

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREPUBERTAL SIÇANLARDA BUSULFAN İLE
OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA ALFA
LİPOİK ASİTİN ETKİSİ**

MERVE AKSOY

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970061

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREPUBERTAL SIÇANLARDA BUSULFAN İLE
OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA ALFA
LİPOİK ASİTİN ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MERVE AKSOY

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970061

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Merve AKSOY **PREPUBERTAL SIÇANLARDA BUSULFAN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA ALFA LİPOİK ASİTİN ETKİSİ** konulu Yüksek Lisans tezini (24.02.2017) başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Meltem KURUŞ
ÜYE
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Işıl TEKMEK
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Selen BAĞÇECİ
YEDEK ÜYE
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜRLER	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 ERKEK GENİTAL SİSTEM	7
2.1.1 Erkek Genital Sistem Embriyolojisi	8
2.1.2 Erkek Genital Sistem Anatomisi	10
2.1.2.1 Testis Anatomisi	10
2.1.2.2 Scrotum Anatomisi	12
2.1.2.3 Penis (Phallus) Anatomisi.....	13
2.1.3 Erkek Genital Sistem Histolojisi.....	15
2.1.3.1 Testis Histolojisi.....	15
2.1.3.1.1 İnterstisyel Doku	16
2.1.3.1.2 Tubuli Seminiferi Contorti	16
2.1.3.2 Genital Kanallar	22
2.1.3.3 Yardımcı Genital Bezler.....	25
2.1.4 Erkek Genital Sistem Histofizyolojisi.....	26
2.2 KANSER VE ALKİLLEYİCİ AJANLAR.....	27
2.2.1 Alkilleyici Ajanlar	28
2.2.1.1 Busulfan.....	28
2.2.1.1.1 Busulfan Kimyasal Yapısı.....	29
2.2.1.1.2 Busulfan Metabolizması	29
2.2.1.1.3 Busulfanın Yan Etkileri	30
2.3 ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	31
2.3.1. Enzimatik Antioksidan Savunma	34
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma	35

2.3.2.1 Alfa Lipoik Asit (Ala)	36
2.3.2.1.1 Alfa Lipoik Asitin Kimyasal Yapısı	37
2.3.2.1.2 Alfa Lipoik Asitin Metabolizması	38
2.3.2.1.3 Alfa Lipoik Asitin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkileri	39
2.4 APOPTOZ.....	41
2.4.1 APOPTOTİK HÜCREDE GERÇEKLEŞEN DEĞİŞİKLİKLER.....	44
2.4.2 APOPTOZ MEKANİZMASI	46
4.2.3 APOPTOZ VE SPERMATOGENEZ.....	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ:	49
3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI:.....	49
3.3.ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI	49
3.4. ÇALIŞMA MATERYALI.....	51
3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ	51
3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	51
3.6.1 Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	51
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Busulfan ve Alfa Lipoik Asit'in Hazırlanması..	51
3.6.2.1. Busulfan'ın Hazırlanması	51
3.6.2.2. Alfa Lipoik Asit'in Hazırlanması	52
3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	52
3.6.3.1. Denek Ağırlıkları Ve Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	52
3.6.3.2. Histolojik Boyama	52
3.6.3.2.1 Rutin Doku Takibi	53
3.6.3.2.2 Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü	53
3.6.3.2.3 Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü.....	54
3.6.3.3 Histolojik Skoring	55
3.6.3.3.1 Johnson Testiküler Biyopsi Skoring	55
3.6.3.3.2 Seminifer Tübül Çap Ölçümü	56
3.6.3.3.3 Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü.....	56
3.6.3.4 İmmunohistokimyasal İncelemeler	56
3.6.3.4.1 Aktif Kaspase-3 Protokolü	57

3.6.3.4.2 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase- Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling (TUNEL) Boya Protokolü	57
3.6.3.5 Biyokimyasal Analizler	58
3.6.3.5.1 Homojenizasyon	58
3.6.3.5.2 Enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinin saptanması	58
3.7 ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ.....	59
3.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	60
3.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI	60
3.10 ETİK KURUL ONAYI.....	60
4. BULGULAR	61
4.1 DENEK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	62
Grup içinde deneklerin kilo artışını değerlendirmek için (son ağırlık ve ilk ağırlık arasındaki farkı) 'Δ' delta ağırlık değerleri hesaplandı. Her grubun delta değerleri incelendiğinde anlamlı bir fark yoktur (Tablo 7).	62
4.2 TESTİS AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	63
4.3 IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR.....	65
4.3.1 Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	68
4.3.2 Bazal Membran Ölçümü	70
4.4 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	74
4.4.1 Aktif Kaspaz-3 Boyaması	74
4.4.2 TUNEL Terminal (Deoxynucleotidyl Transferase - Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick - End Labelling).....	76
4.5 BİYOKİMYASAL BULGULAR	78
4.5.1 Enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinin saptanması	78
4.5.1.1 MDA değerleri.....	79
4.5.1.2 GSH değerleri.....	80
4.5.1.3 GPx değerleri.....	80
5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR.....	91
8. EKLER	103

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: Antioksidanların sınıflandırılması (66).	33
Tablo 2: Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asitin Süpürülmesinde Etkili Oldukları Reaktif Oksijen Türleri (98).	40
Tablo 3: Apoptoz ve nekrozda görülen temel farklılıklar (126).	42
Tablo 4: Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler.	47
Tablo 5:Doku Takip Protokolü	53
Tablo 6: Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü	54
Tablo 7: Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü.....	55
Tablo 8: Johnson Testiküler Biyopsi Skoruması.....	56
Tablo 9: Gruplar arasındaki tanımlayıcı istatistik.....	61
Tablo 10: Kaspaz ve Tunel pozitif hücre sayımları için gruplar arası istatistik verileri. ..	74
Tablo 11: MDA, GSH ve GPx değerlerinin gruplar arası istatistik verileri.	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:Erkek pelvisi, parasagital kesit sağ yandan görünüş (21).	7
Şekil 2:Seminifer tübül interstisyel doku ve seminifer epitel şematik görünümü.	15
Şekil 3:Busulfan'ın kimyasal yapısı a (1,4-butanediol dimethanesulphonate) (55)	29
Şekil 4: Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asidin R- ve S- Formları	38
Şekil 5: E ve C Vitamini, Ubikinol, Glutasyon ve R-Lipoik Asitin Redoks Siklusunda Aralarındaki Etkileşimi Gösteren Antioksidan Ağ (98).....	39
Şekil 6: Deneklerin deney başlangıç ve sonundaki ortalama ağırlıkları.	63
Şekil 7: Deneklerin deney soundaki ortalama testis ağırlıkları.	64
Şekil 8: Kontrol grubuna ait testis kesiti. A; H&E x20 B; H&E x40 büyütme.....	66
Şekil 9: Busulfan grubuna ait testis kesiti. A; H&E x20 B; H&E x40 büyütme.	66
Şekil 10: Alfa Lipoik Asit grubuna ait testis kesiti. A; H&E x20 B; H&E x40 büyütme.	67
Şekil 11: ALA+BUS grubuna ait testis kesiti. A; H&E x20 B; H&E x40 büyütme.....	67
Şekil 12: Image J programında seminifer tübül çap ölçümü.....	68
Şekil 13: Grupların ortalama seminifer tübül çap ölçümleri.	69
Şekil 14: Image J programında bazal membran ölçümü.	70
Şekil 15: Deneklerin seminifer tübül bazal membran ölçümleri.....	71
Şekil 16: PAS boyaması görüntüleri (A) Kontrol Grubu, (B) Alfa Lipoik Asit Grubu, .	72
Şekil 17: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru	73
Şekil 18: Aktif Kaspaz-3 boyaması (A) Kontrol Grubu, (B) Alfa Lipoik Asit Grubu, ...	75
Şekil 19: TUNEL boyaması (A) Kontrol Grubu, (B) Alfa Lipoik Asit Grubu,.....	77
Şekil 20: MDA değerleri.....	79
Şekil 21: GSH değerleri.....	80
Şekil 22: GPx değerleri.....	81

