

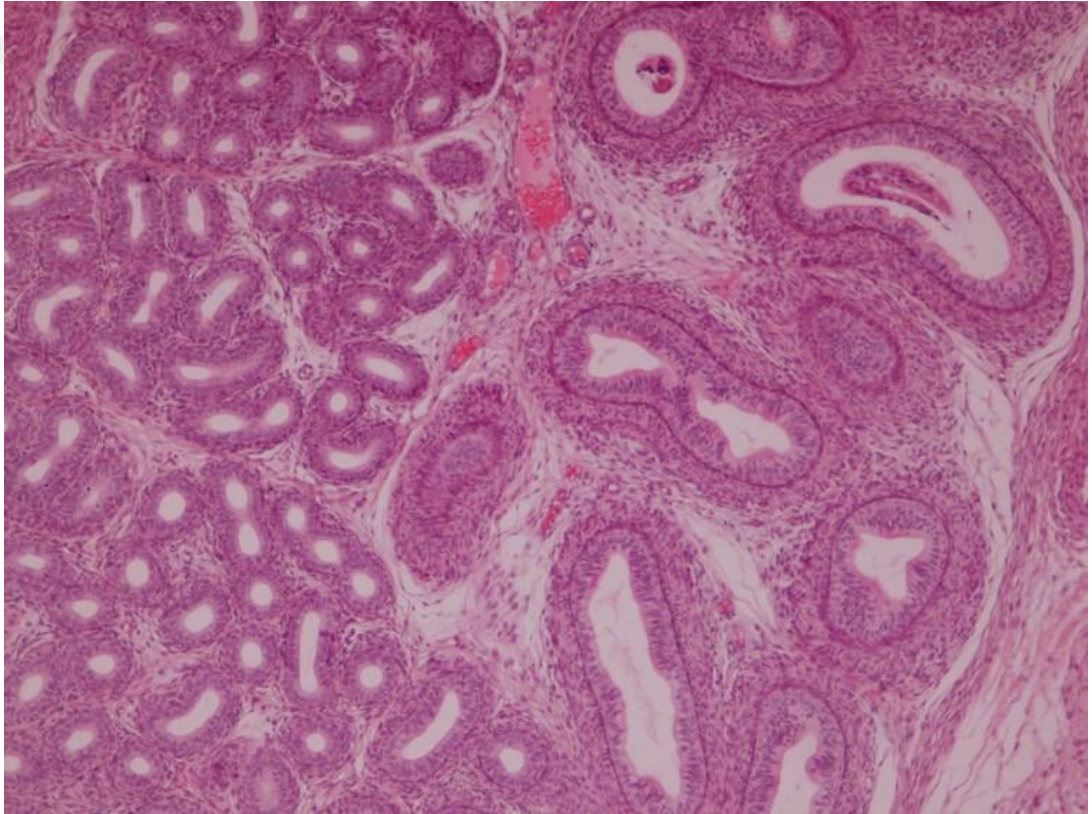
Düz seyirli seminifer tübülleri (Rete testis), mediastinum testis'te yer alan tubuli recti'ye açılır. Rete testis, tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitel ile döşeli düzensiz anastomozlaşan kanallardır. Epitel hücreleri tek bir apikal silyum ve birkaç kısa mikrovillus içerir. Epitelin yaslandığı bazal membran mediastinumun bol kan damarlı bağ dokusu ile sarıdır. Geçiş bölgelerine yakın spermatogenik hücreler kademeli olarak azalarak ortadan kalkar, tüp duvarında sadece sertoli hücreleri kalır (Paker, 1993; Tekelioğlu, 2002; Dağdeviren ve Biricik, 2007a).

1.2.3.2. Duktuli Efferentes;

Rete testisi epididimise bağlayan kanallardır. Rete testis epididimisin başına, sayıları yaklaşık 20 adet olan, kıvrımlı seyreden duktuli efferenteslerle açılır. Kanalları döşeyen yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden oluşur. Hücre boyları eşit olmadığından dolayı, epitel yüzeyi girintili çıkıntılı görülür. Uzun boylu prizmatik hücreler genellikle silyumludur. Kısa boylu hücreler ise silyum içermez. Ancak yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus bulunur. Apikal plazma membranları sitoplazmaya çökerek kanaliküller oluşturur. Apikal sitoplazmalarında çok sayıda mikropinositotik vezikül, membranla sınırlı yoğun cisimler ve lizozomlar bulunur. Bu özellikler hücrelerin endositotik aktivitelerinin olduğunun göstergesidir. Bazal membrana komşu yerleşen kübik şekilli bazal hücreler ise diğer hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Epitelde lenfositler de bulunabilir. Elastik lif içeren, ince bir sirküler kas tabakası kanalı etrafını kuşatır. Spermin bu kanallar boyunca ilerlemesi silyumların hareketi ve kas tabakası sayesinde gerçekleşir (Erkoçak, 1982; Junqueira ve Carneiro, 2006; Eşrefoğlu, 2009).

1.2.3.3. Duktus Epididimis;

Efferent duktuliler birleşerek tek bir epididimisi meydana getirir. Efferent duktus epididimisin baş kısmında bulunur. Bunların birleşmesiyle oluşan tek bir kanal olan duktus epididimis ise yaklaşık 5-6 metre uzunluğundadır ve kısa bir mesafe içerisinde kendi üzerinde birçok kıvrım yaparak parmak kalınlığındaki epididimisin korpus ve caudasını şekillendirir. Çok kıvrımlı olduğundan enine kesitlerde çok sayıda kesitine rastlanır (Resim 1.2.). Duktuli efferenteslerden ayırmada en önemli kriter hem iç hem de dış yüzünün oldukça düzgün oluşudur. Epiteli yalancı çok katlı prizmatiktir. Bazal membran üzerine oturmuş olan konik veya yuvarlak hücreler lümene



Resim 1.2. Duktus epididimisin histolojik görünümü Hematoksilen Eozin. X10(Dr. Murat TOSUN'un izniyle)

Resim erişemez, prizmatik hücreler ise lümene ulaşır. Silindirik hücreler hareketsiz silyalara sahip aynı boydaki hücrelerdir. Bu silyalar daha çok mikrovillus özelliklerine sahip olup testiküler sıvının %99'unu absorbe ederler. Bu hücreler spermatozoonların olgunlaşmalarını sağlar, diğer taraftan kapasitasyonu inhibe eden bir madde olan gliserofosforil-kolin salgısı da üreterek lümene verirler. Düzgün bir

bazal membrana sahiptir. Dış kısmındaki gevşek bağ dokusu lamina propriadır ve longitudinal düz kas lifleri içerir. Kan ve lenf damarlarınca zengindir. Spermatozoonların depo edildiği ve olgunlaştığı yer epididimistir (Williams ve ark., 1989; Tekelioğlu, 2002; Ovalle ve Nahirney, 2009).

1.2.3.4. Duktus Deferens;

Epididimisin kuyruğunun devamı olan, kalın duvarlı müsküler bir borudur. Testisin arka yüzünden aşağı doğru uzanarak spermatik kordonun bir elemanı olarak inguinal kanaldan geçip karın boşluğuna ulaşır. Burada mesaneye kadar genişleyerek ampullayı oluşturur. Ampullanın son kısmında seminal veziküllerin kanalları da katılır. Bundan sonrada duktus deferens prostata girerek üretraya açılır. Prostata giren sekmente ejakulatuar duktus denir. Duktus ejakulatorius yaklaşık 2 cm uzunluğunda olup mukozası çok ince yapıdadır. Epiteli tek katlı veya yalancı çok katlı silindirikdir. Üretraya yakın bölümü ise çok katlı değişken epiteldir. Epitel hücrelerinin çoğunun yüzeyinde stero silyumlara rastlanır. Epitel altından elastik liflerden zengin lamina propriaya yer alır. Tam gergin durumda iken duktus deferenslerin boyu yaklaşık 50 cm uzunluğundadır. Mukoza lümenine doğru katlantılar yaptığından dolayı lümen düzensiz görülür. Müsküler tabaka içte ve dışta longitudinal, ortada siküler seyreden kas liflerinden oluşan kalın bir tabakadan oluşur:

- Tunika mukoza: Mukoza longitudinalın yaptığı kıvrımlardan dolayı lümeni yıldız şeklindedir.
 - Lamina epiteli yalancı çok katlı silindirik olup bazı hücreleri steriosilyalıdır.
 - Lamina propriaya bağ dokusu olup elastik lifler ve kan damarlarınca zengindir.
- Tunika muskularis: İç ve dışta longitudinal ortada sirküler seyirli düz kaslardan oluşan en kalın tabakadır.
- Tunika adventisya: Fibroelastik bağ dokusu olup, kan damarları ve sinirler bakımından zengindir (Paker, 1993; Carlos ve ark., 1993; Dağdeviren ve Biricik, 2007a).

1.2.3.5. Üretra;

Üretra, prostatik üretra, membranöz üretra ve kavernöz üretra olmak üzere 3 kısımdan meydana gelir. Epitel Prostatik üretrada, çok katlı değişici epitel iken üretranın diğer kısımlarında çok katlı prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatiktir. Yapısında kanal içine mukus salgılayan intraepitelyal bezler bulunur. Membranı müköz yapıdadır ve üretra duvarının kalın bir düz kas tabakası vardır. Bu kas tabakası, özellikle prostatik ve membranöz kısımda bulunur. Burada içte uzunlamasına, dışta dairesel kas tabakaları bulunur. Gevşek elastik fibrillerden oluşan lamina propriası vardır. Kavernöz üretra kısmında ise düz kas tabakası bulunmaz (Williams ve ark., 1989; Karaöz, 2002; Eşrefoğlu, 2009).

1.2.3.6. Vesikula Seminalis;

Seminal veziküller bir çift olup, kıvrımlı tübüler yapılarda, mesanenin arkasında yer alırlar. Yaklaşık uzunlukları 15 cm'ye ulaşır. Kanalları duktus deferensin ampullası ile birleşerek ejakülatuar kanal çiftini oluşturur. Vesikula seminalis, ductus deferensin dışı doğru bir evaginasyonu sonunda oluştuğundan dolayı yapısı ona çok benzemektedir. Duvar tabakası, tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisyadan oluşur. Seminal veziküllerin fazlaca katlanma gösteren duvarı (müköz membran) yalancı çok katlı epitel yapısındadır. Histolojik kesitlerde bal peteği şeklinde görülürler. Bazal hücrelerin arasında daha az sayıda prizmatik izlenir. Bu hücreler fibroelastik yapıda lamina propria üzerine otururlar. Kas tabakası içte dairesel, dışta uzunlamasına yapıdadır. En dışta fibröz adventisiya bulunur. Lümen içinde bulunan hücrelerin sınırları çok belirgin olup sitoplazmalarında salgı granülleri ve sarı bir pigment bulunur. Pigmentin görülmesi puberte ile başlayıp yaşa paralel olarak artar. Bazal hücrelerde organel sayısı daha azdır. Yüzeyel hücreler ise mitokondri, golgi aygıtı, granüler ER, salgı granülleri ve mikrovilluslarca zengindir. Vesikula seminalisin salgısı; sarı renkte, yapışkan, hafif alkali, C vitamini ve fruktozdan zengin, koagülasyon enzimi ve prostoglandinlerden zengin olan bir sıvı içeriğine sahiptir. İçeriğinde bulunan C vitamini ve fruktoz, spermatozoonların beslenmesi, prostoglandinler ise fertilizasyon için gereklidir. Epitelyal salgı faaliyetleri testosteron hormonu epitelyal salgı fonksiyonlarını kontrol eder. Elastik liflerden ve damardan zengin gevşek bağ dokusu lamina propria olup az sayıda düz

kas lifleri içermektedir. Tunika muskularis ise duktus deferensten daha ince yapıya sahiptir. Kas tabakası içte sirküler ve dışta longitudinal iki tabakalıdır. Lümendeki salgı, ejakülasyon sırasında kasılmalar sonucu boşaltılır. Elastik lifli ince bir bağ dokusu tunika adventisya tabakasıdır (Karaöz, 2002; Junqueira ve Carneira, 2006; Eşrefoğlu, 2009).

1.2.3.7. Prostat;

Prostat, uretrayı idrar kesesinden ayrıldığı kısımda çevreler. Sayıları 15 ila 30 arasında değişen boşaltıcı duktuslar aracılığı ile prostatik uretraya drene olan 30-50 kadar bileşik tübüloalveolar bezlerin bir araya gelmesi ile oluşur. Pelviste mesanenin altında yer alır. Prostat düz kas liflerinden zengin, fibroelastik bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile kuşatılmıştır. Kapsülden ayrılan septumlar bezin içine doğru uzanarak lobları oluştururlar. Bezleri saran stroma da kapsül gibi çok miktarda düz kas lifi içeren fibroelastik bağ dokusudur. Bezleri döşeyen epitel, aktivasyon durumuna bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle tek katlı prizmatik epitel yapısındadır. Ancak yassı, kübik veya yalancı çok katlı prizmatik özellik gösteren epitel alanları da içerebilmektedir. Bezler mukozal, submukozal ve periferik bezler şeklinde 3 konsantrik tabaka şeklinde düzenlenmiştir. Direkt üretraya drene olan bezler, mukozal bezlerdir. Submukozal ve periferik bezler ise prostatik sinuslara drene olurlar. Erişkinde prostat bezinin parankiması anatomik ve klinik olarak farklı dört bölümden oluşur.

1.Santral (merkezi) bölge: glandüler dokunun %25'ini oluşturur ve ejakulatuar kanalı çevreler. Prostatın karsinom ve inflamasyona oranı düşük bölgesidir. Bu bölgedeki epitel hücreler diğer bölgelerden farklı olarak hafif bazofilik stoplazmalı, daha geniş nukleuslu hücrelerdir. Nukleus seviyeleri komşu hücreler arasında değişiklik gösterir.

2. Periferik bölge: Prostatın glandüler dokusunun %70'ini içeren bu bölüm inflamasyona karşı hassastır ve prostatik kanserlerin çoğu bu bölgeden oluşur.

3.Transisyonel bölge: Pprostatik glandüler dokusunun %5'ini oluşturur ve mukozal bezleri içerir. Prostatik uretrayı sarar. Yaşlanmaya bağlı olarak bu bölgede hipertrofi görülür. Hiperplaziye uğrayan parankim hücreleri ve epitel hücrelerinde nodular kitleler meydana gelir. Bu nodüller nedeniyle prostatik üretraya baskı altında

kalır, idrar akışı azalır, idrar çıkışı zorlaşır. Bu durum benign prostatik hiperplazisi (BPH) olarak adlandırılır.

4.Periüretal bölge: Hem mukozal hem de submukozal bezleri içerir ve benign prostatik hiperplazi (BPH)'nin ileri aşamasında bu zonda patolojik kitle gözlenir. Bu patolojik kitle üretral basınca neden olur ve mesaneden idrar sızması gerçekleşir. Bez düz kas lifleri içeren fibroelastik bir kapsül ile sarılı olup kapsül içinde yaygın bir ven ağı mevcuttur. Bezin bileşenleri dens stroma içerisine gömülü durumdadır. Stromanın devamı periferde kapsül ile devam eder. Fibroelastik stroma çok fazla düz kas lifleri içerir. Prostat salgısının boşalması, kas liflerinin ejakülasyon sırasında kasılması ile gerçekleşir. Salgı alveolleri ve tübülleri büyüklük ve şekil bakımından farklılık gösterir. Alveollerin lümeni oldukça geniştir. Sitoplazması çok fazla salgı granülleri, lizozomlar ve lipid damlacıkları içerir. Duktusların lümeni ise düzensizdir ve daha küçük salgı tübüllerine benzerler. Testosteron, seminal veziküller gibi prostat bezinin gelişimi ve fonksiyonel aktivitesinde rol almaktadır. Prostat salgısı asidiktir ve ince kıvamlı sütümsü bir sıvı görünümündedir. Proteolitik enzimlerce zengindir. En fazla bulunan enzimlerden olan Fibrinolizin semenin pıhtılaşmasına engel olur. Çok fazla prostatikasit fosfataz (PAF) içerir. Prostatik karsinomlarda çoğunlukla bu enzim salgılanması fazlaşır ve enzimin kandaki konsantrasyonunda artış olur. Histolojik boyanmalardaki kesitlerde salgı asidofil, granüler yığını şeklinde izlenir. Ayrıca sitrik asit ve prostat spesifik antijen (PSA) de salgılama fonksiyonları vardır (Tekelioğlu, 2002; Eşrefoğlu, 2009; Ovalle ve Nahirney, 2009).