KISALTMALAR

ALA:	Alfa Lipoik Asit
AMH:	Anti Müllerian Hormon
ATP:	Adenozin Tri Fosfat
BUS:	Busulfan
Cu+2:	Bakır
DAB:	Diaminobenzidin
DHLA:	Dihidrolipoik asit
FSH:	Folikül Stimulan Hormon
GPx:	Glutasyon Peroksidaz
GSH:	Glutathione
hCG:	Human Koryonik Gonodotropin
İ.p:	İntraperitoneal
MDA :	Malondialdehit
MIF:	Müllerian İnhibe Edici Faktör
Mn+2:	Mangan
µm :	Mikrometre
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Pb+2:	Kurşun
PBS:	Phosphate Buffer Saline
TBF:	Testis Belirleyici Faktör
TUNEL:	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick-End Labeling
Zn+2:	Çinko

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel desteği ve tecrübelerinden yararlandığım, öğrenimim süresince sabır ve anlayışını esirgemeyerek yol gösteren ve anabilim dalının tüm imkanlarından faydalanmama olanak sağlayan çok değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN'e,

Histoloji ve Embriyoloji alanında yetişmemin yanı sıra hayata dair bilgi ve deneyimlerini aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR, Prof. Dr. Hüsnü Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Işıl Tekmen, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN, Prof. Dr. Ülker SÖNMEZ, Prof. Dr. Güven ERBİL, Doç. Dr. Başak BAYKARA ve Doç. Dr. Seda ÖZBAL' a,

Birlikte çalışabilme fırsatını veren bu süreçte iş ahlakı, disiplini, bilimsel bilgi, deneyimleri ile hayata dair görüşlerini benimle paylaşan, tez çalışmamda bana destek olup büyük bir özveriyle yardımcı olan ve çalıştığımız her anı mutlulukla hatırlayacağım sevgili Hocam Doç. Dr. Serap CİLAKE MICİLİ'ya

Deneysel ve biyokimyasal analiz aşamalarında deneyimlerini, desteğini ve güler yüzünü benden esirgemeyip, çalışmada birlikte olmaktan onur duyduğum Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan çok değerli Hocam Prof. Dr. Müge KIRAY' a

Tezimin ön çalışması için gerekli desteği ve Temel Onkoloji Laboratuvarının tüm imkanlarını sunan, akademik gelişimimiz için bilgi ve tecrübelerini her daim paylaşan çok değerli Hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ, Dr. Pınar ERÇETİN ve tüm Onkoloji Enstitüsü çalışanlarına,

Histoloji ve Embriyoloji Bilimi sevgisini bana aşıl原因an, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve öğrencisi olabilme şansına erişebildiğim Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN ve Dr. Hanife TANIR DÖNMEZ' e

Çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini ve yardımlarını esirgemedten güler yüz ve anlayışla sunan Biyoloğumuz ve yüksek lisans arkadaşım Özcan ÜSTÜN'e

Gerçek dostluğuyla en zor ve kaldırılamaz zamanlarımda bile yanımda olan, birlik beraberliğin önemini her daim vurgulayan, tez çalışmamda büyük emeği olan çok değerli dostum Selma AYDEMİR'e

Tezimin yazım aşamasında ve verilerin istatistiksel analizlerinde her türlü yardım ve desteği veren sevgili arkadaşlarım Zeynep BAKANER, Parazitoloji

Anabilim Dalı'ndan Ceren ERGÜDEN, Onkoloji Enstitüsü'nden Hakan CENGİZ ve Ayça KAYNAR' a

Eğitimim ve çalışmalarım süresince birlikte çalışmaktan huzur duyduğum değerli arkadaşlarım; Tuğçe TOPCU, Merve TÜTÜNCÜ, Uygur SAÇIK, Yavuz GENÇ, Meltem AVCI, Hüseyin KISAOĞLU, Gökçen BİLİCİ, Merve TATLI, Nevin ERSOY, Pınar AKOKAY, Şeyda DEMİR, Dr. Betül ATIŞ, Dr. Filiz YILMAZ, Dr. Umut DEMİRDELEN ve Feyyaz ÖZEL'e

Yüksek lisansa kayıt yaptırdığım ilk günden beri her sorunumuza çözümcü yaklaşımları, anlayışları ve tüm yorgunluklarına rağmen güler yüzlerini eksik etmeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri'ne

Engin bilgi ve tecrübeleri ile danıştığım her konuda yardımcı olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileden de öte olan abim Uzm. Dr. Muhammed ALŞALELDEH ve eşi Tekgül ALŞALELDEH'e

Seçmiş olduğum bu yolda tüm zorluklara karşın her daim yanımda olan düştüğümde kaldıran, benden çok daha fazla emek veren, en büyük destekçim yol arkadaşım annem Hanife KALOĞLU'na sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

PREPUBERTAL SIÇANLARDA BUSULFAN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA ALFA LİPOİK ASİTİN ETKİSİ

Merve AKSOY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı,
Narlidere, İzmir

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda busulfanın testiste oluşturduğu hasara karşı Alfa Lipoik Asit'in tedavi edici etkisini histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda Wistar suşu erkek sıçanlar 4 gruba (n=7) ayrıldı. I. grup; Kontrol: 5 hafta, oral gavaj ile serum fizyolojik uygulandı. II. grup; Busulfan grubu; 10 mg/kg Busulfan 21 gün ara ile iki doz olacak şekilde intraperitoneal yöntemle verildi. III. grup; Alfa Lipoik Asit: 5 hafta, oral gavaj ile 35 mg/kg Alfa Lipoik Asit uygulandı. IV. grup; Alfa Lipoik Asit + Busulfan: ilk doz 10 mg/kg Busulfan uygulandıktan bir gün sonra 35 mg/kg Alfa Lipoik Asit verilmeye başlandı ve 5 hafta deney süresince her gün uygulandı. Deneyin 21. günü ikinci doz 10 mg/kg Busulfan uygulandı. Deney sonunda tüm denekler sakrifiye edildi. Deneklerin sol testisleri, Hematoksilen & eozin (H&E), periyodik asit schiff (PAS), TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları için ayrıldı. Sağ testisleri ise Glutasyon (GSH), glutasyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri için ayrıldı.

Bulgular: Testiste yapılan histolojik ve morfometrik değerlendirmeye göre, Busulfan grubunun kontrol ve Alfa Lipoik Asit grubuna göre hasarlı olduğu ancak ALA+BUS grubunda Alfa Lipoik Asit'in bu hasarı önleyemediği gözlemlendi.

İmmünohistokimyasal olarak Tunel ve Aktif Kaspaz-3 boyaması ile pozitif hücreler sayıldı. Kontrol grubuna göre Busulfan ve ALA+BUS gruplarında apoptotik hücre sayısı anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Kontrol grubu ve Alfa Lipoik Asit grubunda anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Busulfan ve ALA+BUS grupları arasında da apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Biyokimyasal olarak MDA, GPx ve GSH kitleri kullanılarak ölçüm yapıldı. MDA değerleri, kontrol ve Alfa Lipoik Asit gruplarına göre Busulfan grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu. Kontrol grubu ve Alfa Lipoik Asit grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Busulfan grubuna göre ALA+BUS grubunda MDA değeri anlamlı olarak yüksek bulundu.

GSH değerleri, kontrol grubuna göre Busulfan grubunda anlamlı derecede düşük bulundu. Kontrol grubuna göre Alfa Lipoik Asit grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu. Busulfan grubuna göre ALA+BUS grubunda GSH değeri anlamlı derecede yüksek bulundu.

GPx değerleri, kontrol grubuna göre Busulfan grubunda anlamlı derecede düşük bulundu. Kontrol grubu ile Alfa Lipoik Asit ve ALA+BUS grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Busulfan grubuna göre ALA+BUS grubunda GPx değeri anlamlı derecede yüksek bulundu.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda Busulfan'ın testis de doku hasarı oluşturduğunu ve apoptozu arttırdığını gözlemledik. Ancak koruyucu ajan olarak kullanılan Alfa Lipoik Asit'in Busulfanla birlikte kullanımında koruyucu/tedavi edici etkisini gözlemleyemedik.

Anahtar Kelimeler: Busulfan, Alfa Lipoik Asit, Testis

THE EFFECT OF ALPHA LIPOIC ACID ON TESTICAL DAMAGE CAUSED BY BUSULFAN ON PREPUBERTAL RATS

Merve AKSOY

Dokuz Eylul University Medicine Faculty Department of Histology and
Embriyology, IZMİR

ABSTRACT

Objective:

In this study we aimed to investigate protective effects of Alpha Lipoic Acid, a strong antioxidant, against possible negative effects of busulfan, on testes of male rats histolochemically, imunohistochemically and biochemically.

Method:

21 Wistar albino rats were divided into 4 groups (n=7). I.control group: rates were given normal saline orally for 35 days. II.Busulfan group : rates were given busulfan twice daily for 21 days in a dose of 10mg/kg , intraperitoneally. III.alpha lipoic acid group: rates in this group were given alpha lipoic acid orally in a dose of 35mg/kg for 5 weeks. IV.alpha lipoic acid + busulfan group: in this group rates were given the first dose of busulfan in a dose of 10mg/kg on the first day . on the second day alpha lipoic acid started to be given in a daily dose of 35mg/kg for 5 weeks. the second dose of busulfan was given in a dose of 10mg/kg on 21.day of the experiment.

At the end of the experiment, all subjects were sacrificed. the left testis of the rats were prepared for hematoxyline & eosine (H&E), periodic acid schiff (PAS), TUNEL and active caspase-3 painting. The right testes of the rats were evaluated biochemically by Glutathion (GSH), glutathion peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA).

Result: According to histologic and morphometric evaluation on testicles, it is observed that Busulfan group is damaged when compared to control and Alpha

Lipoic Acid group, however in ALA+BUS group Alpha Lipoic Acid is not able to prevent the damage. The positive cells are counted immunohistochemically with Tunel and Active Caspas-3 coloring. It is observed that the apoptotic cell amount has risen significantly in Busulfan and ALA+BUS groups when compared to the control group. It is also observed that there is no significant difference between Busulfan and ALA+BUS groups in terms of apoptotic cell amount. The measurements have been conducted biochemically by MDA GPx and GSH kits. MDA values are found significantly higher in busulfan group than in control group and Alpha Lipoic Acid group. No significant difference is observed between control and Alpha Lipoic Acid groups. Compared to Busulfan group, the MDA value is found significantly high in ALA+BUS group.

GSH values are found significantly low in Busulfan group when compared to control group. And when compared to control group, GSH values are found significantly high in Alpha Lipoic Acid. GSH values are found significantly high in alabus group when compared to Busulfan group.

GPx values are found significantly low in Busulfan group when compared to control group. It has been also observed that there is no significant difference between control group alpha lipoic acid group and ALA+BUS group. When compared to Busulfan group, GPx value is found significantly high in ALA+BUS group.

Conclusion: According to our results, it has been observed that Busulfan rises apoptose and causes testicle damage while Alpha Lipoic Acid has no protective/curing effect on testicle damage when used with Busulfan.

Key Word: Busulfan, Alpha Lipoic Acid, Testis

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş ülkelerde, çocuklarda, kazalardan sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan neoplastik hastalıkların görülme sıklığı 15 yaş altında milyonda 110-150 arasındadır. Ülkemizde ise on beş yaş altında her yıl 2500-3000 civarında yeni kanser vakası görülmektedir (1,2). Son beş yıl içinde pediatrik maligniteler için iyileştirici tedavilerin gelişmesi konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tanı ve tedavideki yeniliklere bağlı olarak kanser tanısı almış çocuklarda 5 yıllık sağ kalım oranı da %80'i geçmektedir (3). Ancak sağ kalım oranı arttıkça uygulanan radyoterapi, kemoterapi ya da kemik iliği transplantasyonunda kullanılan alkilleyici ajanlara bağlı olarak tedavinin geç yan etkileri daha belirgin hale gelmektedir (4,5). Çocuk ve ergenlerde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan alkilleyici ajanların; ikincil malign neoplazmlar, endokrinopati, erkek ve kadın infertilitesi, yumurtalık yetmezliği ve erken menopoza dahil olmak üzere birçok yan etkisi vardır. Özellikle de siklofosfamid, prokarbazin, melfalan, busulfan ve tiyotepa gibi alkilleyici ajanların iyi bilinen yan etkisi gonadotoksisitedir (6).

Busulfan, 1959 yılından günümüze kadar klinikte kullanılan bifonksiyonel alkilleyici antineoplastik bir ilaçtır. Geçmişte Kronik Miyeloid Lösemi (KML) tedavisinde kullanılırken günümüzde Kemik İliği Transplantasyonu (KİT) yapılacak hastalarda hazırlık rejiminde kullanılmaktadır (7). Uygulanması intravenöz veya oral yoldan gerçekleştirilmektedir. Emilimi iyi olup, biyoyararlanımı %100'dür. Kapsamlı bir şekilde karaciğerde metabolize edilmekte ve yarılanma ömrü de yaklaşık 2.5 saattir. Uygulanan dozun %30 kadarı 48 saat içinde ve bunun %1'i değişmemiş halde idrarla atılmaktadır. Busulfan'ın ana yan etkisi myelosupresyon etkidir. Bunun yanı sıra immunolojik, hematolojik, hepatik, gonadal atrofi ve solunum sistemi üzerinde de yan etkileri vardır (8,9,10). Busulfan'ın etki mekanizması ise hücre siklusunun her evresindeki hücreye etki ederek; hücre replikasyonu, DNA tamiri ve gen transkripsiyonunu bozar. DNA sarmal içi veya sarmal arası guanin ile busulfan reaksiyonu sonucu DNA-DNA çapraz bağları gerçekleşir ve bu şekilde sitotoksik etkisini gösterir. Ayrıca güçlü mutajenik etkisi ile kromozomal aberasyonlara yol açabilir (11).