1.2.3.8. Bulboüretal Bezler;

Membranöz üretranın arkasında ürüngenital diyaframda yerleşmiş iki adet birleşik tübüloalveoler bezdir. Kanalları penil üretra ile birleşir. Dış yüzünde iskelet kasları içeren bağ dokusu kapsül ile kuşatılmıştır. Bu kapsülden ayrılan septumlar organı lobüllere ayırır. Septumların bağ dokusu elastik liflerden düz kas ve çizgili kas liflerinden zengindir. Sekretuar bölümü mukus salgılayan tek katlı kübik veya prizmatik epitel ile döşelidir. Sekrasyon ürünü kayganlaştırıcı olarak görev yapan berrak bir mukustur. Bu ürün galatoz, galaktozamin ve siyalik asitten zengindir. Salgısı preseminal sıvının büyük bölümünü oluşturur (Erkoçak, 1982; Carlos ve ark., 1993; Parker, 1993).

1.2.3.9. Penis;

Penis, idrar ve seminal sıvının dışarı atıldığı, başlıca iki dorsal erektile doku kütlesi olan korpus kavernozumlardan ve bir ventral erektile doku kütlesi olan korpus spongiozumdan oluşmaktadır. Korpus spongiozumun içinde uretranın spongiyoz parçası yer almaktadır. Sıkı bir fibroelastik tabaka olan tunika albuginea bu üç parçayı birbirine bağlar ve her birinin etrafında kapsül oluşturur. Tunika albuginea tabakası, deri ve alttaki gevşek bağ dokusunun altında 1mm kalınlığında, kollajen yapıda elastik ve düz kas liflerinden oluşmuştur. Esas olarak helisin arterlerden kaynaklanan kan ile doldukça vasküler boşlukların boyutları ve sertliğinde artma meydana gelir. Helisin arterler ereksiyon sırasında penise kan akışını arttırmak için dilate olurlar. Penisin derin arteri ile periferi venöz sistem arasında bir arteriyovenöz (AV) anastomoz bulunmaktadır. Penisin derisi incedir ve glans penis hariç altındaki, damar ve sinirden zengin olan gevşek bağ dokusuna gevşekçe bağlıdır. Korpus kavernozum uretranın ortasından uretra geçer. Korpus kavernozum uretra önde şişkinleşerek glans penis'i yapar. Tunika albuginea glans penis üzerinde devam etmez. Deri glans penis üzerinde geriye çekilebilen sünnet derisi (prepisyum) olarak da adlandırılan bir kıvrım yapar. Penis derisi küçük ter bezleri, seyrek yağ bezleri ve kıl follikülleri içerirken, distal bölüm derisi kıl follikülü içermez. Penis, somatik, sempatik ve parasempatik sinirler sinirler tarafından inerve edilmektedir. Penis dokusu boyunca çok sayıda duyuşal sinir sonlanması dağılım göstermektedir (Erbengi, 1985; Ovalle ve Nahirney, 2009; Gartner ve Hiatt, 2009; Ross ve Pawlina, 2014).

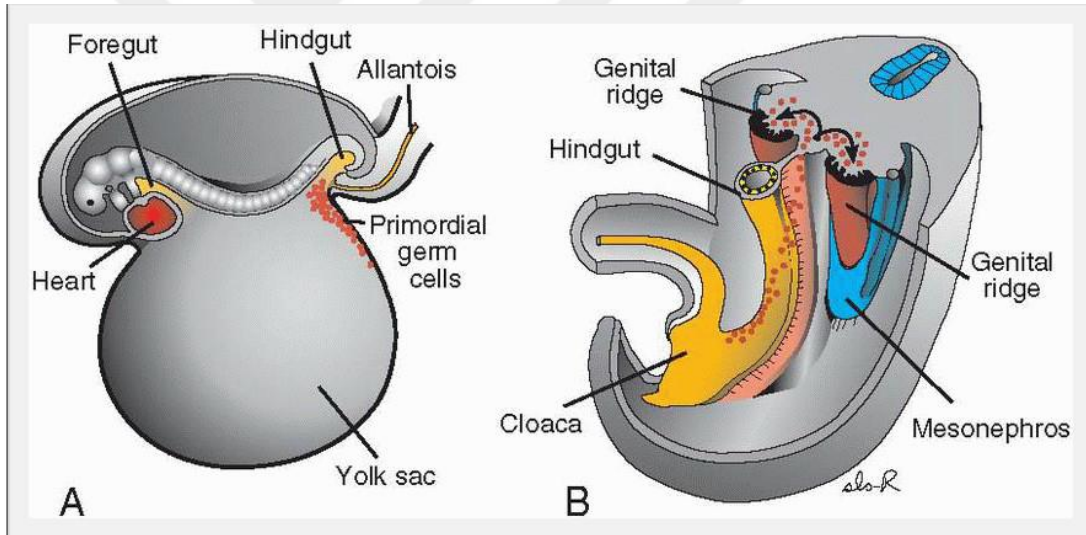
1.3. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi

1.3.1. İndifferent Dönemde Testislerin Gelişimi:

Cinsiyetin belirginleşmesi, bazıları otozomal olan çok sayıda genin görev aldığı kompleks bir aşamadır. Seksüel dimorfizmin anahtarı kısa kolunda bulunan (Yp11) Sry geninin (sexdetermining region on Y) taşınımı Y kromozomu tarafından gerçekleştirilir. Bu genin protein ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının oluşumunun belirlenmesinde genleri aktiveştiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktördür(TDF). Bu faktörün varlığıyla fetusun cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da kız tipinde gelişme gösterir. Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına karşın, gelişimin 7.

haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özellikleri bakımından henüz belirgin değildirler. Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, kolomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunluğu ile genital veya gonadal sırtlar halinde belirme gösterirler. Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital sırtlar içinde germ hücrelerinin varlığına rastlanılmamaktadır.

Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında oluşum gösterirler. Sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşmış olurlar (Şekil 1.4) ve 6. haftada da genital sırtlara kadar ilerlemiş olurlar. Bu hücreler genital sırtlara ulaşamadıkları takdirde gonadların gelişimi gerçekleşmez. Gonadların over veya testise farklılaşmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi mevcuttur.



Şekil 1.4..Embriyonik gelişimin 5. haftasında primordiyal germ hücrelerinin göçü (Sadler, 2011)

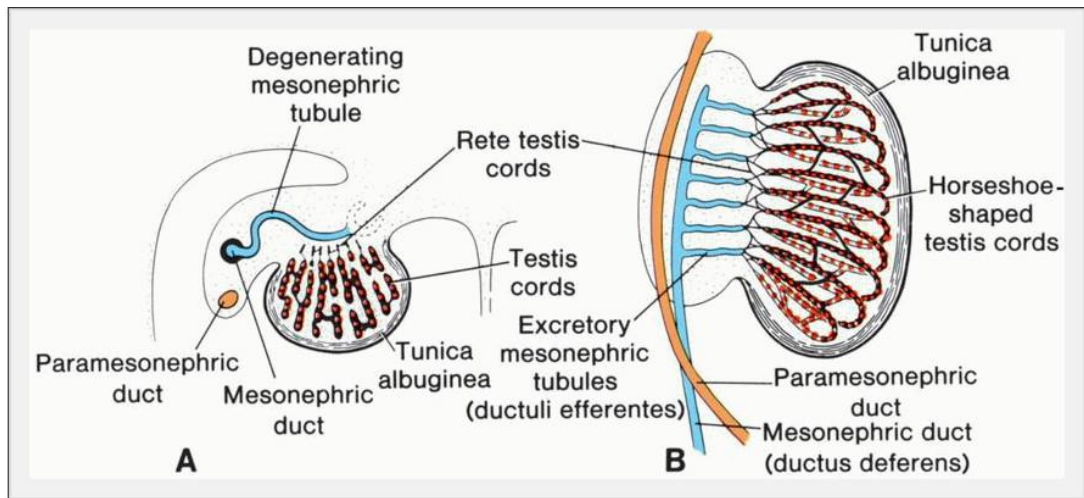
Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital sırtın epitel proliferasyon gösterir ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülü konumda olurlar. Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen irregüler şekilli kordonları meydana getirirler. Erkek ve dişi embriyoların her ikisinde de bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve henüz erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilemediği dönemdir. Bu dönemdeki gonad farklılaşmamış gonad olarak adlandırılmaktadır. İlk başta erkek ve dişi embriyoların

her ikisinde birden iki çift genital kanal mevcuttur ve bu kanallar; mezonefrik (wolffian) kanallar ve paramesonefrik (müllerian) kanallardır. Embriyo kural olarak öncelikle dişi geliştirmek üzere programlanmıştır, ilerleyen dönemde paramezonefrik kanalların gelişim yönü cinsiyeti belirleyici rol üstlenmeye başlar (Moore ve Persaud, 2002; Sadler, 2005; Dağdeviren ve Biricik, 2007b;).

1.3.2. İleri Haftalarda Testislerin Gelişimi:

Eğer embriyonun cinsiyeti genetik bakımdan erkek ise, primordiyal germ hücrelerinin sahip olduğu kromozomlar XY'dir. Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya meduller kordonları oluşturmak üzere, çoğalmaya devam edip medullanın derinliklerine doğru ilerleme gerçekleşir. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturacak ince hücre sıralarından oluşan bir ağ şeklinde yayılırlar. Gelişimin daha ileri evlerinde testis kordonlarının yüzey epiteliyle olan ilişkileri tunika albuginea adlı yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesiyle sona ermektedir.

Dördüncü ayda, testis kordonları atnalı şeklini alır ve bu atnalının uçları rete testis ile birlikte devamlılık gösterir (Şekil 1.5.). Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken almış sertoli destek hücrelerinden meydana gelmiştir (Kayalı ve ark., 1992; Moore ve Persaud, 2002;).



Şekil 1.5. Gelişimin 4. ayında erkek genital sistem ögelerinin görünümü (Sadler, 2011)

Gonadal sırtın orijinal mezenşiminden köken alan interstiyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklanmaya başlamasından hemen sonra gelişme gösterir. Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek duruma gelmiş olur.

Fetal testislerdeki Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron ve sertoli hücrelerinden salgılanan MIS (Müller inhibe edici faktör), erkekte dış genital organların gelişim göstermesi için var olmalıdır. Leydig hücrelerinden testosteron ve androstenedion salgılanması plesantadan salgılanan HCG'nin etkisiyle meydana gelir. Bu salgılar penisin büyümesini, penil üretranın gelişmesini, skrotum şişkinliklerinin birleşmesini, prostat, seminal vezikül ve bulboüretral bezlerin gelişmesini gerçekleştirir. Sertoli hücrelerinden salgılanan MIS(Müller inhibe edici faktör) ise Müller kanalının gelişiminin inhibe edilmesinde rol oynar.

1.3.3. Erkek Genital Sisteminin İletici Kısımlarının Embriyolojisi:

1.3.3.1. Duktuli Efferentesin Gelişimi;

Puberteye kadar solid halde kalmış olan testis kordonları pubertede lümenleri açılır ve seminifer tübüller haline dönüşürler. Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüleriyle birleşerek duktuli efferenteslere kadar ilerler. Bu eferent duktuslar mezonefrik sistemin geride kalmış boşaltım tübülleridir ve sayıları yaklaşık olarak 10-12 tane olup testis ile duktus epididimisi birbirine bağlamada aktivite gösterirler.

1.3.3.2. Duktus Epididimisin Gelişimi;

Mezonefrik kanallar en kranialdeki kısımları, apendiks epididim, dışında sebat ederek, ana genital kanalları oluştururlar. Mezonefrik kanallar efferent duktusların giriş yerinin hemen altından itibaren uzayıp, kıvrıntılı bir yapı halini alarak, duktus epididimin oluşumunu gerçekleştirirler. Spermilerin depolandığı ve spermilerin büyük ölçüde hareket kazandığı kısımdır.

1.3.3.3. Duktus Deferensin Gelişimi;

Mezonefrik kanalın, epidimin kuyruğundan, seminal vezikül tomurcuğuna kadar, kalın bir kas kılıfına bürünmesi ile oluşur. Seminal vezikül (glandula vezikuloza) duktus deferensin kaudal ucundan yanlara doğru çıkan tomurcuklarla birlikte

meydana gelir. Seminal vezikülün, sarı, yapışkan, fruktozdan zengin, hafif alkali bir yapıya ve spermilerin beslenmesi için önemli içeriğe sahip salgısı vardır.

1.3.3.4. Duktus Ejakulatoriusun Gelişimi;

Duktus deferensin seminal vezikülden sonraki parçasına ejakulatuar kanal denir. Parametonefrik kanallar erkeklerde kranial uçlarındaki küçük bir kısım dışında appendiks testis dejenere olurlar (Tosun, 1998; Şeftalioğlu, 1998; Sadler, 2005).

1.3.4. Dış Genital Organların Gelişimi;

Embriyonal gelişimin 3. haftasında kloaka membranını saran mezenşim dokusu kloaka katlantılarını oluşturmak için proliferer olur. Kloaka katlantıları, kranialde genital tüberkülü oluşturmak için birleşirler. Daha sonra uzayarak genital tüberkül fallusu meydana getirir. Kloaka membranı boyunca içte üretral katlantılar, dışta genital şişkinliklerde oluşum gösterir. Ürorektal septum kloaka membranıyla birleşerek gelişecek anal ve ürogenital membranın ayrılmasına olanak sağlamış olur. Bir hafta ya da daha sonra membranlar anal ve ürogenital orifisi oluşturmak için yırtılır. Kloaka katlantıları ise üretral katlantılar ve anal katlantılar olarak ayrılmış olur. Erkek dış genital organlarının gelişim göstermesi fetal testisler tarafından salgılanan androjenlere bağlı oluşur. Genital tüberkül penisi oluşturmak için uzar ve gelişim sürecinde üretral katlantılar üretral yarığı oluşturmak üzere birbirlerine yaklaşır. Üretral katlantılar spongiyoz üretrayı meydana getirmek için gelişmekte olan penisin ön yüzünde birleşirler. Glands penisin ucunda glandüler üretrayı oluşturacak ektoderm hücre kordonu belirmeye başlar ve spongiyoz üretraya doğru büyüme gerçekleşir. Genital şişkinlikler de skrotumu oluşturmak üzere birbirlerine karşı büyüyerek, kaynaşırlar. Kadında genital tüberkül çok daha az uzayarak klitorisi meydana getirir. Üretral katlantılar kapanmaz, labium minörlerin oluşumunu gerçekleştirir. Genital şişkinliklerin de kapanmaması ile labium majörleri oluşturulur. Erkek ve kadın cinsiyet karakteristiklerinin ayrılması 9. haftada belirginleşmeye başlar, fakat 12. haftaya kadar dış genital organlar belirgin bir şekilde ayırt edilememektedir (Tekelioğlu, 1995; Sadler, 2005; Karateke, 2013).

1.4.Kanser

Kanser, normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalar üzerindeki kontrolün kaybolması nedeniyle mutasyona uğramış bir hücrenin sınırsız çoğalması sonucu gelişen bir hastalıktır (Can, 2014). Normal hücrelerin fizyolojik koşullarda

belli bir kontrol altında; klonal olarak çoğalması, farklılaşması, bağımsız fakat koordineli fonksiyonlara sahip olması, organizmanın bir bölümünden farklı bir bölümüne taşınması, hasarlanma sonrası onarım olması veya olmaması gibi işlevleri kanser hücrelerinde bozulmuştur (Weinberg, 2013). Hücrelerin anormal şekil ve hızda büyümeye ve çoğalmaya başlamaları tümör adı verilen kitle oluşumuna neden olur. Tümörler davranışlarına göre ikiye ayrılır.

1. Malign (kötü) huylu tümörler; Genelde doğrudan komşu organ ve dokulara yayılma gösterip, lenfatik ve kan dolaşım sistemleri yoluyla metastaz kabiliyetlerine sahip, sınırları belirsiz kötü bir prognoza sahip tümörlerdir.

2. Benign (iyi) huylu tümörler; Komşu organ ve dokulara yayılma göstermeyip, tamamen çıkarıldığı takdirde tekrarlanmayan, sınırları belli, kanser olmayan tümörlerdir (Cooper, 1992).

1.4.1.Kanser Nedenleri

Hücrelerin kanserleşmesinde en sık görülen etkenler Proto-onkogenler, Onkogenler ve ayrıca Tümör baskılayıcı genlerde mutasyon veya yanlış ifadenedir. Mutasyonlar değişik etkenlere bağlıdırki bunlar içinde temel olarak; radyasyon, sigara, alkol, yanlış beslenme, kimyasal maddeler, genetik, yaş ve çevre kirliliği gibi nedenler yer almaktadır (Weinstein ve Joe, 2000). Küresel çapta kadınlarda en yaygın görülen meme kanseri iken erkeklerde en sık görülen kanserler ürogenital sistem kanserleridir. Testis kanseri, erkek ürogenital sistem tümörlerinin %13-23'ünü oluşturur. Testis tümörleri 20 – 40 yaş arası erkeklerde en sık rastlanan malign tümörlerdir ve % 90-95'ni Germ hücre tümörleri oluşturmaktadır (Chen ve Daneshmand, 2018).

1.4.2.Testis Tümörleri

•Germ hücreli tümörler

- Seminom
 - Spermatositik seminom
- Non-seminom
 - Embriyonal karsinom
 - Yolk sac karsinom (endodermal sinüs tümörü)
 - Koriyokarsinom

- Teratom (matür, immatür, malign içerikli)

- **Seks kord/gonadal stromal tümörler**

- Leydig hücreli tümörler
- Sertoli hücreli tümörler

- **Çeşitli özgül olmayan stromal tümörler**

- Ovaryan epitelyal tümörler
- Toplayıcı duktuslar ve rete testis tümörler
- Özgül olmayan stroma tümörleri (benign veya malign)

1.4.2.1. Germ Hücre Tümörleri

Germ (eşey) hücreleri, erkeklerde testislerde, kadınlarda overlerde (yumurtalıklarda) gelişen üreme hücreleridir. Bazen bu hücreler, göğüs kafesi, karın ya da beyin gibi vücudun diğer bölgelerine göç edip germ hücreli tümör adı verilen nadir kanser tipine sebep olabilirler. Germ hücreleri gelişim gösteren hücrelerin içinde oluşur ve genelde anormal bölgelerde yerleşim gösteren normal dokuları içerirler. En sık ve agresif testis tümör tipi olan germ hücreli tümörlerin seminom ve non-seminom olmak üzere iki türü vardır (Chen ve Daneshmand, 2018).

- **Seminom:** 30-50 yaş arasında en sık görülen germ hücre tümörüdür. Over disgerminomları ile histolojik olarak aynı görünümündedir. Sınırları belirgin, berrak hücreler (glikojen içeriği) yuvarlak nüve ve belirgin nukleolus içerir. Tümör büyük, yumuşak, testise sınır konumundadır. Tunika albuginea sağlamdır. Nekroz alanı olabilir. Az olguda HCG içeren sinsisyotroblast benzeri dev hücrelerin tek tek dağıldığı görülebilir ve bu prognozu etkilemez.
- **Spermatositik seminom:** 65 yaş üzeri görülen nadir bir tümördür. Çeşitli büyüklükte hücre içerir ve prognozu çok iyidir. Kromatin yapısının, mayotik fazdaki spermatositlere benzemesinden dolayı bu isim verilmiştir. Spermatositik seminomlar klasik seminomlara oranla daha yavaş büyürler ve vücudun diğer organlarına yayılım daha azdır (Iguchi ve ark., 2018).
- **Non – seminom:** Erkeklerde puberte döneminin bitiminden itibaren başlayıp 40'lı yaşların başlangıcına kadar görülen germ hücre tümörleridir. 4 temel

nonseminom tümör çeşidi vardır. Çoğu tümörler en az 2 farklı tipin karışımıdır.

- **Embriyonel karsinom:** seminomdan daha küçük olmakla birlikte sınırları belirsiz negroz alanı içeren agresif invaziv tümörlerdir. Diğer germ hücre tümörleri ile birlikte olabilirler. Bu tümörlerin mikroskopik görünüşleri embriyonun çok erken dönem görüntüsüne benzemektedir. Küçük bir kitle halindeyken bile metastaz yapıp hızlıca testis dışına yayılırlar (Gingu ve Mihai, 2016).
- **Yolk sac (Vitellüs Kesesi) karsinom:** Bu tümör çeşidi erken dönem insan embriyosunun yumurta kesesine benzetildiği için yolk sac ismi verilmiştir. Diğer isimleri endodermal sinüs tümörleri, çocukluk çağı embriyonel karsinom veya orkidoblastomdur. 3 yaş altı çocuklarda en sık raslanan tümör çeşidi olup iyi prognoza sahiptir. Yolk sac karsinomlar, yayılmış olsalar dahi kemoterapiye çok iyi cevap verirler. Bu tip tümörler kana alfa-feto protein (AFP) olarak bilinen bir protein yayarlar.
- **Koriyokarsinom:** Yetişkinlerde çok nadir rastlanan oldukça malign olan tümör çeşididir çok küçükken bile metastaz yapabilir ve küçük kitleler oluştururlar. Bu tür kanserler akciğer, kemik ve beyin gibi uzak organlara hızla yayılırlar. Saf koriyokarsinomun testiste görülme oranı düşüktür ve çoğunlukla diğer nonseminom kanserlerle birlikte mix germ hücre tümörlerinde görülür. Bu tip tümör kana human koriyonik gonadotropin (HCG) olarak bilinen bir protein yayarlar (Abdel-Qadir ve ark., 2017).
- **Teratom:** tüm yaşlarda görülebilen somatik hücre diferansiasyonu gösteren germ hücre tümörleridir. Çocuklarda yolk sac tümörlerinden sonra ikinci sırada görülür. Erişkinlerde sıklıkla embriyonal karsinom tümörler ile birlikte görülür. Bu tümörlerin 3 ana tipi matür teratom, immatür teratom ve teratomun malin dönüşümü şeklindedir.
- **Matür teratomlar:** Yetişkin doku hücrelerine benzer hücreler tarafından oluşan, çok nadir de olsa kenar dokulara ve uzak organlara yayılım gösteren tümörlerdir. Genellikle ameliyatla tedavi edilirler.

- **İmmatür teratomlar:** Erken embriyoya benzer hücrelerin az gelişmiş tümör çeşitleridir. Yakın dokularda gelişirler (invazyon) ve testis dışına yayılırlar (metastaz). Bu tür tümörler tedaviden yıllar sonra bile nüks edebilirler.
- **Malign dönüşümlü teratomlar:** Çok nadir rastlanan tümör çeşidi olup bazı alanlarda matür teratomlar gibi görünürken diğer alanlarda testis dışında (kaslar, akciğer, bağırsak bezleri veya beyin) gelişen kanserlerdir (Reekhaye ve ark., 2016).

1.4.2.2. Testis Kanserleri Tanı Yöntemleri :

• **Fizik muayene ve hikaye:** Hastanın genel muayenesinin yapılırken testiste ele gelen kitlenin genel yapısı değerlendirilir.

• **Ultrasonografi:** Testisin içyapısı, kitlenin özellikleri ve ebadlarına bakılarak kitlenin yapısı değerlendirilir.

• **Serum tümör markerleri:** Testis kanserinde, kanser hücreleri tarafından kana salgılanan bazı maddelerin (marker) serumdaki düzeylerinin ölçümü yapılarak kanser varlığı ve çeşidi belirlenir. Testis kanserinin aranmasında 3 tane tümör markeri bulunmaktadır.

- Alfa-feto protein (AFP)
- Beta-human chorionic gonadotropin (beta-HCG)
- Laktat dehidrogenaz (LDH)

• **Radikal inguinal orşiektomi ve biopsi:** Kasıktan yapılan bir insizyon ile testis kasıktaki bu kesiden dışarı alınarak kitleden biopsi tarzında örnek alınır. Alınan örnek patoloji olarak değerlendirilir (Gingu ve Mihai, 2016).

1.4.2.3. Testis Kanseri Tedavisi

Testis tümörlerinin tedavisi hastalığın evresi ve tümörün alt tipine göre uygun yöntemler kullanılarak yapılır. Testis kanseri için iki farklı ameliyat, kemoterapi ve radyoterapi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Radikal inguinal orşiektomi ameliyatı kanserin tüm evrelerinde ve türlerinde uygulanan yöntem olup testisin tümörlü kısmı çıkarılır (Ishihara ve ark., 2017). Retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu ameliyatı ise kanser hücrelerinin yakın lenf nodalarına yayılmış olabileceğine karşın karın arkasındaki lenf nodlaları çıkararak kanser hücreleri tahlil

edilir. Gelişmiş radyoterapi sistemleri daha çok erken evre seminomlarda yararlı olur ve testis içindeki erişmesi güç tümörler hedef alınarak kanserin yok edilmesi hedeflenir (Peckham ve ark., 1983). Vasküler yayılımı olan hastalarda kürler şeklinde kemoterapi uygulanmaktadır. Bu kemoterapi rejimine BEP protokolü denmektedir ve Bleomisin, Etoposid ve Sisplatin adlı kemoterapileri içermektedir. Testis kanserli hastalar için bu BEP protokolü yüksek oranda yaşam kurtarıcı potasiyele sahiptir(Gershenson ve ark., 1990). Orta ve kötü risk grubundaki metastatik testis nonseminomatöz germ hücreli tümörlerinin kürler şeklinde bleomisin, etoposid, sisplatin (BEP) uygulaması standart tedavi olmasının yanısıra BEP tedavisi bazen ciddi olabilen yan etki riski de taşımaktadır. Özellikle bleomisinin akciğer toksisitesine neden olduğu saptanmıştır (Maruyama ve ark., 2018). Bu tür olgularda yeni ve etkin tedavi ajanlarına ihtiyaç duyulmuştur.

1.4.2.4. Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar ilk olarak Georgers Köhler ve Cesar Milstein tarafından 1975 yılında antijenle immünize edilmiş farelerin B hücreleri ve myelom kanser hücrelerinin oluşturdukları hibridomalardan elde edilmiştir. Ve bu antikorlar kanser ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar tümör hücrelerindeki spesifik antijenlere karşı üretilen homojen antikor topluluklarıdır (Galluzzi ve Fridman, 2012). Monoklonal antikorlar kemoterapötik ilaçları veya radyoaktif partikülleri kanser hücrelerine götürmek için hedef olarak çalışırlar. Hibrit hücreler tarafından çoğaltılan homojen antikor toplulukları, bağışıklanmış fare veya ratlardan elde edilen dalak hücreleri ile myeloma adı verilen lenfoit tümör hücrelerinden geliştirilen melez hücreler tarafından üretilirler (Çırakoğlu, 2002). Monoklonal antikorların üretimi rekombinant DNA teknolojisi ve hibridoma teknolojisi ile gerçekleştirilmektedir (Bulut, 2002). Monoklonal antikorlar geleneksel tedavinin aksine antikor aracılığıyla tümör antijenlerine hedeflendikleri için hem spesifiktirler hem normal dokulara toksisiteyi görece çok daha düşüktür ve geliştirilen mekanizmalarıyla indeksleri çok daha fazladır (Koçoğlu ve Yalçınkaya, 1992).

Monoklonal antikorlar kanser hücrelerine karşı temel olarak üç farklı mekanizmayla etkinlik gösterirler:

- Kanser hücrelerinin membran antijenlerine bağlanan antikorlar;

- komplement aktivasyonu ile komplemente bağılı sitotoksisteyi (CDC)
- antikora bağılı hücrel sitotoksisteyi (ADCC) tetiklerler
- monoklonal antikorlar tümör hücrelerinin membranlarındaki hedef antijenlere bağlanmaları ile çeşitli mekanizmalarla tümör hücrelerinin ölümüne sebep olurlar (Galluzzi ve ark., 2012).

Birinci mekanizmada bağlanan antikorun sabit Fc fragmenti efektör hücreler olarak bilinen natürel killer ve monositlerde bulunan Fc gamma reseptörler tarafından tanınır (Weiner ve ark., 2010). Effektör hücreler bağlanma sonrası tümör hücrelerinde antikora bağılı sitotoksiste (ADCC)'yi uyarak hücrede apoptozun gerçekleşmesini sağlarlar (Boross ve Leusen, 2012).

İkinci mekanizmada monoklonal antikorun bağlandığı membran antijeni önemli bir büyüme faktörü veya büyüme faktörü reseptörüdür. Bağlanma sonucu büyüme faktörü reseptörünün uyardığı tümör gelişiminde önemli olan sinyal yolları engellenerek tümör gelişimi inhibe edilir veya tümör hücresinde apoptoz uyarımı gerçekleşir (Ladjemi ve ark., 2010).

Sonuç olarak; Kanser oluşumu, progresyonu, metastazı, kanserin immün sistem elemanlarını inaktif hale getirme, tümör büyümesini artıracak faktörleri salgılamasını sağlama ve kemoterapiye direnç geliştirme mekanizmaları gibi birçok alanda prelinik araştırmalar devam etmekte, kanserin moleküler ve hücrel biyolojisinin her geçen gün daha iyi anlaşıldığı görülmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan fazla sayıda monoklonal antikorlar bulunmaktadır. Bunların içinde son yıllarda öne çıkan önemli bir molekül Bevacizumab'tır (Galluzzi ve ark., 2012).

1.4.2.4.1. Bevacizumab

Tümör gelişiminde en önemli aşamalardan birisi angiogenez adı verilen yeni damarların oluşmasıdır. Yeni damar oluşumunda en önemli faktörlerden birisi VEGF'tir. Metastatik kanserli hastaların çoğunluğunda serumda VEGF seviyesinde artış gözlenmiştir (Mahfouz ve ark., 2017). Tümör neoangiogenezinde çok önemli bir rol sahip vasküler endotelial büyüme faktörü VEGF'e karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olan Bevacizumab birçok tümör tipinde çalışmaları devam eden

bir ajandır (Imai ve ark., 2017). Bevacizumab angiogenez inhibitörlerinden olup, tümör hücrelerinde yeni damar oluşumunu engel olur. Bevacizumab başlangıçta VEGF'ye bağlanır. VEGF tümör hücrelerinden yeni damar oluşumunu aktif hale getirmek için salınır. Bevacizumab VEGF'ye bağlanınca kan damarlarındaki endotel yüzeyinde bulunan VEGF reseptörüne bağlanmasını inhibe eder (Mori ve ark., 2017). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu endotel hücrelerinin büyümesi ve tümör için besleyici yeni kan damarlarının oluşumuna sebep olur. Bu büyüme ve yeni damar oluşumunun inhibe edilmesi, metaztazi engeller ve tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara karşı duyarlılığını artırır (Alvarez ve ark., 2011). Bevacizumab VEGF'e bağlanan IgG1 izotipinde humanize bir monoklonal antikordur. Bu antikor VEGF'e bağlanarak anjiyogenez aktivasyonunu engeller (Tuncer, 2008). Bevacimuzab metastatik kolorektal kanserli hastalarda kemoterapiyle beraber kombine edilerek uygulandığında hayatta kalma oranını anlamlı ölçüde artırmıştır (Nieto ve ark., 2017). Bevacimuzab metastatik kolorektal kanserde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde de klinik kullanım için onaylanmıştır (Hurwitz ve ark., 2004).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Etik Kurul

Çalışmamız kapsamında öncelikle Afyon Kocatepe Üniversitesi İnsan Etik Kurulu'ndan (AKÜİEK) etik çalışma onayı alındı(03.02.2017-2017/2/45).