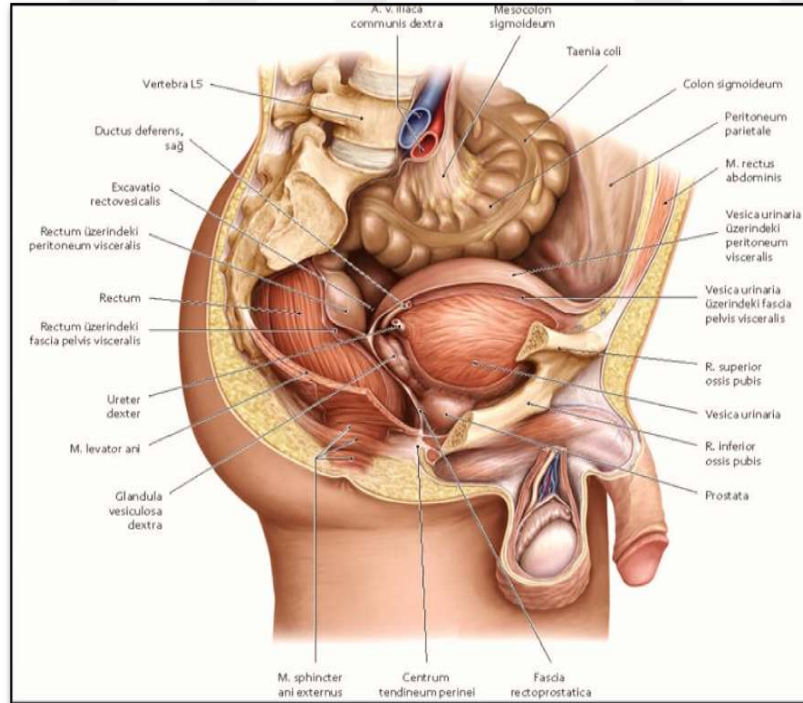
Alfa-Lipoik Asit (ALA) kimyasal okunuşu (1-2-ditiyolan-3-pentatonik asit) ya da (1,2-ditiyolan-3-valerik asit) olan ve tiyoktik asit olarak da adlandırılan, disülfid yapısında sekiz karbonlu bir endojen kofaktördür (12). İlk olarak 1937’de Lactobacillus türlerinin, patates ekstraktında bulunmuştur, bakterilerin gelişimlerinde rol oynayan bir madde olduğu gözlenmiş ve “patates büyüme faktörü” olarak da adlandırılmıştır (13). 1951 yılında Redd ve ark.ları tarafından sığır karaciğeri ekstraktlarından elde edilmiştir ve krebs siklusunda kofaktör olarak görev alan bir molekül olarak tanımlanmıştır (14). Yarı ömrü 30 dakikadır (15). 1980’lerde güçlü bir antioksidan olarak tanımlanmıştır (16). Testislerde pestisit intoksikasyonuna karşı lipoik asidin koruyucu etkisi gösterilmiştir (17).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda, farklı patolojik durumlarda ALA’nın antioksidan etkisi üzerinde durulmuştur. Ancak Busulfan’ın testis ve spermatogenez üzerine vermiş olduğu olası hasarlar ve bu hasarlar üzerine uzun dönem (35 gün) kullanılan ALA’nın antioksidan koruyucu etkisi ile ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, bizde çalışmamızda Busulfan’ın oluşturduğu testis hasarına karşı ALA’nın etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık. Çalışmamızın literatüre ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkısı olacağı inancındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ERKEK GENİTAL SİSTEM

Erkek üreme sistemi; spermatozoa üretimi, beslenmesi ve depolanmasını sağlayan aynı zamanda da androjenlerin sentezlenip salınmasından sorumlu olan bir sistemdir. Bu sistem; bir çift testis, genital boşaltım kanalları, bu kanallara açılan yardımcı bezler ve erektile dokudan oluşan kopulasyon organı penisten oluşur (Şekil 1). Testisler, endokrin ve ekzokrin özellikte, bileşik tübüler bir çift bezdir. Endokrin fonksiyonu olan testosteron hormonu; spermatogenez olayı, erkek embriyonun fenotipik erkek fetüse gelişimi ve seksüel dimorfizmi sağlayan fiziksel ve davranışsal karakteristiklerin gelişiminde önemlidir. Ekzokrin fonksiyonu ise canlı spermiyumdur. Spermatozoanın taşınmasından sorumlu olan boşaltım kanalları ise epididimis, vas deferens, ejakülatuar kanal ve üretradır. Yardımcı bezler, seminal veziküller, bulboüretral bezler ve prostattır. Bu bezlerin salgıları ve spermatozoa, semeni oluşturmaktadır. Semen ise hem spermatozoonların beslenmesini hem de dişi genital sisteme ulaşmasını sağlar. Penis ise kopulasyonu sağlayarak semenin dişi genital sisteme iletilmesi ve idrarın da dışarı atılmasında görevlidir (18,19,20).



Şekil 1:Erkek pelvisi, parasagittal kesit sağ ryandan görünüş (21).

2.1.1 Erkek Genital Sistem Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen spermatozoa çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirlenir. Ancak dişi ve erkek morfolojik karakteristikleri, embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamazlar. Bu dönem seksüel gelişimin farklılaşmamış evresi olarak adlandırılır. İnsan embriyosunun 10-12. dorsal segmentleri arasından primordiyal gonadın mezenkimal kısmı gelişir. Gelişimin üçüncü haftasında yolk kesesi duvarının endoderm hücrelerinden gelişen primitif germ hücreleri, ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler ve gonadların gelişeceği bölgeye doğru göç ederler. Bu sırada vücut boşluğunun arka duvarında ve mezonefrozun medialindeki sölom epitelinin prolifer olup alttaki mezenşime doğru gelişmesiyle gonadal kabarıklık oluşur. Beşinci haftanın başında Primordial germ hücreleri gonadal kabarıklık bölgesine ulaşır ve altıncı haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Bu bölgedeki hücreler, primitif germ hücrelerinin indükleyici etkisiyle çoğalıp alttaki mezenşim içerisine doğru ilerleyen primitif seks kordonlarını oluşturmaya başlarlar. Altıncı haftadan itibaren de Primordial germ hücreleri primitif seks kordonları içine girmeye başlarlar (22,23,30). Primitif seks kordonları ile sarılmayan Primordial germ hücreleri dejenere olurlar (30). Seks kordonları puberteye kadar solid haldedirler ve lümenleri yoktur. Ancak puberteyle birlikte lüminalize olurlar ve seminifer tübülleri oluştururlar. Sonrasında seminifer tübüller de rete testis ve duktilli efferentesle devam ederler. Bunun sonucunda da henüz farklılaşmamış fetal gonad gebeliğin altıncı haftasında ortaya çıkmış olur (22,23,30).

Gonadların erkek ya da dişiliğe farklılaşmalarında Yp11.3 kromozomu üzerindeki SRY geni (*Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölge=sex determining region on Y*) etkilidir. SRY proteini testis belirleyici faktördür bu faktörün varlığında farklılaşmamış gonad testis yönünde gelişir. Leydig hücreleri farklılaşarak testosteron üretirken Sertoli hücreleride farklılaşarak Müller-inhibe edici faktörü (MIF) üretir. Sonuçta fetüs erkek fenotipinde gelişir (24). XY genetiğine sahip embriyoda Y kromozomu üzerindeki Testis Belirleyici Faktörün ekspresyonu gonadal kordonları uyarır. Bunun sonucunda da primitif cinsiyet kordonları medullanın iç kısımlarına doğru ilerleyip gonadın hilusunda ince ve daha küçük kordonlara parçalanıp ağ

şekline dönüşerek “rete testis”i oluştururlar. Gelişim ilerledikçe gonadal kordonların, kalın fibröz bağ dokusu kapsülü olan tunika albugineanın gelişiminin ardından yüzey epiteliyle olan bağlantısı kesilir. Bu durumdaki testisin seks kordonları, primitif germ hücrelerinden ve sölom epitelinden gelişen Sertoli hücrelerinden oluşur. İnterstisyel Leydig hücreleri ise cinsiyet kordonlarının arasını dolduran mezenşimden gelişir ve gebeliğin 8. haftasından itibaren testosteron ve androstenedion hormonlarını üretmeye başlar. Mezonefrik kanalların ve dış genital organların gelişimi de bu hormonlar sayesinde olmaktadır. Gebeliğin ortasına gelindiğinde, bu hücreler testisin %50’sini oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalır (22,25,30). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Müllerian İnhibitör Madde (MIF) yani antimüllerian hormon paramezonefrik kanalların gelişimini baskılayarak uterus ve tuba uterinaların gelişimini engeller. Bu hormonun salınımı puberteye kadar devam eder puberteden sonra ise salgılama fonksiyonu azalır (22,30).