2.2.Kullanılan Materyaller

- Human Testicular Germ Cell Line Tumour (HTGC) hücre hattı 1618-K (ACC752), Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) hücre bankasından temin edildi(Almanya).
- Bevacizumab,(Avastin, Roshe)
- Bleomisin, (Sigma, USA)
- Etoposit, (Sigma, USA)
- Cisplatin, (Sigma, USA)
- Fetal Bovine Serum, (Capricorn, Almanya)
- RPMI-1640, (Capricorn, Almanya)
- Görüntüleme cihazı, Nikon NIS 4.2 Image Analysis Software
- Primer hücre antikorlar olan Bax(sc-526), Bcl-2(sc-7382), VEGF(sc-7269), (Santa Cruz Biotechnology) ve Caspase 3(ab4051), (Abcam, UK) antikorları 1/50 dilüsyonda kullanıldı.
- Sekonder Kit; Large Volume HRP Polymer (RTU), (Thermo, USA)
- AEC Single /Plus (Abcam, UK)
- PBS, (Sigma, USA)
- Tween 2, (Merck Millipore, Almanya)
- Mayer's Hematoxylin, (Thermo, USA)
- Hydrogen Peroxide % 35 ,(Merck Millipore, Almanya)
- Methanol, (Merck, Almanya)
- Large Volume UltrAb Diluent, (Thermo, USA)
- Hydrophobic PAP PEN, (Japonya)
- Large Volume Vision Mount, (Thermo, USA)

2.3.Deney Grupları ve Hücre Kültürü

2.3.1. BEP Hücre Kültür Dozu Belirlenmesi

Çalışmamızda Human Testicular Germ Cell Line (HTGC) tümör hücre hattı üzerinde uygulanacak BEP üçlü kür ilacının ve Bevacizumab monoklonal antikorunun doz miktarları MTT sonucuna göre belirlendi. Daha önce yaptığımız literatür taramalarında BEP kombinasyonunun kullanıldığı sadece bir invitro çalışmaya rastladığımız için öncelikle bu doz BEP kombinasyonu uygulanmak suretiyle kültürde yer alan hücrelerin viabiliteleri belirlendi. Burada verilen 40 mM cisplatin, 50 mM etoposid ve 100 mM bleomisin kombinasyonu uygulandığında hücrelerin tamamına yakını öldüğü için dozun azaltılmasına karar verildi. Buna bağlı olarak 4 farklı grup oluşturuldu ve sırasıyla

1. Cisplatin 20 μ M + Etoposide 25 μ M+ Bleomisin 50 μ M
2. Cisplatin 10 μ M + Etoposide 12 μ M+ Bleomisin 25 μ M
3. Cisplatin 4 μ M + Etoposide 5 μ M+ Bleomisin 10 μ M
4. Cisplatin 2 μ M + Etoposide 2,5 μ M+ Bleomisin 5 μ M

Uygulanarak hücrelerin yarısını öldüren doz belirlendi. Buna göre Cisplatin 2 μ M + Etoposid 2,5 μ M+ Bleomisin 5 μ M dozunda MTT sonucuna göre %51 viabilite belirlendiği için bu dozun çalışmada temel BEP dozu olmasına karar verildi. Bu sürede dozlar öncelikle ampirik olarak belirlendi sonra elde edilen MTT sonuçlarına göre doz kesinleştirildikten sonra bu dozla birlikte farklı konsantrasyonlarda Bevacizumab uygulanarak MTT ölçümleri yapıldı ve viabiliteler hesaplandı. Bu sonuçlar göz önüne alındıktan sonra

1. **Kontrol Grup:** Cisplatin 2 μ M + Etoposide 2,5 μ M+ Bleomisin 5 μ M
2. **Grup 1:** (Cisplatin 2 μ M + Etoposide 2,5 μ M+ Bleomisin 5 μ M) +Bevacizumab 0,01 mg/ml
3. **Grup 2:** (Cisplatin 2 μ M + Etoposide 2,5 μ M+ Bleomisin 5 μ M) +Bevacizumab 0,05 mg/ml
4. **Grup 3:** (Cisplatin 2 μ M + Etoposide 2,5 μ M+ Bleomisin 5 μ M) +Bevacizumab 0,1 mg/ml

2.3.2. Hücre Pasajı

Human Testicular Germ Cell Line Tumour (HTGC) hücre hattı hücreleri %20 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %80 RPMI1640(Sigma) içeren kültür kaplarında 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücreleri çoğaltmak için yaklaşık cm karede 4×10^4 hücre yoğunluğu olacak şekilde 75 cm²'lik flasklara 3×10^6 hücre 20 ml besi yeri içeren kültür kabına (150-mm flask) konarak 2 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Süspansiyon steril kapaklı tüplere aktarılarak 400xg ve 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Bu peletten 2×10^4 hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp 96 kuyulu hücre kültürü kaplarının her kuyucuğuna aktarılarak MTT hücre viabilite testi uygulandı. Aynı peletin bir kısmı immunositokimyasal boyama yapılmak üzere 1 cc besi yeri ile tekrar süspanse edildi.

2.3.3. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi

2×10^4 hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl kadar alınıp 96 kuyulu hücre kültürü kaplarının her kuyucuğuna aktarıldı. Bevacizumab ile değişik dozlarda 37°C' de inkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edildi ve hücreler 37°C'de 2 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılıp ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dakika inkübe edildi. Renk değişimi, mikropleyt okuyucuda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi (Denizot ve Lang, 1986).

2.3.4. Immunositokimyasal Boyama

- Polilizin Kaplı her bir lam üzerinde hidrofobik PAP PEN kalem ile iki kuyucuk oluşturuldu.
- Her bir kriyoviyelde 1cc besi yeri içinde 1 milyon hücre olacak şekilde oluşturulan gruplardan 15 µl alınarak kuyucuklar içine damlatıldı.
- Hücrelerin lama yapışmaları için oda ısısında kuruyana kadar bekletildi.

- Hücre membranını açma (Hücre membranını daha geçirgen hale getirip, hücre bütünlüğüne zarar vermeden porlarını açmak için % 0,2'lik Tween 20 damlatılıp 20 dakika bekletildi).
- PBS ile 2 x 3 dakika yıkandı.
- 10 dakika %3 Metanol + Hidrojen peroksitte bekletilerek preparatlardaki endojen peroksidaz aktivitesinin kaldırılması sağlandı.
- PBS ile 2 x 3 dakika yıkandı
- İşaretleme
 - Her dört primer antikorda (Bax, Bcl-2, Caspase 3, VEGF) 1/50 oranda sulandırıldı ve kuyucuklar içinde bulunan hücreler üzerine damlatıldı.
 - Primer antikor damlatılan preparatlar buzdolabında 1 gece inkübe edildi.
 - İnkübasyondan sonra buzdolabından çıkarılan preparatlar oda ısısında 10 dakika bekletildi.
 - PBS ile 2 kez yıkandı.
- Antijen Antikor Reaksiyonunu Belirleme
 - Primary Antibody Enhancer solüsyonu damlatılıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
 - PBS ile 2 kez yıkandı.
 - HRP Polymer damlatılıp oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
 - PBS ile 2 kez yıkandı.
- Renklendirme
 - AEC single solüsyon damlatılıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
 - Distile suyla 2 kez yıkandı.
- Zıt Boyama
 - Mayers Hematoksilen'de 50 saniye bekletilerek zıt boyama yapıldı.
 - Distile su ile 3 kez yıkandı.
- Kapatma
 - Su bazlı kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

2.3.5. Preparatların Değerlendirilmesi ve Görüntü Analizi

Immunositokimyasal olarak yapılan boyamalar mikroskop altında değerlendirildi. Bu süreçte preparatlarda bulunan hücreler x40 objektif büyütme altında incelendi ve her

preparatda rastgele alanlarda olmak üzere toplam 500 hücre sayıldı. Bu hücrelerden immunpozitif olanlar immunonegatiflere oranlanmak suretiyle elde edilen değerler istatistiksel analizde kullanıldı. Bu sayım sürecinde tüm preparatlarda en az 32000 hücre sayımı gerçekleştirildi. Görüntü analizi ile immunpozitif ve immunonegatif hücreler Işık Mikroskobu (Nikon E-600) altında Nikon NIS 4.2 Image Analysis Software aracılığıyla sayıldı.

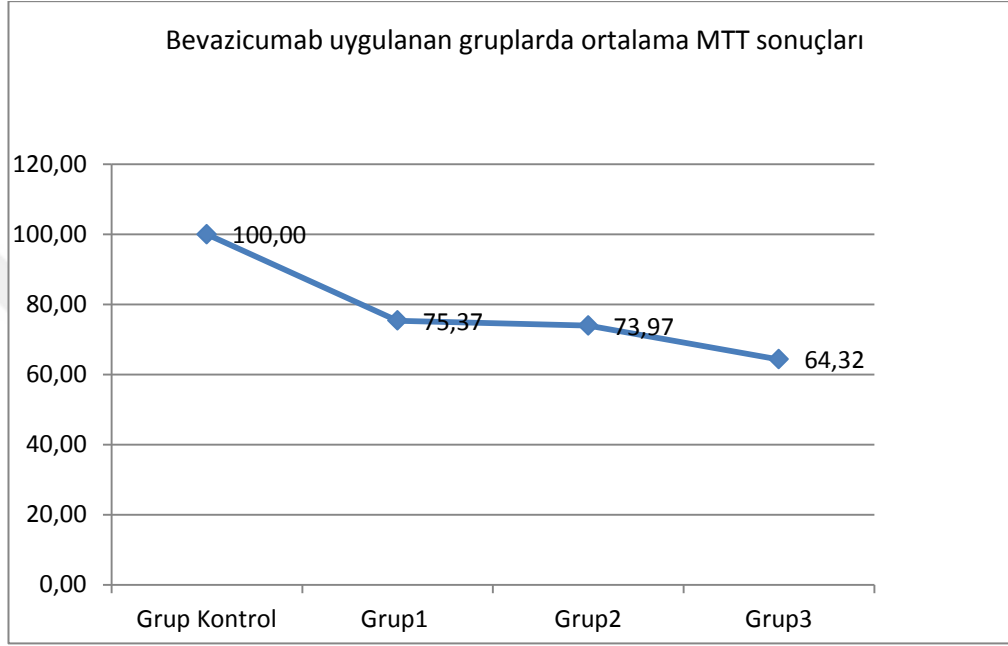
2.3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS for Windows 20.0 Ticari İstatistiksel Veri Analizi Programında analiz edildi. Veri analizinde gruptaki her bir kuyucukta yer alan immunopozitif ve immunonegatif hücre sayılarının birbirlerine oranlarının değişimindeki farklılığı analiz etmek için Kruskal-Wallis testi ve Bonferroni düzeltmeli Dunn testi kullanıldı.

3.BULGULAR

3.1. MTT test sonuçları:

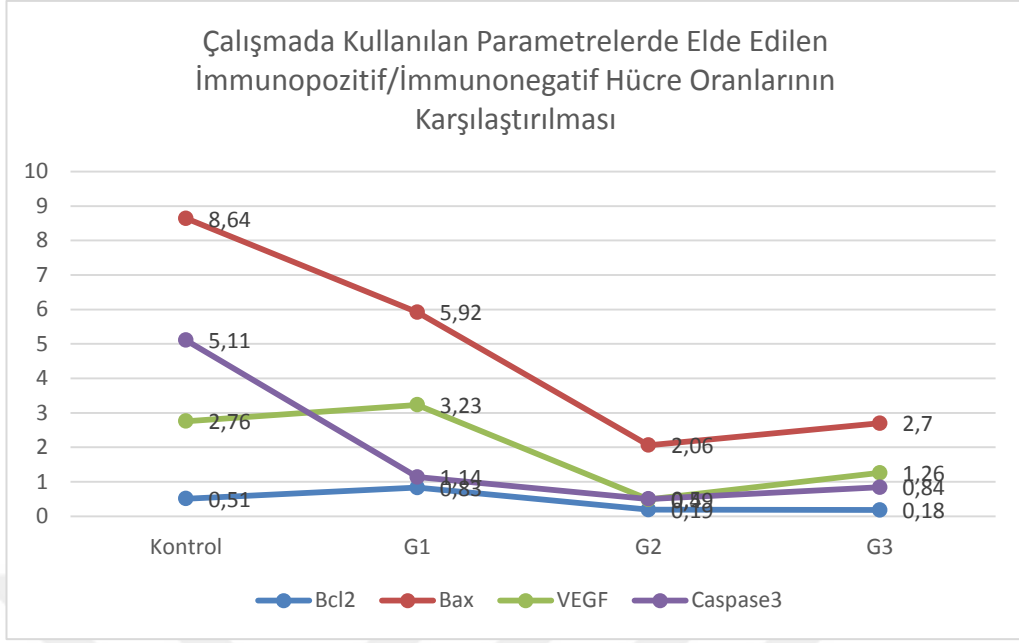
Gruplardaki hücrelerin viabilitelerinin tespiti için yapılan MTT testi sonuçlarına göre hücre viabilitesi artan bevazicumab dozuna paralel olarak azalmaktadır(Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bevazicumab uygulanan gruplarda ortalama MTT sonuçları

3.2.İmmunositokimyasal Boyama Analiz Sonuçları:

Yapılan ışık mikroskopik değerlendirmede her grupta mevcut olan immunositokimyasal boyanmış hücreler sayıldı. Sayım sırasında her grup ve her gruptaki her belirteç için immunopozitif hücrelerin immunonegatif hücrelere oranı hesaplandı(Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kullanılan parametrelerde İmmunopozitif ve İmmunonegatif Hücre Oranları

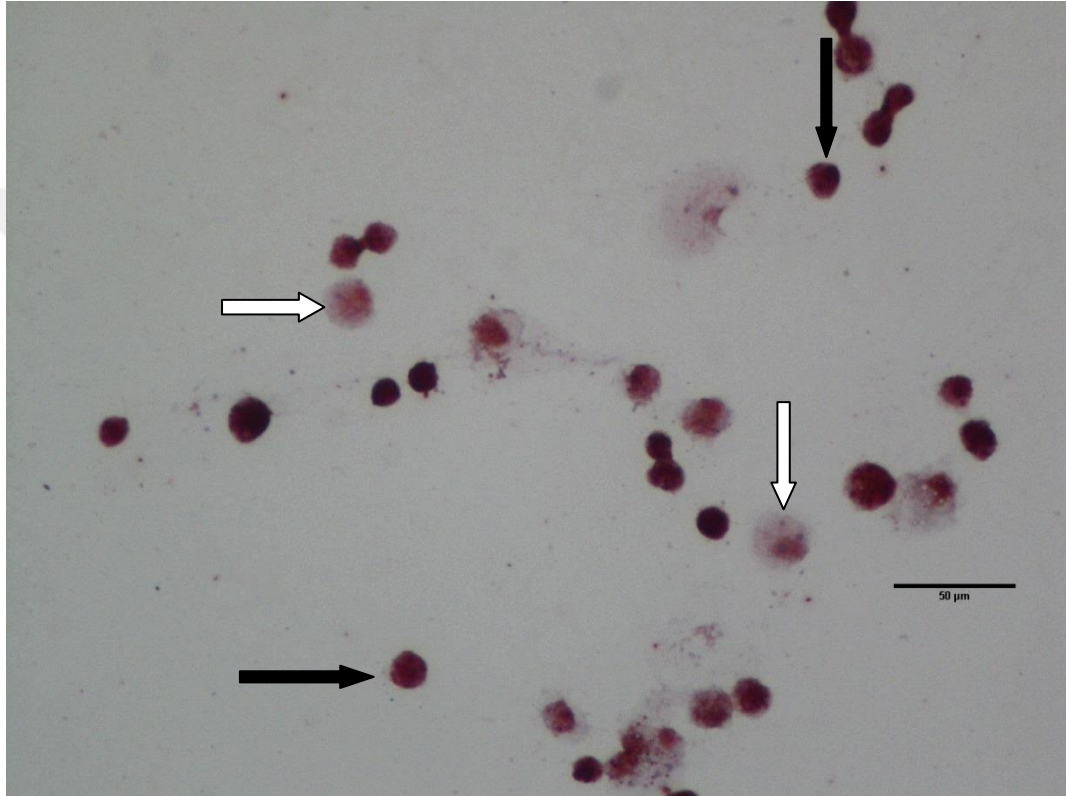
Aşağıda gruplarda elde edilen boyanmalar sırasıyla gösterilmiştir. Bu boyanmalar değerlendirildiğinde; Bax ekspresyonunun artan bevazicumab dozuna bağlı olarak azalma gösterdiği bu azalmanın Kontrol, G2 ve G3 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) ama G1 grubu arasında anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Ekspresyonda Kontrol grubuna göre G1 ve G2 gruplarında azalma olmasına karşın G3 grubunda G2'ye göre hafif artış olması bu iki grup değerleri arasında anlamlı farklılık olmadığı için ihmal edildi ($p > 0.05$), (Resim 3.1A., Resim 3.2A., Resim 3.3A., Resim 3.4A.).

Bcl-2 ekspresyonunun kontrol grupları dahil tüm gruplarda çok düşük seviyede olması ve bu değerlerin gruplar arasında farklılık göstermemesi ($p > 0.05$) nedeniyle bcl2 ekspresyonunun bu hücre hattı hücrelerinde eksprese olmadığı yani herhangi bir hücre ölümü uyarımı yapmadığı belirlenmiş oldu (Resim 3.1B., Resim 3.2B., Resim 3.3B., Resim 3.4B.).

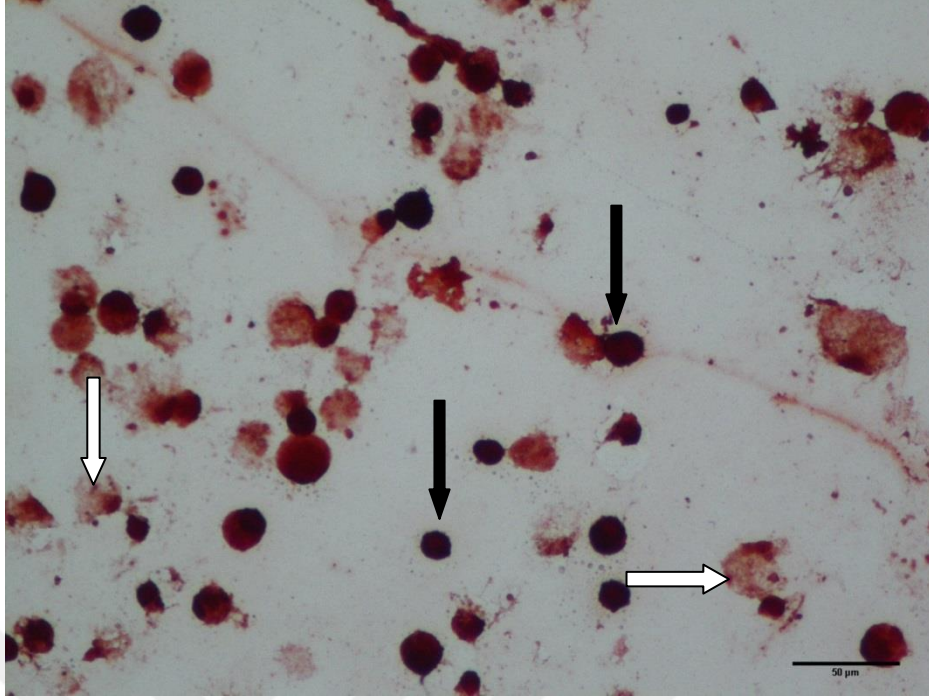
Diğer yandan Caspase 3 ekspresyonunun/inhibisyonunun değerlendirilmesinde Caspase 3 ekspresyonunun artan bevazicumab dozuna bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı ($p < 0.05$) gözlemlendi (Resim 3.1C., Resim 3.2C., Resim 3.3C., Resim 3.4C.).

VEGF ekspresyonu değerlendirilmesinde ise G1 yani en düşük doz bevacizumabın kullanıldığı grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da VEGF ekspresyonunda artma olmasına ($p>0.05$) karşın G2 ve G3 gruplarında anlamlı şekilde azalma olduğu ($p<0.05$) tespit edildi (Resim 3.1D., Resim 3.2D., Resim 3.3D., Resim 3.4D.).

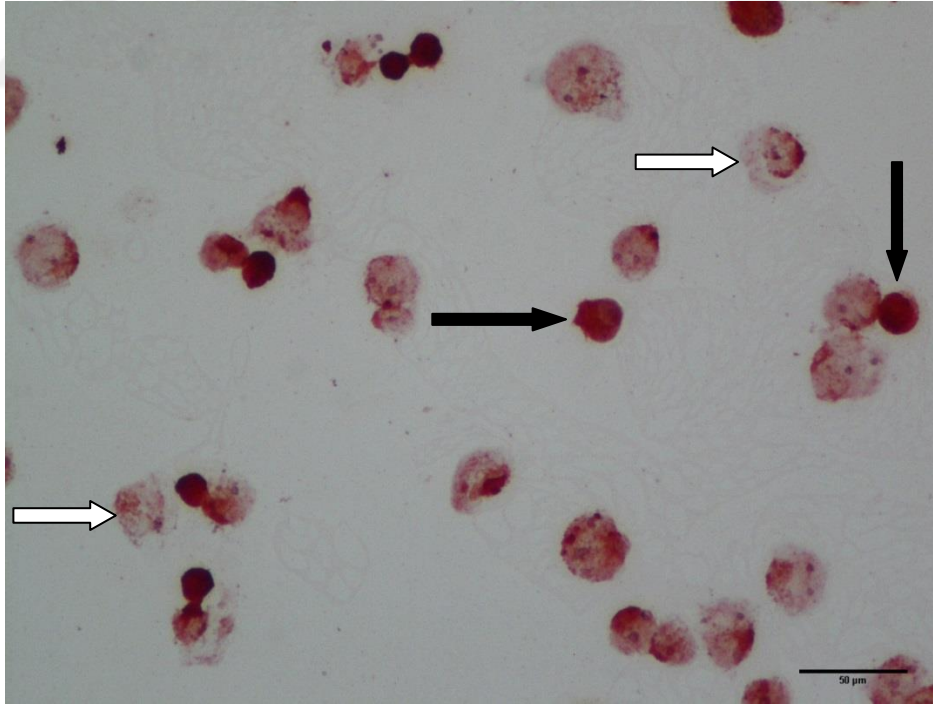
Gruplarda Bax protein ekspresyonları;



Resim 3.1A. Kontrol grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor. 1/50 X20. (⇐ : İmmünonegatif hücre; ➡ : immünopozitif hücre)



Resim 3.2A. G1 grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor. 1/50 X20.(⇨ : İmmünonegatif hücre; ➡ : immünopozitif hücre)

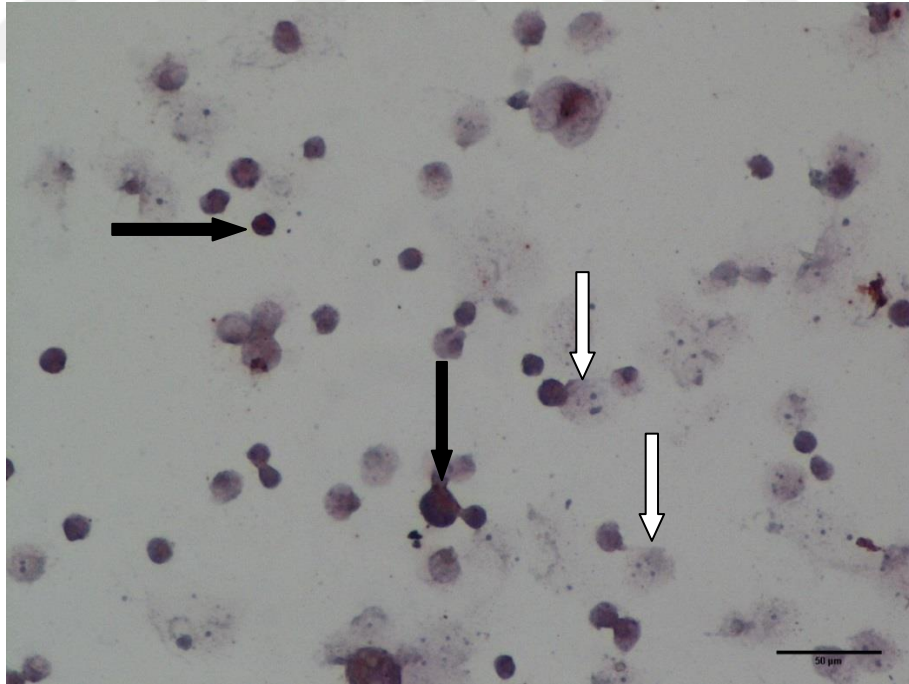


Resim 3.3A. G2 grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor. 1/50 X20.(⇨ : İmmünonegatif hücre; ➡ : immünopozitif hücre)

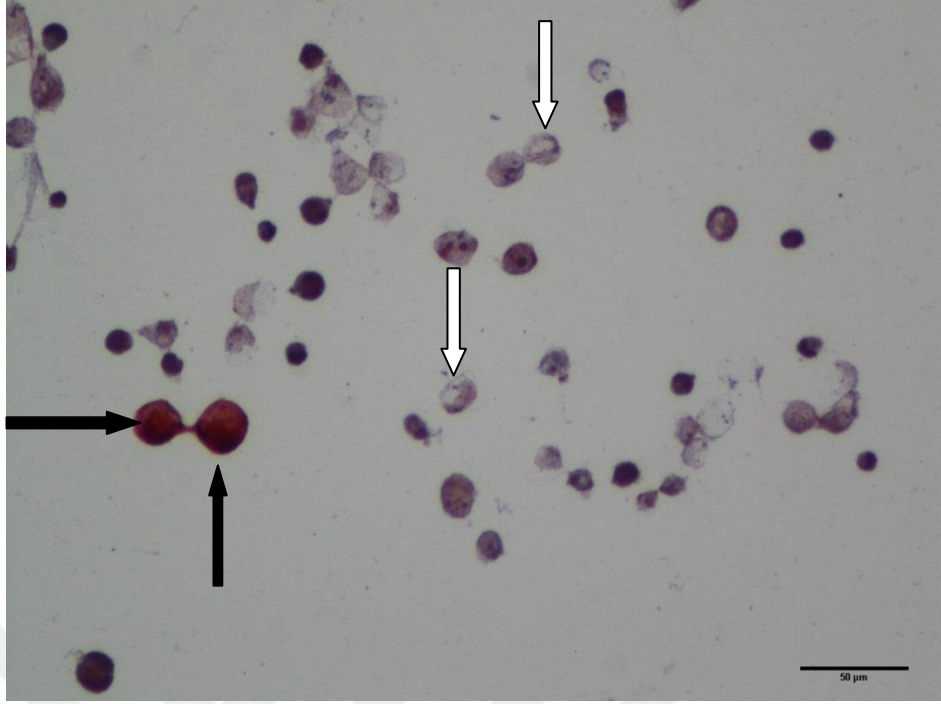


Resim 3.4A. G3 grubunda görülen Bax pozitif ve negatif hücreler. Anti-Bax Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\blackrightarrow$: immüno pozitif hücre)

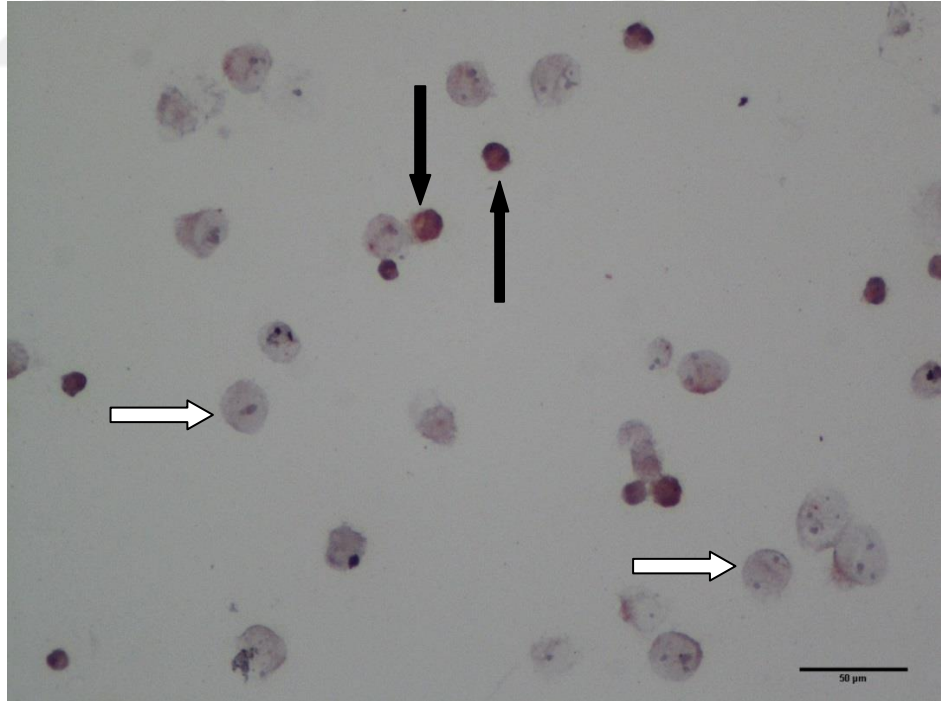
Gruplarda Bcl-2 protein ekspresyonları;



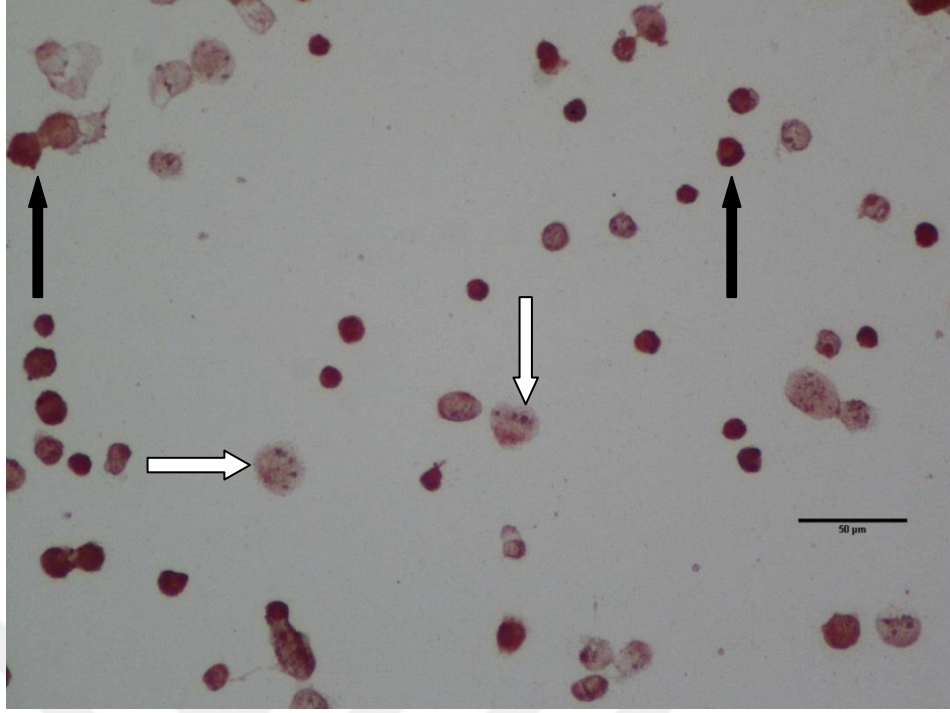
Resim 3.1B. Kontrol grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\blackrightarrow$: immüno pozitif hücre)



Resim 3.2B. G1 grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\Rightarrow$: immünopozitif hücre)

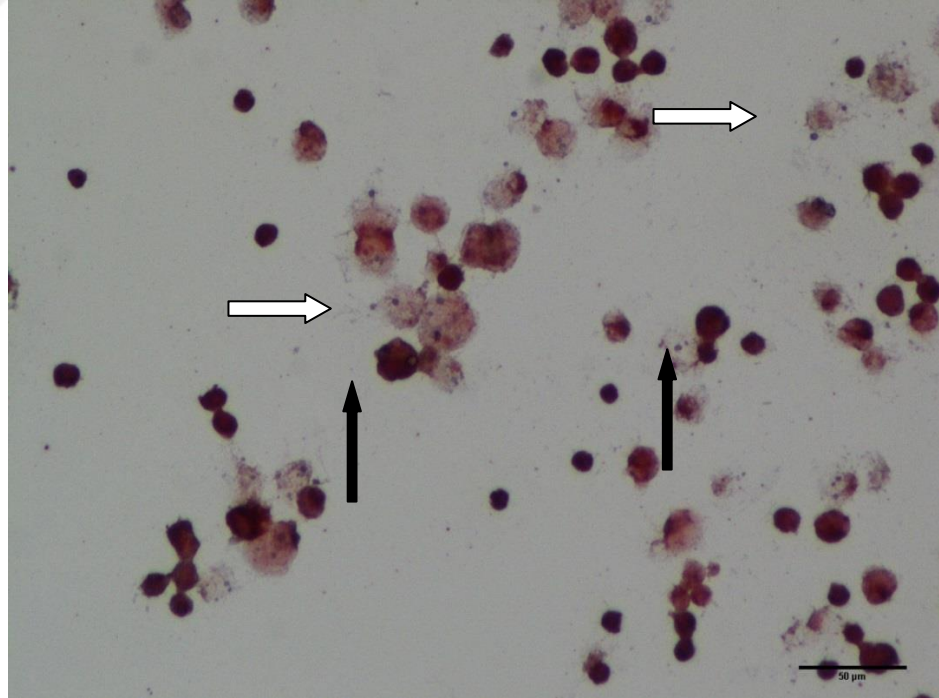


Resim 3.3B. G2 grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\Rightarrow$: immünopozitif hücre)

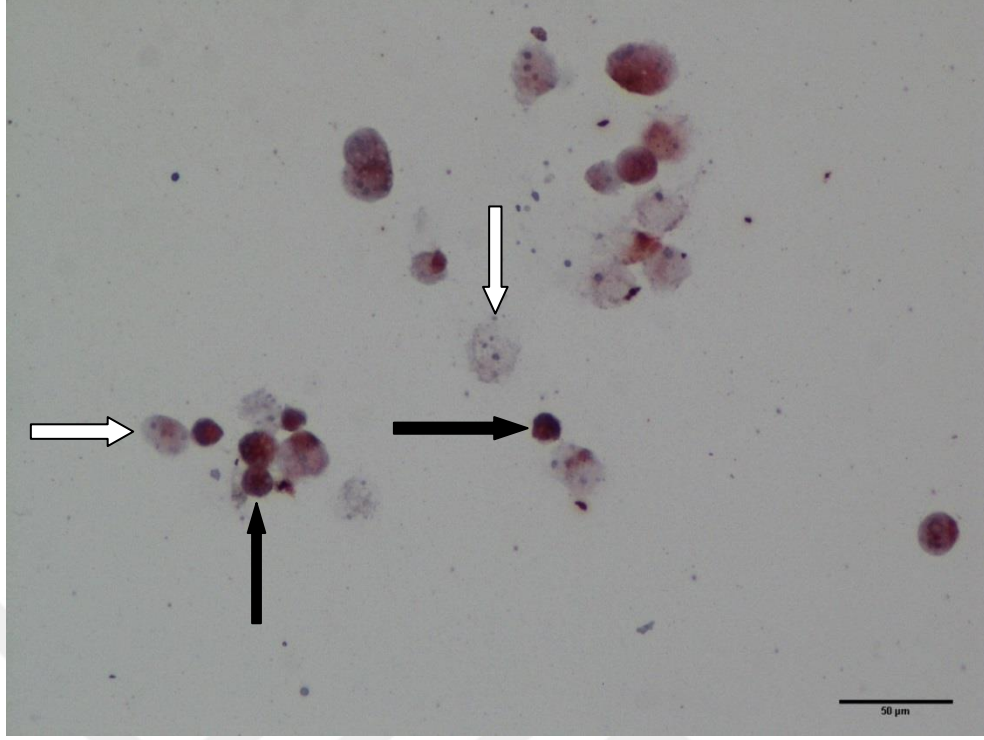


Resim 3.4B. G3 grubunda görülen Bcl-2 pozitif ve negatif hücreler. Anti- Bcl-2 Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\blackrightarrow$: immünopozitif hücre)