Mezonefrozun kranial kısmındaki tübülleri dejenere olurken, epigenital tübülleri rete testisle ilişki kurarak duktuli efferentesi oluşturur. Mezonefrik kanalın proksimal kısmı da uzayıp kıvrılarak duktus epididimisi yapar. Epididimisin distalinde kalın bir düz kas kılıfı belirir ve duktus deferens adını alır. Mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden de seminal bezler gelişmeye başlar. Seminal bezlerin kanalı ile üretra arasında kalan mezonefrik kanal bölümü ejakülator kanalı oluşturur. Üretranın prostatik parçasından gelişen endodermal çıkıntılardan prostatın epiteli gelişir. Bu epitele ilişkili olan mezenşimden de prostatın stroma ve düz kasları oluşur. Bulboüretral bezler ise üretranın spongiöz kısmından dışarı doğru gelişen hücrelerden farklılaşır (22,23,30).

Gelişimin dördüncü haftasında her iki cinste de kloakal membranın çevresinde mezenşimal hücreler, kloakal katlantı denilen bir çift kabarıklık oluştururlar. Bu katlantıların da kloakal membranın kranialinde birleşmesi sonucu genital tüberkül oluşur. Altıncı haftada kloaka, ürorektal septum tarafından ikiye ayrılır ve membranın ventraline ürogenital membran, dorsaline ise anal membran denir. Bölünme sonucu ürogenital membranın etrafındaki kabarıklığa üretral katlantı, anal membranın etrafındaki katlantıya ise anal katlantı denir. Bu sırada üretral katlantıların her iki

yanında genital şişkinlik (labiaskrotal şişkinlik) denilen bir çift yükselti belirir. Bu yükselti erkekte skrotal şişkinliği, dişide ise labium majorları oluşturur.

Erkek fetüste testislerden salınan androjenlerin etkisiyle genital tüberkül uzayıp fallusu oluşturur. Fallus uzarken üretral katlantıların da öne doğru çekerek üretral oluğun yan duvarlarının oluşmasını da sağlar. Üçüncü ayın sonunda da üretral katlantılar üretral oluğun etrafını tamamen kapatacak şekilde birleşerek penil üretrayı oluştururlar. Glans penisin ucundaki ektodermal hücreler de içeriye doğru penetre olarak kısa bir epitelyal kordon oluştururlar. Daha sonra bu kordonun lüminalize olmasıyla da fossa navikülaris oluşur. Genital şişkinlikler de birleşerek skrotumu oluştururlar (22,29,30).

Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü fetal aydan itibaren skrotuma doğru inmeye başlarlar. Hutson hipotezine göre testisin inişinin iki evresi vardır: İlki transabdominal evredir. Bu evre androjenden bağımsızdır ve iniş, anti Müllerian hormon etkisiyle olur. Testis karın arka duvarı boyunca inişe geçer; gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır. İkincisi inguinaskrotal evre olarak adlandırılır. Testis bu dönemde inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçerek skrotuma iner. Testis gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır (25,26). İnguinoskrotal inişte, androjenler, gubernakulum, epididim, epidermal büyüme faktörü, desendin, kalsitonin genle ilişkili peptid (CGRP), genitofemoral sinir ve karın içi basıncı gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (27,28).

2.1.2 Erkek Genital Sistem Anatomisi

2.1.2.1 Testis Anatomisi

Kişiden kişiye değişmekle birlikte yetişkin bir erkekte testisler, 20-25 gr ağırlığında, 4-5 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde oval şekilli bir çift organdır. Testisler karın boşluğunun dışında scrotum içine yerleşik olup birbirinden septum scroti denen bir bölme ile ayrılmıştır ve funiculus spermaticus'a asılı olarak vücut boşluğunun dışında bulunurlar. Her testis iki yüze (facies medialis ve lateralis), iki

kenara (margo anterior ve posterior) ve iki uca (extremitas superior ve inferior) sahiptir (31).

Testis dıştan içe *tunica vaginalis*, *tunica albuginea* ve *tunica vasculosa* denen üç tabaka ile sarılıdır. Tunica vaginalis iki yapraklıdır. Dışta lamina parietalis, içte ise ductus epididimisi çevreleyen testisin üzerine yapışık kısım lamina visceralisdir. Tunica albuginea sıkı bağ dokusu yapısındadır ve testisi bir kapsül gibi sararak arka kenar boyunca mediastinum testis olarak kalınlaşır ve testis içerisine bölmeler gönderip testisi 200'ün üzerinde lobüle ayırır. Spermatozoa ise lobüller içerisinde bulunan çok sayıdaki kıvrımlı tüpler olan *tubuli seminiferi contorti*'de üretilir (21).

Tubuli seminiferiler yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 250 µm çapındadır. Kıvrımlı tubuli seminiferiler uç kısımlarında düzleşerek mediastinum testis'in fibröz dokusu içerisine uzar ve anastomozlar yaparak rete testis (*Haller ağı*) olarak isimlendirilen genital kanalı oluştururlar (32). Rete testis mediastinum testis'in üst bölümünden yaklaşık 20 efferent kanal olan ductus efferentes ile devam eder. Ductus efferentes testisin arka üst kısmında tunica albuginea içine yapışır ve kıvrımlı tübüller içine doğru uzanır. Burada virgül şeklini alarak testisin üst bölümünden geçip aşağıya doğru uzanarak *ductus epididimis* adını alır. Ductus epididimis baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 kısıma ayrılır ve bağ dokusu içine gömülüdür. Yaklaşık 6 m uzunluğunda çok kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Ductus epididimis'in kuyruk kısmında tübüller genişleyip azalarak ductus deferens ile devam eder. Ductus epididimis spermatozoaların olgunlaşma süreci olan 10 gün ile 4-5 hafta boyunca olgunlaşma ve depolanması için uygun ortamı sağlar. Aynı zamanda spermatozoaların testisten ductus ejaculatorius'a geçişini de gerçekleştirir. Depolanan spermatozoalar ductus epididimis yapıları tarafından beslenir ve ductus epididimis'in sirküler ve kas liflerinin peristaltik kasılmalarıyla olgun spermatozoaların penise ulaşması sağlanır (22,32).

Arteriyal ve Venöz Dolaşım: Testis kan akımı 100 mg doku için yaklaşık 9 ml/dk'dır. Kremasterik ve deferential arterler arteria hipogastrika'nın dallarıdır ve testisin kanlanmasına katkıda bulunur. Testiküler arter testise posteriyordan girer. Tunika albugineayı geçtikten sonra anteriyorda testis parankimi üzerinden transvers olarak

gececek şekilde dallanır, sonra posteriyora ve inferiyora doğru seyreder. Testisin anterior ve inferior bölgeleri, medial ve lateral bölgelerine oranla daha çok damar içermektedir. Posteriyordan ilerleyen venler, mediastenden gelen küçük venlerle ve vas deferens venleri ile birleşir ve plexus pampiniformisi oluşturur. Plexus pampiniformis spermatik kordun içinde kanalis inguinalis'den geçerek sağda vena kava inferiora, solda ise vena renalis'e dökülür.

Lenfatik Akım: Testisin lenfatik drenajı 4-8 lenfatik damar ile spermatik kord içinden geçerek paraaortik lenf nodlarına dökülür.

Sinirsel İnnervasyonu: Testis, medulla spinalisin torakal 10-12 segmentlerinden kaynaklanan sempatik ve nervus vagustan kaynaklanan parasempatik liflerden oluşan plexus testikularis ile innerve edilir. Plexus testikularise ait sinirler arteria testikularis ve deferential arter etrafında testise ulaşır (33).

2.1.2.2 Scrotum Anatomisi

Scrotum, deri ve fibromusculer yapıda, torba şeklinde bir organdır. İçerisinde testis'ler, epididymis, ductus deferens ve funiculus spermaticus'un alt kısmı yer alır. Yerleşimi; Symphysis pubica'nın ve penisin aşağısında, perineum'un önünde, her iki uyluğun arasında aşağıya doğrudur. Scrotum gelişiminde sağ ve sol taraf ayrı gelişmeye başlar ve gelişim sürecinde orta hatta sagittal olarak kaynaşır. Dıştan gözüken bu kaynaşma yerine *raphe scroti* denir. Bu kaynaşma arkada *raphe perinei*, önde *raphe penis* olarak devam eder. Sol taraf, sağa oranla daha aşağıda olup *septum scroti* adı verilen bir bölme ile iki kısma ayrılmıştır.

Scrotum'un katları (dıştan içe doğru)

- Deri (ince, pigmentli ve kıllı)
- Tunica dartos (düz kas lifleri)
- Fascia spermatica externa (m.obliquus externus abdominis'i saran fascia'nın devamı)
- Fascia cremasterica ve m.cremaster
- Fascia spermatica interna (fascia transversalis'in devamıdır)
- Tunica vaginalis (periton uzantısı)

Scrotum derisi pigmentli, ince ve seyrek kıllıdır. Ter bezleri iyi gelişmiştir. Ter bezlerinin çokluğu ısı ayarında önemlidir. Deri altı yağ dokusu bulunmaz. Scrotum'un derisi soğukta kırıılır. Bunun nedeni tunica dartos tabakasındaki düz kas lifleridir. Böylece ısıya karşı çok hassas olan testislerin ısı ayarında rol alırlar. Scrotum'un ısısı karın içi ısısından yaklaşık 2-3 derece daha düşüktür. Bu ısı farkı, spermatogenez için uygun ortamı sağlar. Deri ve tunica dartos tabakaları her iki testis ve funiculus spermaticus'ların scrotum içinde kalan kısımlarını kısmen sarar. Alttaki tabakalar ise (tunica vaginalis dışında) funiculus spermaticus'un katları olarak yukarı doğru devam eder. M. cremaster, m. obliquus internus abdominis'den ayrılan bazı kas lifleridir ve kontraksiyon yapınca testisleri yukarıya çeker (34).

Arteriyal ve Venöz Dolaşım: Scrotum'un arterleri aa. scrotales anteriores (a.pudenda externa), aa. scrotales posteriores (a. pudenda interna), a. cremasterica (a. epigastrica inferior) ve a. testicularis'in dalları tarafından beslenir.

Venleri arterleri takip eder. Bu arada çok sayıda venin bibiri ile anastomozu söz konusudur. Bir kısım venler, v. pudenda internaya bir kısmı ise v. saphena magna'ya dökülür.

Lenfatik Akım: Scrotum'un lenf damarları nodi lymphatici inguinales superficiales'e açılır.

Sinirsel İnnervasyonu: Scrotum'un ön kısmının sensitif sinirleri n. ilioinguinalis ve n. genitofermoralis'in genital dalı; arka kısmı n. perinealis'in rr. scrotales posteriores'i ile n. cutaneus femoris posterior'un perineal dallarınca taşınır. Ayrıca m. dartos plexus ductus deferentis'den otonom lifler tarafından innerve edilir (31).

2.1.2.3 Penis (Phallus) Anatomisi

Penis, deri ve fibröz doku ile sarılı üç silindirik erektile doku içeren bir organdır. Üretra aracılığı ile idrar ve semen sıvısının dış ortama atılmasında rol oynar. Boyutları kişiye göre değişiklik gösterir. Normal durumda 8-10 cm uzunluğunda ve 3 cm çapındayken ereksiyon durumunda ise 14-15 cm uzunluğunda ve 4 cm çapındadır.

Penis iki bölümden oluşur: *Corpus penis* (pars libera, copulatrix), penis'in dışarıdan görülebilen serbest kısmıdır. *Radix penis* (pars fixa, pars perinealis) ise penis kökü olup sabit kısımdır. Corpus penis, silindirik üç erektile cisimden oluşur. Bunlar sağlı sollu dorsalde iki tane *corpus cavernosum penis*, ventralde de üretrayı çevreleyen ve tek olan *corpus spongiosum penis*'dir. Bu yapı en son genişleyerek glans penis'i oluşturur ve bunu saran deri de kendi etrafında katlanarak *preputium penis*'i (sünnet derisi) oluşturur (31). Corpus kavernozumlar, tunika albuginea denen ve sıkı bağ dokusu yapısındaki dayanıklı bir kılıf ile sarılıdır. Penis ve üretranın corpus kavernozumları erektile dokusu, endotel hücreleri ile döşeli ve bağ dokusu lifleri ile düz kas hücrelerinden oluşan trabeküllerle birbirinden ayrılan çok sayıda venöz boşluk içerir. Penil üretranın da büyük bölümü yalancı çok katlı silindirik epitel ile döşelidir; glans penis de bu çok katlı yassı epitele dönüşür. Mukus salgılayan Littre bezleri ise penil üretra boyunca bulunur.

Penisin Arteriyel Kan Akımı: İç pudental arterlerden gelir ve bunlardan da penisin derin arterleri ve dorsal arterleri çıkar. Derin arterler dallanarak besleyici ve sarmal arterleri oluşturur. Besleyici arterler trabeküllerle gerekli oksijen ve besin maddelerini sağlar. Sarmal arterler ise doğrudan kavernoöz boşluklara (erektile doku) açılırlar ve bu arterler ile derin dorsal venler arasında arteriyovenöz geçiş bağlantıları bulunur (18).

Cinsel yanıt olan ereksiyon, emisyon ve ejakülasyon, sempatik, parasempatik ve somatik uyarılarla gerçekleşir.

Ereksiyonda; normalde sempatik uyarılarla arterlerin kasılıp daralması sağlanırken, parasempatik uyarıyla engellenir ve arterler gevşer, bunun sonucunda da kavernoöz boşluklar kan ile dolar.

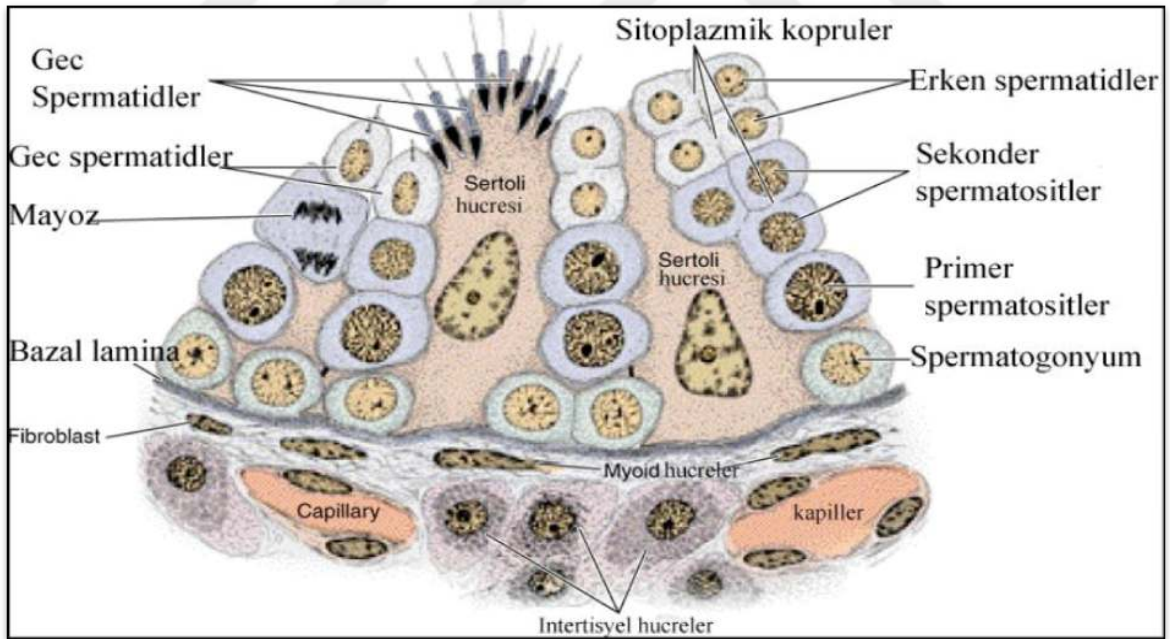
Emisyonda; parasempatik uyarı ile vesicula seminalis, glandulae bulbourethrales ve prostattan semen sıvısının salgılanmasını sağlar. Sempatik uyarı, glandula vesicalis'ler ve ductus deferens'in ritmik hareketlerini başlatarak semeninin kanallardaki hareketi olan emisyonu sebep olur. Sonuç olarak semeni pars prostatica uretra'ya ilerler ve burada prostatın kasılmalarıyla diğer salgılarda eklenir.