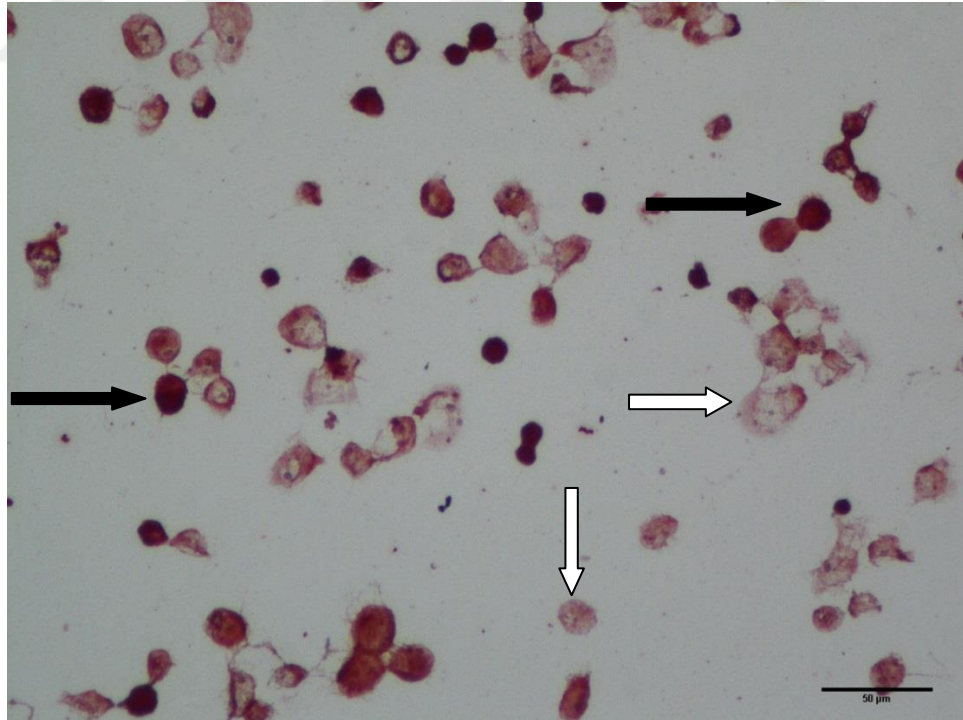
Gruplarda Caspase -3 Ekspresyonları;



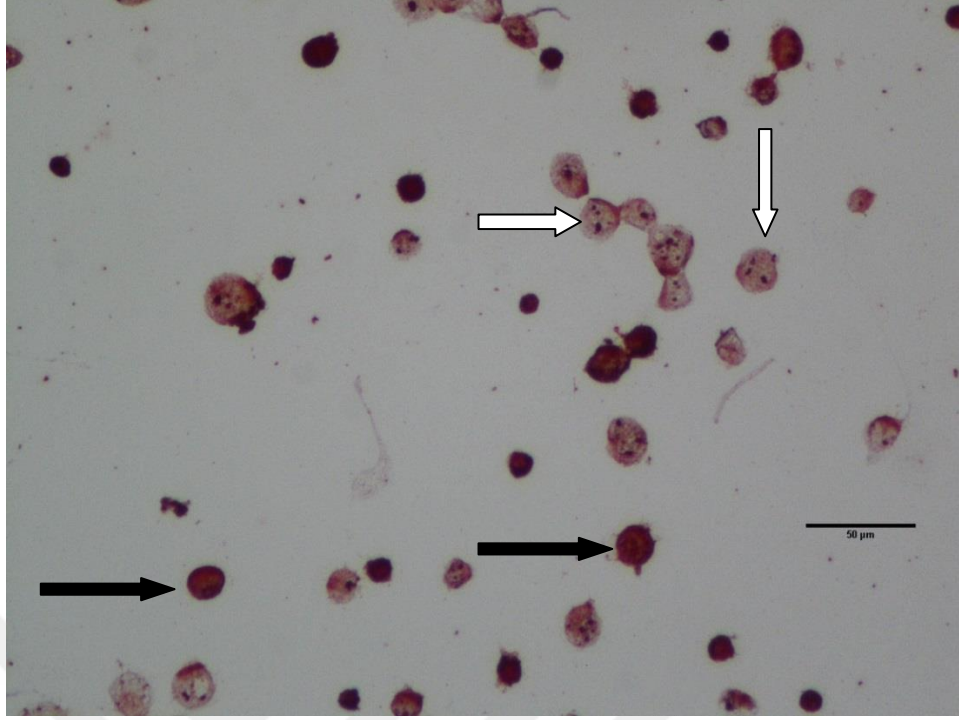
Resim 3.1C. Kontrol grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler. Anti-Caspase-3 Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\blackrightarrow$: immünopozitif hücre)



Resim 3.2C. G1 grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler. Anti-Caspase3 Primer antikor.1/50X20.(⇨: İmmünonegatif hücre; ➡: immünopozitif hücre)

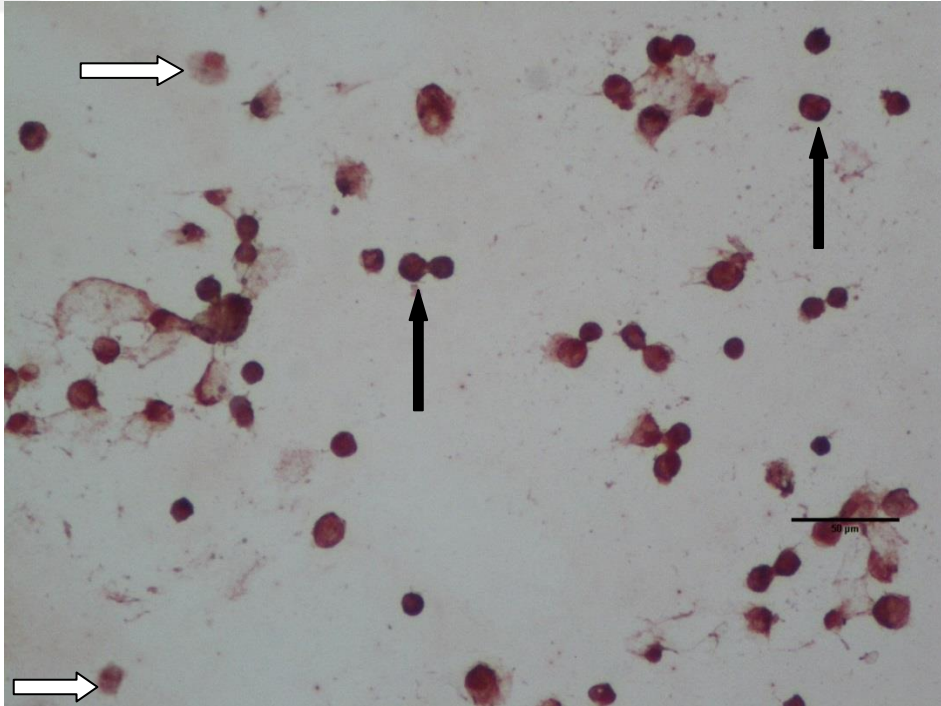


Resim 3.3C. G2 grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler. Anti-Caspase-3 Primer antikor.1/50 X20.(⇨: İmmünonegatif hücre; ➡: immünopozitif hücre)

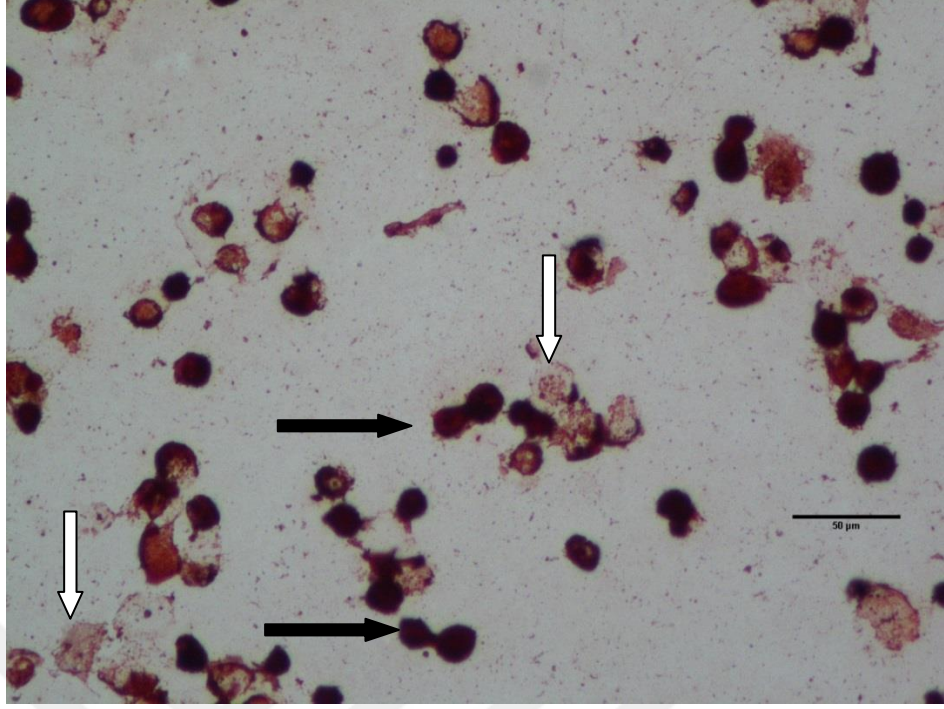


Resim 3.4C. G3 grubunda görülen Caspase-3 pozitif ve negatif hücreler. Anti-Caspase-3 Primer antikor.1/50 X20 .(⇨ : İmmünonegatif hücre; ⇨ : immünopozitif hücre)

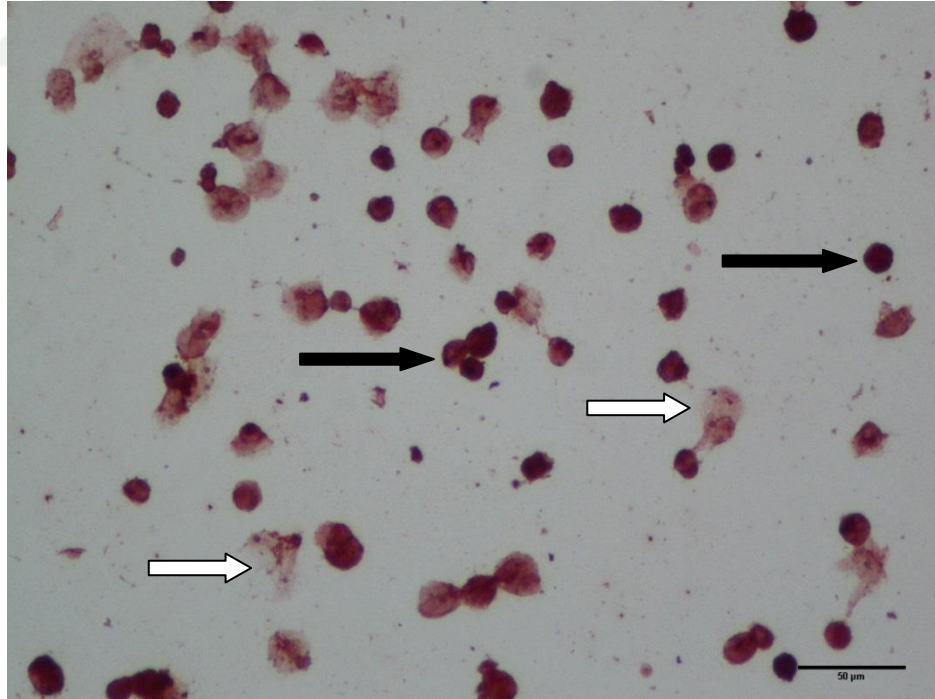
Gruplarda VEGF protein ekspresyonları;



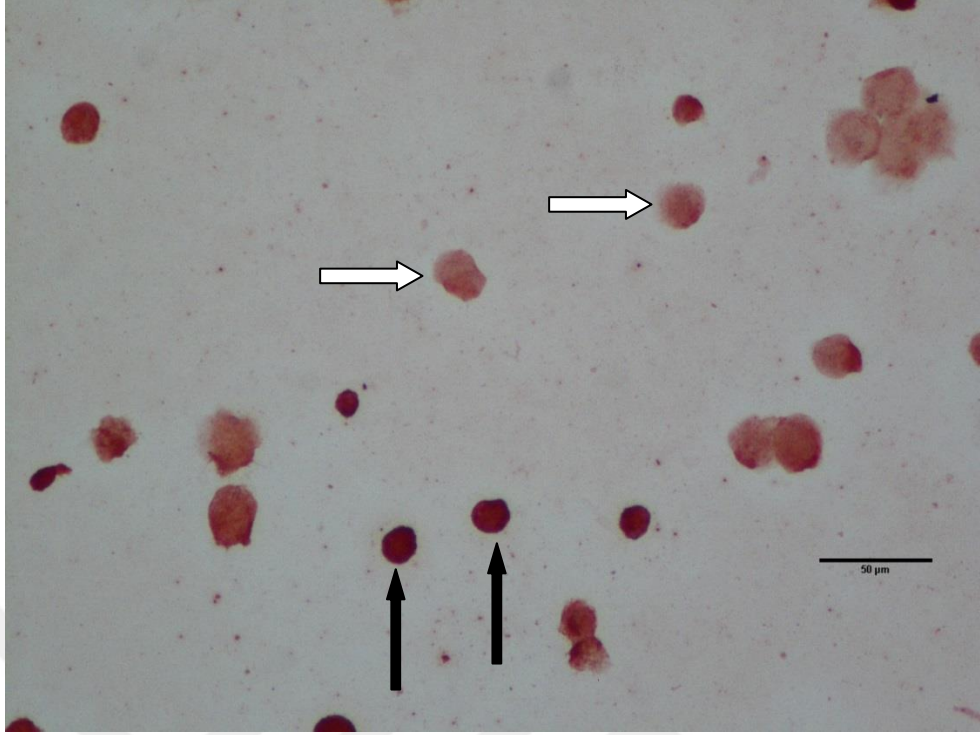
Resim 3.1D. Kontrol grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20 .(⇨ : İmmünonegatif hücre; ⇨ : immünopozitif hücre)



Resim 3.2D. G1 grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\Rightarrow$: immünopozitif hücre)



Resim 3.3D. G2 grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20.($\Rightarrow$: İmmünonegatif hücre; $\Rightarrow$: immünopozitif hücre)



Resim 3.4D. G3 grubunda görülen VEGF pozitif ve negatif hücreler. Anti-VEGF Primer antikor.1/50 X20. (⇒ : İmmünonegatif hücre, → : immünopozitif hücre)

3.3.İstatistiksel Analiz Sonuçları:

Çalışmada dikkate alınan antikorlara ait tanımlayıcı istatistik olarak ortalama, ortanca ve standart sapma değerleri Tablo 3.1.'de verilmiştir. Grupların dikkate alınan antikorlar bakımından görsel olarak karşılaştırılmasında yararlanılmak üzere sütun grafiği çizilmiştir. Gruplar arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır(Tablo 3.1.). Testten elde edilen sonuçlar Tablo 3.2.'de verilmiştir. Bax, Caspase3 ve VEGF antikorları bakımından gruplar arasında fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Farklılığı yaratan grup ya da grupların belirlenmesinde ise çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni düzeltmeli Dunn Testi'nden yararlanılmıştır(Tablo 3.2.)

Groups		Bax	Bcl2	Caspase3	VEGF
Kontrol	N	4	4	4	4
	Mean	8,6350	,5075	5,1075	2,5750
	Std. Deviation	2,57087	,26462	3,82952	,72136
	Median	8,3450	,5350	3,7000	2,6500
G1	N	4	4	4	4
	Mean	5,9150	,8350	1,4050	3,2250
	Std. Deviation	2,85987	,63338	,49400	1,02165
	Median	6,2450	,7700	1,2350	2,9100
G2	N	4	4	4	4
	Mean	2,0575	,1875	,4900	,4850
	Std. Deviation	1,04853	,13745	,08981	,13577
	Median	1,9350	,1800	,4850	,4750
G3	N	4	4	4	4
	Mean	2,7050	,1800	,8350	1,2950
	Std. Deviation	1,22965	,19442	,12767	,20632
	Median	2,5100	,0950	,8600	1,2750
Total	N	16	16	16	16
	Mean	4,8281	,4275	1,9594	1,8950
	Std. Deviation	3,30282	,42809	2,57379	1,24346
	Median	3,8450	,3050	,9850	1,6450

Tablo 3.1.Gruplar arasında istatistiksel farklılıkların gösterildiği SPSS PostHoc (Tukey) tablosu ve Kruskal-Wallis testi sonuçları.