Ejakülasyonda ise pars prostatika uretra'ya gelen semeni ritmik kasılmalar sonucunda pars spongiosa üretradan dışarı atılır (21).

2.1.3 Erkek Genital Sistem Histolojisi

2.1.3.1 Testis Histolojisi

Her bir testis skrotumun altında, 3 tabakalı bir kapsül ile sarılıdır. Bu yapıya testiküler kapsül denir ve tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza tabakalarından oluşur. Oldukça kalın, sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea testisin posterior yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet piramit biçimli lobüllere ayırır ve bunların her birine testiküler lobül denir. Her lobül içinde spermatozoa üretilen 1-4 adet *tubuli seminiferi contorti* ve bunları saran gevşek bağ doku yapısındaki stroma bulunmaktadır. Bu bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (Leydig) hücreler bulunur (18,20).



Şekil 2:Seminifer tübül interstisyel doku ve seminifer epitel şematik görünümü.

2.1.3.1.1 İnterstisyel Doku

İntertisyel bağ doku testis dokusunu %30'unu oluşturur. Leydig hücreleri, kan ve lenf damarları, sinirler, makrofajlar ve mast hücrelerini içerir. Testiküler kapillerler pencerilidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verirler.

Leydig hücreleri hücresel olarak santral yerleşimli, yuvarlak ya da poligonal biçimli tek bir nukleusa, çubuk şekilli ayırt edici stoplazmik kristaller olan Reinke kristallerine ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir stoplazmaya sahiptirler. Steroid salgılayan hücreler gibi lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulumları bulunan bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu olan testosteron hormonunu üretirler. Testosteron salgılanması erken fetal dönemde Leydig hücrelerinin farklılaşmasıyla gerçekleşir. Testosteron ve diğer androjenlerin salgılanmasını, embriyoda gonadların gelişimini, pubertede spermatozoa üretiminin başlatılmasını, aksesuar cinsiyet bezlerinin salgılamasını ve sekonder seks karakterlerinin gelişimini, yetişkinde ise spermatogenezi, genital boşaltım kanalları ve aksesuar cinsiyet bezlerinin devamlılığını sağlar. Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de miktarları ön hipofizin iki hormonu ile düzenlenmektedir. LH, testosteron üretimini uyarır. Prolaktin, LH reseptör ekspresyonunu başlatır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonodotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Gebeliğin 8. ve 18. haftaları arasında testiste fetal Leydig hücreleri steroidogenik olarak inaktiftirler. Bu dönemde fetal Leydig hücreleri tarafından üretilen androjenler, embriyonik farklılaşmada erkek genital organların gelişiminde önemlidir. Daha sonra gebelik süresince ve hipofizden salınan LH uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar (18,20).

2.1.3.1.2 Tubuli Seminiferi Contorti

Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 50 cm uzunlukta iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Seminifer tübül epiteli somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücre popülasyonundan (spermatogonyumlar,

spermatozitler ve spermatidler) oluşan özelleşmiş bir epitelidir. Seminifer tübül epiteli bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan *tunica propria* ile çevrilidir. Miyoid hücrelerin ritmik kasılma aktiviteleri ile hareketsiz spermatozoaların rete testise iletilmesi sağlanır. Spermatozoalar ileri motilite özelliklerini epididimal kanallardan geçtikten sonra kazanır (18,20).

A) Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazal kısmından lümene doğru uzanan bölünme yeteneği olmayan, spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal biçimli hücrelerdir. Puberteye kadar seminifer epiteldeki en belirgin hücrelerdir. Puberteden sonra seminifer epiteldeki tüm hücrelerin %10'unu oluştururlar.

Sertoli hücrelerinin; sitoplazmaları saydam, nukleusları bazale yakın, ince uzun, oluklu hücrenin uzun eksenine paralel ve kromatince fakirdir. Bu yüzden nukleolus belirgindir. Sitoplazmalarında bol miktarda mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum (bol agranüler, az miktarda granüler tip), iyi gelişmiş golgi kompleksi ve ribozomlar bulunur. Bu yapısal özellikleri sertoli hücrelerinin yoğun metabolik aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Ayrıca Sertoli hücrelerinin bazal stoplazmasında 10-25 µm uzunluğunda, 1µm genişliğinde, *inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher)* bulunur. Kimyasal yapı ve fonksiyonu bilinmemekle birlikte son yapılan çalışmalarda lipoprotein reseptör (CLA-1) proteinlerinin birikimi belirlendiği için bu cisimciklerin lipid transportunda ve Sertoli hücreleri tarafından lipidlerin kullanımında görevli olduğu düşünülmektedir (20). Sertoli hücreleri, zengin bir hücre iskeletine (vimentin, aktin ve mikrotübül) sahiptir. Bu da gelişen germ hücreleri için yapısal destek sağlamasında önemlidir (19,20,32).

Sertoli hücreleri, taban ve yan yüzlerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle (zonula okludens) birbirlerine tutunurlar. Bu durum seminifer tübül epitelini bazal ve adluminal kompartman olarak 2 kompartmana ayırır. Bazal kompartman daha dardır ve spermatogonyumları içerir. Adluminal kompartman daha geniş ve lümene yakındır. primer spermatozit, sekonder spermatozit ve spermatidleri içerir. Bazal

kompartmandaki Sertoli hücreleri arasında bulunan bu sıkı bağlantılar, zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2), okludin, kladin “*Kan-Testis Bariyeri*” ni oluşturur. Bu bariyer sayesinde plazma proteinleri ve dolaşımdaki antikorların gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşması ve immun yanıtın oluşması engellenir (35). Spermatogenezis immünolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra meydana geldiği için farklılaşmakta olan germ hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerini yok edebilecek bir bağışıklık yanıtı ve sekonder infertiliteye neden olabilir. *Kan-Testis Bariyeri* seminifer epitelde iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein içeriği bakımından fizyolojik bir kompartmanlaşmanın oluşturulması için gereklidir.

Sertoli hücrelerinin bir çok önemli fonksiyonu vardır bunlar;

- Spermatogenik hücrelerin desteklenmesi, korunması ve seminifer tübül boyunca ilerleyerek intratestiküler kanallara geçişini kolaylaştıran sıvıyı salgılar,
- Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) salgırlar. Bu protein gelişmekte olan olan spermatozoanın normal olgunlaşması için gerekli olan testosteronun konsantre olmasını sağlar,
- İnhibin gibi anterior hipofizden FSH sentez ve salınmasını önleyen endokrin maddeleri salgılar,
- Plazminojen aktivatör, transferrin ve seruloplazmin sentezler. Ayrıca Müllerian-inhibe edici faktör (MIF), kök hücre faktörü ve gliyal hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör gibi büyüme faktörleri salgılar,
- Sertoli hücrelerinin koruma, destek, salgı dışında fagositoz yetenekleri de vardır. Spermogenez sırasında oluşan fazla sitoplazma artıkları sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosit edilir (18,20).