	Bax	Bcl2	Caspase3	VEGF
Kontrol	8.63±2.57 ^c (8.34)	0.50±0.26 ^a (0.53)	5.10±3.82 ^c (3.70)	2.57±0.72 ^{bc} (2.65)
Grup 1	5.91±2.85 ^{bc} (6.24)	0.83±0.63 ^a (0.77)	1.40±0.49 ^{bc} (1.23)	3.22±1.02 ^c (2.91)
Grup 2	2.05±1.04 ^a (1.93)	0.18±0.13 ^a (0.18)	0.49±0.08 ^a (0.48)	0.48±0.13 ^a (0.47)
Grup 3	2.70±1.22 ^{ab} (2.51)	0.18±0.19 ^a (0.09)	0.83±0.12 ^{ab} (0.86)	1.29±0.20 ^{ab} (1.27)
P*	0.015	0.063	0.003	0.005

*: Kruskal-Wallis testinden elde edilmiştir.

Tablo 3.2. Aynı sütunda farklı harfler gruplar arasında fark olduğunu gösterir.

4.TARTIŞMA:

Genç ve orta yaşlı erkeklerde görülen testiküler tümörler genelde büyük oranda tedavi edilebilen kanser türleridir. Görülme insidensi yaşa bağlı artmakta olup genelde germinal dokudan orijin alır. Tedaviler geçen yıllara göre ciddi şekilde artmakta olmasına karşın kullanılan antitümör ilaçlar, kemoterapotikler ve gerektiğinde radyoterapiye bağlı komplikasyonlar ciddi sorun yaratmaktadır. Günümüzde en etkin GCTT tedavi daha önceden bahsedildiği üzere cisplatin, etoposid ve bleomisin kombinasyonudur. Ciddi yan etkiler nedeniyle bu tedavi kombinasyonuna bağlı işitme kaybı, anemi gibi önemli klinik tablolar karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle alternatif kemoterapotikler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu çalışmalara eşlenik olarak son yıllarda giderek önemi ve etkinliği konusunda ciddi araştırmalar yapılan ve önemli gelişmeler elde edilen VEGF blokeri bevacicumab molekülünün bu tümörde etkinliğini belirlemeyi amaçladık. Bu hipotezimizin nedeni; bilindiği üzere VEGF blokerleri yeni damar oluşumunu bloke eden antidamar monoklonal antikorlardır. Tümörlerde bilhassa invazyon ve metastaz klinik tabloyu ağırlaştıran önemli sorunlar olduğu için bu ilaçların etkinliğinin olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu çalışmalarda hastalara ait solid tümöral dokular üzerinde çalışmalar yapıldığı için bu ilaçların dokulardaki anti-VEGF yani damar oluşumunu engelleyici etkileri incelenmiştir. Oysa biz çalışmamızda bevacicumabın anti-VEGF etkinliği ötesinde antitümöral etkisi olup olmadığını belirlemek istedik. Bu amaçla çalışmamızda hücre kültürü uygulaması yapılmasını tercih ettik. Gerek GCTT hastası sayısının çok az olması ve gerekse etik sıkıntılar nedeniyle çalışmada hazır hücre hattı kullanmanın daha uygun olduğuna karar verdik. Bu amaçla DSMZ firmasından elde edilen GCTT hücre hattı ile çalışmanın yapılması planlandı. Ancak literatürde yaptığımız geniş çaplı araştırmada ilginç olarak GCTT hücre hattı ve BEP kombinasyonu kullanılan sadece 1 çalışmaya rastladık(Liu ve ark., 2014). Bu doz üzerinde çalışmamızı gerçekleştirdiğimizde en düşük dozda bile hücrelerin viabilitesinin sadece %20 olması bize dozlar üzerinde yeni düzenleme yapmamız gerekliliğini ortaya koydu. Bu amaçla klasik metodlar kullanmak suretiyle farklı dozlarda çok sayıda kombinasyonlar yapmak suretiyle hücre hattındaki %50 hücre ölüm değerini yakalamaya çalıştık. Bu dozu belirledikten sonra bu dozu temel doz kullanmak suretiyle ve farklı miktarlarda bevacicumab

dozlarıyla kombine etmek suretiyle hücrelerdeki viabiliteler ölçüldü. Sonrasında immunositokimyasal olarak aynı hücrelerde VEGF, Caspase3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları belirlendi. Bu ögeler gözönünde tutulduğunda yaptığımız çalışmada tamamen yepyeni bir yaklaşım geliştirdik ve literatürde GCTT dokusunda bile aynı zamanda çalışılmamış parametreler kullanmak suretiyle çok önemli sonuçlar elde ettik.

Germ hücreli tümörlerde cisplatin, bleomisin ve etoposid kombinasyonu uzun yıllardır kullanılmaktadır(Gershenson ve ark., 1990). Ancak günümüzde yapılan çalışmalarda BEP kombinasyonu içindeki her bir kemoterapötik gerek dozlarında ve gerekse alternatif formlarında kullanımı ile etkenlik arttırılmaya ve yan etkiler azaltılmaya çalışılmaktadır. Yapılan bir çalışmada cisplatin yerine karboplatin kullanılmış ama tedavide etkinlik olmadığı gözlenmiştir (Feldman, 2018). Yine sitotoksik kemoterapiyi geciktirme etkisine sahip filgrastim formu olan pegfilgrastim'in BEP tedavisinde yan etkileri önleme yönünde ciddi olumlu etkileri ortaya konmuştur (Iwamoto ve ark., 2018). BEP ögelerinden olan bleomisine bağlı pnömoni tedavi süresince görülen ciddi komplikasyonlardan bir tanesidir. Yapılan bir çalışmada bu komplikasyonun görüldüğü tedaviler sırasında tedaviden bleomisin çıkartılmasının yaşam süresini etkilemediği ortaya konmuştur (Maruyama ve ark., 2018).

BAX geni, Bcl-2 protein ailesinin ilk tanımlanmış pro-apoptotik üyesidir(Oltvai, Milliman ve Korsmeyer, 1993). Sağlıklı memeli hücrelerinde, Bax'ın çoğunluğu sitoplazmada bulunur, fakat apoptotik sinyalin başlatılması üzerine Bax, konformasyonel bir değişime uğrar. Apoptozis indüksiyonu üzerine özellikle mitokondriyal membran üzerinden ilişkilidir (Gross ve Korsmeyer, 1998). Bax ekspresyonu, tümör baskılayıcı protein p53 tarafından yukarı regüle edilir. p53 aracılı apoptozda Bax çok önemli rol oynar yani proapoptotiktir. P53 proteini, hücrenin strese tepkisinin bir parçası olarak aktive edildiğinde, BAX dahil olmak üzere birçok alt hedef genini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Miyashita ve Reed, 1995). Çalışmamızda hücre hattına bevazicumab uygulanması sonucu artan doza bağlı olarak hücre viabilitesinde azalmanın giderek artması bize bevazicumabın GCTT hücreleri üzerine sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak resimde

görüldüğü üzere Bax ekspresyonunun artan doza bağlı olarak belirgin şekilde azalması bu süreçte bevazicumabın Bax yolağı üzerinden hücre ölümünü sağlamadığını göstermektedir.

İnsanlarda Bcl-2 geni tarafından kodlanan Bcl-2 pro-apoptotik veya antiapoptotik etki yaparak hücre ölümünü düzenler. Bcl-2, hücre sağkalımının desteklenmesinde ve pro-apoptotik proteinlerin etkilerinin inhibe edilmesinde önemli bir rol oynadığı mitokondrinin dış zarında yer alır. Bax ve Bak dahil olmak üzere Bcl-2 ailesindeki pro-apoptotik proteinler, apoptosis kaskadında önemli sinyaller olan sitokrom C ve ROS'un geçirgenliğini ve serbest kalmasını desteklemek için normal olarak mitokondriyal membran üzerinde etki ederler (Hardwick ve Soane, 2013). Bizim çalışmamızda da Bcl2 ekspresyonlarının gruplar arasında anlamlı değişiklik göstermemesinin bevazicumabın bu hücre tümör tipinde sitotoksik etkinliğinin olmadığını göstermektedir.

Başlangıçta vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak bilinen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) hücreler tarafından üretilen ve kan damarlarının oluşumunu uyaran bir sinyal proteindir(Senger ve ark., 1983). VEGF ailesi memelilerde beş üyeden oluşur: VEGF-A, plasenta büyüme faktörü (PGF), VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D. İkincisi, VEGF-A'dan daha sonra keşfedilmiştir. Virüsler (VEGF-E) tarafından kodlanan ve bazı yılanların (VEGF-F) zehirlenmesinde bulunan bir dizi VEGF-ilişkili protein de keşfedilmiştir. VEGF-A'nın aktivitesi, adından da anlaşılacağı gibi, birçok başka hücre tipine etkide bulunmasına rağmen, çoğunlukla vasküler endotelyumun hücreleri üzerinde çalışılmıştır. İn vitro olarak VEGF-A'nın endotel hücre mitojenezini ve hücre göçünü uyardığı gösterilmiştir. VEGF-A ayrıca bir vazodilatördür ve mikrovasküler geçirgenliği artırır ve başlangıçta vasküler geçirgenlik faktörü olarak adlandırılır (Holmes ve ark., 2007). Çalışmamızda anti-VEGF özellikte olan bevazicumabın en düşük doz uygulanan grupta anlamlı düzeyde olmasada artış göstermesine karşın G2 ve G3 gruplarında belirgin şekilde azalması bevazicumabın yüksek dozlarda bu tümör hücre hattı üzerinde etkisinin olmadığını göstermektedir. Düşük doz olan G1 grubundaki artış ise anlamlı düzeyde olmadığı için değerlendirmede göz ardı edilmiştir. Bu sonuçlara göre GCTT tümör hattında bevazicumab düşük dozda daha belirgin anti-VEGF etki göstermektedir ve bu

bakımdan doz ayarlanması için ileri çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz. Ancak yinede elde edilen bulgular bu tümör hattında in vitro ortamda bevacizumabın antiVEGF etkisinin düşük olduğunu ortaya koyduğunu da düşünmekteyiz.

Caspase 3 proteini, sistein-aspartik asit proteaz (kaspaz) ailesinin bir üyesidir (Inemri, Livingston ve ark., 1996). Kaspazların ardışık aktivasyonu, hücre apoptozunun yürütme evresinde merkezi bir rol oynar. Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak üzere dimerize olan büyük ve küçük iki alt-birim üretmek için korunmuş aspartik artıklarda proteolitik işlemde geçirilen aktif olmayan proenzimler olarak bulunurlar. Bu protein kaspazları 6 ve 7'yi ayırır ve harekete geçirir ve proteinin kendisi 8, 9 ve 10 kaspazları tarafından işlenir ve aktive edilir (Gervais ve ark., 1999). Kaspaz-3, hem ekstrinsik (ölüm ligandı) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollarla apoptotik hücrede aktive edilir (Salvesen, 2002). Kaspaz-3'ün zimogen özelliği gereklidir çünkü eğer düzenlenmemişse, kaspaz aktivitesi gelişigüzel hücreleri öldürür (Boatright ve Salvesen, 2003). Bir uygulayıcı kaspaz olarak, kaspaz-3 zimogen, apoptotik sinyal olayları meydana geldikten sonra bir başlatıcı kaspaz tarafından parçalanana kadar neredeyse hiç aktiviteye sahip değildir (Walters ve ark., 2009). Böyle bir sinyalleme olayı, başlatıcı kaspazları aktive edebilen granzim B'nin NK hücreleri tarafından apoptoz için hedeflenen hücrelere sokulmasıdır. Bu dışsal aktivasyon daha sonra kaspaz-3'ün baskın bir rol oynadığı apoptotik yolun belirleyici kaspaz kaskad karakteristiğini tetikler (Gallagher ve ark., 2001). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara bakıldığında ilginç olarak apoptozisin metabolik yani intrinsik yolağı olan Caspase 3 aktivasyonunun bevacizumab uygulanan GCTT hücre hattında beklenenin tersine doza bağımlı olarak azalmasıdır. Bunun anlamı bevacizumabın apoptotik mekanizmaların en önemli yollarından biri olan Caspase 3'ün ekspresyonunu engellediği, dolayısıyla apoptotik hücre ölümünü engelleyerek kanserli hücre yaşamını devam ettirmesine imkan sağladığıdır ki bu beklenen antitümör etkinin tam tersi bir etkidir.

5.SONUÇ

Elde edilen bulgular toplu olarak değerlendirildiğinde; bevazicumabın tümörlü hücre hattında elde edilen hücre yaşamını oranını anlamlı şekilde azalttığı ancak bu süreçte hücre ölümünün çalışmamızda kullandığımız hücre ölümü parametreleri olan Bax, bcl2 ve Caspase 3 üzerinden yapmadığını belirledik. Diğer yandan anti VEGF özelliğe sahip bevazicumabın VEGF ekspresyonunu düşük dozlarda baskıladığı dolayısıyla antiinvaziv etki yapabileceği düşünülse de yüksek dozlarda bu etkisini kaybetmesi bize bevazicumab kullanımının GCTT tümörlerinde çok etkinliğinin olmadığını göstermektedir.

Bu 4 parametrede belirgin değişiklik olmamasına karşın aynı hücre hatlarında viabilitenin düşmesi yani hücre ölümünün artması bize başka mekanizmaları üzerinden hücre ölümünün uyarılmış olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; GCTT hücre hattında bevazicumab hücre ölümünü artırıcı bir etki yapmasına karşın bu etkisini Bax, bcl2 ve Caspase 3 üzerinden yapmamaktadır. VEGF üzerinde düşük dozların başka bir çalışmayla tekrar değerlendirilmesinin uygun olduğunu ancak bevazicumabın GCTT tümör tedavisinde çok etkisinin olmadığını düşünmekteyiz.

ÖZET

İnsan Testiküler Germ Hücre Tümörlerinde Uygulanan Klasik BEP Tedavisinde Bevacizumab'ın Tedaviyi Arttırıcı Etkinliğinin Araştırılması

Testis kanseri, erkek ürogenital sistem tümörlerinin %13-23'ünü oluşturur. Testis tümörleri 20 – 40 yaş arası erkeklerde en sık rastlanan malign tümörlerdir ve % 90-95'ini germ hücre kökenlidir. İnsan testiküler germ hücre tümörü tedavisinde yaygın olarak üçlü ilaç kokteyli olan BEP (Bleomisin, Etoposit, Cisplatin) kombinasyonu kullanılır. Bu kombinasyon %90 oranında tedavi edici etkinliğe sahip olsa da yan etkilerin fazla olması yeni tedavi protokolleri geliştirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Bevacizumab birçok tümör tipinin tedavisinde kullanılan anti –tümör bir ilaç olup tümör hücrelerine doğrudan etki etmek yerine onları besleyen damarları hedef alır. Çalışmamızın amacı; BEP tedavisini potansiyalize edebileceğini düşündüğümüz, son dönemde kullanımı giderek yaygınlaşan bir kemoterapötik olan anti-VEGF özellikte bevacizumab'ın bu tedavi üzerine potansiyalize veya inhibe edici etkilerini değerlendirmektir.

Çalışmamızda 1618-K (ACC752) İnsan Germ Hücre Tümörü hücre hattında, hücre kültürü ortamında BEP kombinasyonuna ait IC50 doz belirlendikten sonra bu doz farklı bevazicumab dozları ile kombine ederek bu kombinasyonlardaki viabiliteler MTT kullanılmak suretiyle hesaplandı. MTT sonuçları alınırken aynı örneklerden immunositokimyasal boyamalar yapılarak örneklerdeki VEGF, Caspase-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları belirlenip değerlendirildi Daha sonra ışık mikroskopunda immunopozitif ve immunonegatif hücreler sayılıp birbirine oranlandı ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

Sonuç olarak; GCTT hücre hattında bevazicumab hücre ölümünü arttırıcı bir etki yapmasına karşın bu etkisini Bax, Bcl2 ve Caspase 3 yolakları üzerinden yapmadığı hutmel başka bir yolak aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla etkin olduğunu düşünmekteyiz. VEGF üzerinde önceleri artan anti VEGF etkininde daha yüksek dozlarda azalması bize bevazicumabın bu tümör tipinde çok etkin

olamayacağını ancak ileri ve daha geniş spektrumlu çalışmalarla bu verilerin desteklenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur

Anahtar Kelimeler:

- Testiküler Germ Hücre Tümörü, Bevacizumab, İmmünohistokimya, BEP, VEGF, Caspase-3, Bax, Bcl-2



SUMMARY

The Evaluation of the Favourable Effect of Bevacizumab on classical BEP Treatment in Human Testicular Germ Cell Tumour

Testicular cancer constitutes 13-23% of tumors of the male urogenital system. Testicular tumors are the most common malignant tumors in men between the ages of 20 and 40 and 90-95% of them are germ cells. A combination of BEP (Bleomycin, Etoposide, Cisplatin) is commonly used in the treatment of human testicular germ cell tumor. Although this combination has a therapeutic efficacy of 90%, the high incidence of side effects has necessitated the development of new treatment protocols. Bevacizumab is an anti-tumor drug that is used in the treatment of many tumor types. The aim of our study; The aim of this study is to evaluate the potential or inhibitory effects of anti-VEGF bevacizumab which is an increasingly common chemotherapeutic agent that can potentiate BEP therapy.

In our study, after determining the IC50 dose in the 1618-K (ACC752) Human Germ Cell Tumor cell line in combination with BEP in the cell culture medium, this dose was calculated by using MTT in these combinations by combining these doses with different bevacizumab doses. Immunocytochemistry staining was performed to determine the VEGF, Caspase-3, Bax and Bcl-2 expressions in the samples. After that, immunopositive and immunonegative cells were counted and the results were statistically analyzed.

As a result; Although bevacizumab has a cell-killing effect in the GCTT cell line, we believe that this effect is effective through a further pathway activation or inhibition that is not performed by the Bax, Bcl2 and Caspase 3 pathways. Decreased anti-VEGF effect on VEGF at higher doses has shown us that bevacizumab cannot be very effective in this tumor type but it should be supported with advanced and broad spectrum studies.

Keywords:

- Testicular Germ Cell Tumor, Bavacizumab, Immunocytochemistry, BEP, VEGF, Caspase-3, Bax, Bcl-2



KAYNAKLAR

MARIEB, E. (2000). Essentials of Human Anatomy and Physiology. 6rd Ed. Addison Welsev Longman Inc.

ARİFOĞLU, Y., (2017). Her Yönüyle Anatomi Bölüm 11, 1.Baskı, İstanbul Tıp Kitapevi

UNUR, E. ve ark., (2017). Temel Anatomi Bölüm 7, 1.Baskı, Kıvılcım Kitapevi, Kayseri

GARTNER, L.P., HİATT, J.L., (2009). Renkli Histoloji Atlası, Bölüm 18, 4. Baskı, (Ç.Ed.: Dağdeviren A., Müftüoğlu Fs., Karabay G.), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

EŞREFOĞLU, M., (2016). Özel Histoloji, 2. Baskı Medipress Matbaacılık, Malatya.

EŞREFOĞLU, M., (2009). Genel Histoloji, Medipress Matbaacılık, Malatya.

ROSS, M.H., PAWLİNA, W., (2014). İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji, Bölüm 22, 6. İngilizce Baskıdan Çeviri (Çev. Ed.: Barış B.), Palme Yayıncılık, Ankara

KİERSZENBAUM, A.L., (2006). Histoloji Ve Hücre Biyolojisi, (Çev. Ed: Demir R.), Palme Yayıncılık, Ankara.

OVALLE, W.K., NAHIRNEY, P.C., (2009). Netter Temel Histoloji, (Ç. Ed.: Müftüoğlu S., Kaymaz F., Atilla P.), Güneş Tıp Kitapevi, Ankara.

GARTNER, L.P., HİATT, J.L., (2016). Renkli Histoloji Atlası, Bölüm 18, 4. Baskı, (Çev. Ed: Dağdeviren A., Müftüoğlu Fs., Karabay G.), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

TEKELİOĞLU, M., (2002). Özel Histoloji, İnce Yapı Ve Gelişme, Antıp A.Ş. Yayınları.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., (2006). Temel Histoloji, (Çev. Ed: Aytekin Y., Solakoğlu), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul

TOSUN,M.,(1998). İnsan Gonadlarının İntrauterin Gelişiminin Histolojik Değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Tıp Anabilim Dalı, Doktora Tezi-Konya.

KARATEKE, H., (2013). Ratlarda Postnatal Dönemde Testis Dokusu İle Kan Testis Bariyerinin Gelişiminin Histomorfometrik Ve İmmunohistokimyasal Değerlendirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi (Tıp) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi-Afyonkarahisar.

DEMİR, R., (1995). İnsanın Gelişimi Ve İmplantasyon Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara.

ERBENGİ, T., (1985). Histoloji Iı, Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş, Ankara.

BERESFORD, W., (1977). Lecture Notes On Histology, Blackwell Scientific Publ. Oxford.

PAKER, Ş., (1993). Histoloji, 2. Baskı, Bursa Uludağ Üniversitesi Basımevi.

DAĞDEVİREN, A., BİRİCİK, S., (2007a). Fizyoloji Histoloji-Embriyoloji, 3.Baskı, Kelebek Matbaacılık, İstanbul.

ERKOÇAK, A., (1982). Özel Histoloji, 4.Baskı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi, Ankara.

WILLIAMS, P.L., BANNISTER, L.H., BERRY, M.M., COLLINS, P., DYSON, M., DUSSEK, J., Et Al. (1989), Grays Anatomy, 37th Edition, Edinburgh: Churchill Livingstone, Wiley.

CARLOS, J.L., CARNEIRO, J., KELLEY, R., (1993). Temel Histoloji, (Çev. Ed: Aytekin Y., Solakoğlu S.), Barış Kitapevi, İstanbul.

KARAÖZ, E., (2002). Özel Histoloji, Sdü Basımevi

MOORE, K., PERSAUD, T., (2002). İnsan Embriyolojisi, 6. İngilizce Baskıdan Çeviri, (Çev. Ed: Yıldırım M., Dalçık H., Okar İ.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

DAĞDEVİREN, A., BİRİCİK, S., (2007b). Fizyoloji Histoloji-Embriyoloji, 3. Baskı, Klinisyen, İstanbul Tıp Kitabevleri.

SADLER, T., (2011). Langman Medikal Embriyoloji, 11. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Ankara.

KAYALI, H., ŞATIROĞLU, G., TAŞYÜREKLİ, M., (1992). İnsan Embriyolojisi, 7. Baskı, Alfa Basın Yayın Dağıtım.

ŞEFTALİOĞLU, A., (1998). Genel & Özel İnsan Embriyolojisi, 3. Baskı, Tıp&Teknik Yayıncılık, Ankara.

TEKELİOĞLU, M., (1995). İnsan Üremesi Ve Gelişmesi, Dumat Ofset Matbaacılık.

CAN, A., (2014). Kök Hücre Biyoloji, Türleri ve Tedavide Kullanımları, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara

WEİNBURG, R., (2013). The Biology of Cancer 2th Edition

COOPER, G.M., (1992). İnsan kanserinin ögeleri Boston and London: Jones and Bartlett Publishers

WEİNSTEİN, I.B., JOE, A., Oncogene addiction. Cancer Res. 2008 May 1;68(9):3077-80; discussion 3080.

CHEN, J., DANESHMAND, S., Modern Management of Testicular Cancer. Cancer Treat Res. 2018;175:273-308.

IGUCHİ, T., YAMASHİTA, S., NİSHİZAWA, S., İBA, A., KOHJİMOTO, Y., HARA, I., [A Case of Giant Testicular Tumor with Pelvic and Inguinal Lymph Nodes Metastasis]. Hinyokika Kiyo. 2018 Jun;64(6):277-281.

GÎNGU, C.V., MÎHAÎ, M., BASTON, C., CRĂSNEANU, M., DÎCK , AV., OLARU, V., SÎNESCU, I., Primary retroperitoneal seminoma - embryology, histopathology and treatment particularities. Rom J Morphol Embryol. 2016;57(3):1045-1050.

ABDEL-QADÎR, H., ETHÎER, JL., LEE, DS., THAVENDÎRANATHAN, P., AMÎR, E., Cardiovascular toxicity of angiogenesis inhibitors in treatment of malignancy: A systematic review and meta-analysis. Cancer Treat Rev. 2017 Feb;53:120-127.

REEKHAYE, A., HARRIS, A., NAGARAJAN, S., CHADWICK, D., A giant testicular mixed germ cell tumour. Ann R Coll Surg Engl. 2016 Nov;98(8):e171-e172

ISHÎHARA, M., SATOH, K., HANAOKA, M., MATSUZAKÎ, K., MATSUDA, T., MÎYAKE, H., NÎKÎ, H., [Cerebral Venous Sinus Thrombosis Following Cisplatin-Based Chemotherapy for Testicular Tumor]. No Shinkei Geka. 2017 May;45(5):417-422.

PECKHAM, A., BARRETT, K., LÎEW, A., HORWICH, B., ROBINSON, H., DOBBS, T., McElwain, and W. F. Hendry The treatment of metastatic germ-cell testicular tumours with bleomycin, etoposide and cis-platin (BEP). Br J Cancer. 1983 May; 47(5): 613–619.

DAVÎD, M.G., MÎTCHELL, M., AYTEN, C., JOHN, J. K., ALLEN, S., CREIGHTON, L.E., ELVÎO, G.S., and Taylor, J., Wharton Treatment of Malignant Germ Cell Tumors of the Ovary With Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin American Society of Clinical Oncology. 1990 J Clin Oncol 8: 715-720.

MARUYAMA, Y., SADAHÎRA, T., MÎTSUÎ, Y., ARAKÎ, M., WADA, K., TANÎMOTO, R., KOBAYASHÎ, Y., WATANABE, M., WATANABE, T., NASU, Y., Prognostic impact of bleomycin pulmonary toxicity on the outcomes of patients with germ cell tumors. Med Oncol. 2018 April 26;35(6):80. Galluzzi L, Vacchelli E, Fridman WH, et al. Monoclonal antibodies in cancer therapy. OncoImmunology 2012; 1(1):28-37.

ÇIRAKOĞLU, B., Monoklonal antikorlar, Bilim ve Teknik Dergisi, Mayıs Eki, 2002; (414): 6-7.

BULUT ÖNER, F., Biyoteknolojinin tıpta ve eczacılıktaki uygulamaları, Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 2002; (3,4): 42-53

KOÇOĞLU, T., Yalçınkaya T. Rekombinant DNA teknolojisi. Mikrobiyoloji Bülteni 1992; 26:177-188.

WEİNER, L.M., SURANA, R., WANG, S., Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 2010; 10(5):317-327.

BOROSS, P., LEUSEN J.H.W., Mechanisms of action of CD20 antibodies. Am J Cancer Res 2012; 2(6):676-690.

LADJEMİ, M.Z., JACOT, W., CHARDÈS, T., PÈLEGRİN, A., NAVARRO- TEULON, I., Anti-HER2 vaccines: New prospects for breast cancer therapy. Cancer Immunol Immunother 2010; 59: 1295-312.

MAHFOUZ, N., TAHTOUH, R., ALAAEDDİNE, N., EL HAJJ, J., SARKİS, R., HACHEM, R., RAAD, I., HİLAL, G., Gastrointestinal cancer cells treatment with bevacizumab activates aVEGF autoregulatory mechanism involving telomerase catalytic subunit hTERT viaPI3K-AKT, HIF-1 α and VEGF receptors. PLoS One. 2017 Jun 8;12(6):e0179202.

IMAI, A., ICHİGO, S., MATSUNAMI, K., TAKAGİ, H., KAWABATA, I., Ovarian function following targeted anti-angiogenic therapy with bevacizumab. Mol Clin Oncol. 2017 Jun;6(6):807-810.

MORİ, R., FUJİMOTO, D., ITO, M., TOMİİ, K., Bevacizumab for ramucirumab refractory malignant pleural effusion in non-small cell lung cancer: a case report and review of the literature. Oncotarget. 2017 May 17.

ALVAREZ R.H., GUARNERİ, V., ICLİ, F., et all. Bevacizumab treatment for advanced breastcancer. The Oncologist 2011; 16: 1684-1697.

TUNCER, M., Affinite kromatografisi. In: Protein Saflaştırma-1: Kromatografik Teknikler, Cem Matbaacılık, Mersin, 2008: 159-197.

NÍETO, Y., TU, S.M., BASSETT, R., JONES, R.B., GULBÍS, A.M., TANNIR, N., KÍNGHAM,A.,LEDESMA,C.,MARGOLÍN,K.,HOLMBERG,L.,Bevacizumab/high-dose chemotherapy with autologous stem-cell transplantfor poor-risk relapsed or refractory germ-cell tumors Published: 21 July 2015

HURWÍTZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRÍGH, T., HÁINSWORTH, J., HEÍM, W., BERLÍN, J., BARON, A., Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.

LÍU, M., HÁLES, B.F., Robaire B. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. Biol Reprod. 2014 Apr 3;90(4):72. doi: 10.1095/biolreprod.114.117754. Print 2014 Apr.

GERSHENSON, D.M., MORRÍS, M., CANGÍR, A., KAVANAGH, J.J., STRÍNGER, C.A., EDWARDS, C.L., SÍLVA, E.G., WHARTON, J.T., Treatment of malignant germ cell tumors of the ovary with bleomycin, etoposide, and cisplatin. J Clin Oncol. 1990 Apr;8(4):715-20.

FELDMAN, D.R., State-of-the-Art Management of Germ Cell Tumors. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2018 May 23;(38):319-323.

IWAMOTO, H., IZUMÍ, K., NATSAGDORJ, A., MAKÍNO, T., NOHARA, T., SHÍGEHARA, K., KADONO, Y.,MÍZOKAMÍ, A., Effectiveness and Safety of Pegfilgrastim in BEP Treatment for Patients with Germ Cell Tumor. In Vivo. 2018 Jul-Aug;32(4):899-903

OLTVAÍ, Z.N., MÍLLÍMAN, C.L., KORSMEYER, S.J., (August 1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death". Cell. 74 (4): 609–19.

GROSS, A., JOCKEL, J., WEÍ, M.C., KORSMEYER, S.J., (July 1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis". EMBO J. 17 (14): 3878–85

MİYASHITA, T., REED, J.C., (January 1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene". *Cell*. 80 (2): 293–9.

HARDWICK, J.M., SOANE, L., (2013). "Multiple functions of BCL-2 family proteins". *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5 (2): a008722.

SENGER, D.R., GALLI, S.J., DVORAK, A.M., PERRUZZI, C.A., HARVEY, V.S., DVORAK, H.F., (25 February 1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid". *Science*. 219 (4587): 983–5.

HOLMES, K., ROBERTS, O.L., THOMAS, A.M., CROSS, M.J., (2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition". *Cellular Signalling*. 19 (10): 2003–12

LNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SALVESEN, G., Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (October 1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". *Cell*. 87(2): 171.

GERVAIS, F.G., XU, D., ROBERTSON, G.S., VAILLANCOURT, J.P., ZHU, Y., HUANG, J., LEBLANC, A., SMITH, D., RIGBY, M., SHEARMAN, M.S., CLARKE, E.E., ZHENG, H., VAN DER PLOEG, L.H., RUFFOLO, S.C., THORNBERRY, N.A., XANTHOUDAKIS, S., ZAMBONI, R.J., ROY, S., NICHOLSON, D.W., (April 1999). "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation". *Cell*. 97 (3): 395–406.

SALVESEN, G.S., (January 2002). "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". *Cell Death and Differentiation*. 9 (1): 3–5.

BOATRIGHT, K.M., SALVESEN, G.S., (December 2003). "Mechanisms of caspase activation". *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6): 725–31.

WALTERS, J., POP, C., SCOTT, F.L., DRAG, M., SWARTZ, P., MATTOS, C., SALVESEN, G.S., CLARK, A.C., (December 2009). "A constitutively active and

uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis". The Biochemical Journal. 424 (3): 335–45.

GALLAHER, B.W., HILLE, R., RAILE, K., KIESS, W., (September 2001). "Apoptosis: live or die--hard work either way!". Hormone and Metabolic Research. 33 (9): 511–9.



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum ilinde doğdum. İlkokul eğitimimi İstanbul ilinde, orta ve lise eğitimimi Erzurum ilinde tamamladım. 2009 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulunda bir yıllık İngilizce hazırlık eğitiminden sonra, 2010 yılında Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm'ünde üniversite eğitimine başladım. 2014 yılında lisans eğitimimi bitirip aynı yıl Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimini tamamlayarak 2015 yılında sertifikamı aldım. Lisans eğitimimi tamamlandıktan sonra Afyonkarahisar Özel Telek Tüp Bebek Merkezinde Biyolog olarak çalışma hayatına başladım. 2016 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 2017 yılında vekil öğretmen olarak Afyonkarahisar ili Çayırbağ kasabasında görev yaptım. Aynı zamanda mesleki tecrübemi arttırmak adına uluslararası kongrelere katıldım.