B) Spermatogenik Hücreler

Seminifer epiteli oluşturan hücreler, bazal lamina ve tübül lümeni arasında 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Sırasıyla;

- Spermatogonyumlar (Tip A, Tip B)
- Spermatisitler (Primer Spermatisit, Sekonder Spermatisit)
- Spermatisitler

- Spermiumlar (Spermatozoa)'dır.

Spermatozoaların oluşmasına kadar geçen hücre olgunlaşma süreci *spermatogenez* olarak adlandırılır. Puberteden kısa süre önce, hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisiyle başlar ve erkeklerde yaşam boyu devam eder.Üç farklı faza ayrılır. Bunlar:

- Spermatogonyal Faz (Spermatositogenezis)
- Spermatosit Fazı
- Spermatid Fazı (Spermiyogenez)

1-Spermatogonyal Faz

Spermatogonyumlar; bazal kompartmanda bazal lamina ile direk ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Puberte ile başlayan mitotik hücre bölünmeleri geçirirler.Üç tip spermatogonyal hücre vardır:

- *Dark Tip A (Ad) spermatogonyum*; ince granüllü kromatinli, yoğun bazofilik ve oval nükleusları vardır. Heterokromatin yoğunluğundan koyu görünürler. Mitoz bölünmeleri sonucu hem Ad tip hem de Ap tip spermatogonyumları oluşur.

- *Pale Tip A (Ap) spermatogonyum*; açık renk boyanan ince granüllü kromatinli oval nükleusları vardır. Nükleusları ökromatik olduğundan soluk görünürler. Mitoz bölünmelerle hem Ap tip hem de B tipi spermatogonyumları oluştururlar.

-*Tip B spermatogonyumlar*; yoğunlaşmış kromatin içeren yuvarlak nükleusları vardır. Mitoz bölünmeler sonucu primer spermatositler oluşur.

Tek bir Ap tip spermatogonyumundan oluşan germ hücreleri, ince sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlıdır. Böylece sürekli iletişim halindedirler ve gelişimleri de eş zamanlıdır (20,22,23,36,37,38).

2-Spermatosit Fazı

Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmesi sonucu oluşan primer spermatositler bazal kompartımandan adluminal kompartımana göç ederler. Primer spermatositler seminifer tübül epitelindeki en büyük hücrelerdir ve iki mayotik bölünme geçirirler. Mayoz bölünmeden hemen önce replikasyona uğrarlar. Bunun sonucunda normal sayıda $2n$ kromozom ve iki katı miktarda $4n$ DNA içerirler.

I. Mayoz bölünmenin profaz aşaması dört evreden (Leptoten, Zigoten, Pakiten, Diyakinez) oluşur ve 22 gün sürer. Bu yüzden histolojik preparatlarda primer spermatositler daha fazla görülür. I. Mayoz bölünme sonucunda kromozom sayısı ve DNA miktarı yarıya indiği için oluşan Sekonder spermatosit n sayıda kromozom ve 2n DNA miktarına sahiptir. II. Mayoz bölünmeden önce DNA replikasyonu gerçekleşmediği için bu bölünme sonucunda n sayıda kromozoma sahip spermatidler oluşur (20,38).

3-Spermatid Fazı

Sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşan spermatidler 7–8 µm çapta, diğer hücrelerden küçük, yoğunlaşmış kromatin içeren nukleusları ve seminifer tübül lümeninin yakınında bulunmalarıyla karakteristiktirler. Spermatidler spermiyogenez denen karmaşık bir farklılaşma süreci geçirirler. Bu süreçte, akrozom oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun sperm meydana gelir (39). Spermiyogenez: Golgi fazı, Akrozomal faz ve Maturasyon fazı olmak üzere üç faza ayrılır.

a) Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazmasında bol miktarda gER, mitokondri ve iyi gelişmiş Golgi aygıtı bulunur. Spermiyogenezin bu fazında gER'da hidrolitik enzimler oluşturulur. Bu enzimler, Golgi de modifiye edildikten sonra membranla çevrili küçük PAS(+) preakrozomal granüller haline getirilir sonrada bu granüller birleşerek tek bir akrozomal vezikül oluşur. Vezikül içinde akrozin, hyaluronidaz, proteaz, nöraminidaz, asitfosfataz gibihidrolitik enzimler bulunur. Akrozomal vezikülün pozisyonu gelişmekte olan spermatozoanın ön kutbunu belirler. Bu fazda nükleusa yakın olan sentrioller akrozomun tam aksi yönü olan arka kutba hareket ederler. Arka kutupta olgun sentriol, spermatozoa kuyruğunun aksonem yapısının oluşumunu başlatır. Daha sonra sentriyoller yeniden nükleusa doğru geri döner. Akrozomal vezikülün boyutlarının artmasıyla birlikte nükleusun çevrelemeye başlar ve büyüyebileceği en son noktaya gelince de akrozomal kep olarak adlandırılır (18,20).

b) Akrozomal Faz: Bu evrede spermatidin boyu uzar, nükleusu yoğunlaşır ve mitokondrileri yer değiştirir. Kromozomlar sıkı bir şekilde paketlenir. Kromozomal hacim azaldığından nükleus hacmi de azalmış olur. Ayrıca nükleus düzleşir ve spermatide özgü morfolojisi oluşur. Mikrotübüller, spermatidin uzamasına yardımcı olur ve manşet adı verilen silindirik bir yapı haline gelir. Mitokondriler ise kuyruğun orta parçasında, dokuz dış yoğun liflerin çevresinde sarmal bir kılıf oluştururlar. Böylece kuyruk için gerekli olan enerjiyi sağlarlar (18,20).

c) Maturasyon Fazı: Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermler tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositte spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma oluşur (18). Sonuçta oluşan spermatozoa morfolojik olarak matür ancak fonksiyonel olarak immatür hareketsizdir ve bir oositi dölleme yeteneği yoktur. Hareket yeteneğini epididimisten geçerken, dölleme yeteneğini de dış genital sisteme girdikten sonra kazanır.

Olgun (Matür) Spermatozoa Yapısı

Spermatozoalar hareketli olup baş ve kuyruktan oluşurlar. Baş 4-5 mikrometre uzunlukta 2,5-3,5 mikrometre genişliğinde oval şekillidir. Büyük bir kısmı çekirdek oluşturur. Kromatini yoğun olup hacimce küçülmüştür. Bu spermatozoaya hareketlilik kazandırır (37). Kuyruk 55 mikrometre uzunluktadır. Kalınlık ve tabakalanma farklılığıyla 4 parçadan oluşmuştur. Bunlar:

Boyun; kısa bir parça olup segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriyolden yapılmıştır.

Orta parça; kuyruğun 9+9+2 mikrotübül düzenini dairesel olarak saran ve ucuca düzenlenerek bir halka oluşturmuş mitokondriyon tabakasından yapılmıştır. Orta

parçanın uzunluğu 5-7 mikrometredir.

Esas parça: 45 mikrometre uzunluğunda 0,5 mikrometre kalınlığındadır. Bu parça 9+0+2 mikrotübül düzenini kapsar. Elektron mikroskopta, kuyruğun enine kesiti incelendiğinde dorsal ve ventral uzunluğuna düzenlenmiş kolonlar izlenir. Bu uzunluğa kolonlar, her biri yarım yol seyreden iki dairesel çubukla birbirlerine bağlanırlar. Dorsal kolondan başlayan ikinci dairesel çubuk yine yarım yol döndükten sonra dorsal kolona bağlanır. Bu yapı enine kesitlerde büyük ve küçük iki kompartmana bölünmüş olarak gözlenir. küçük kompartmanda 3, büyük kompartmanda 4 kalın koyu dış fibril bulunur.

Son parça: Esas parça kuyruğun ucuna 5-7 mikrometre kala sona erer. Bu noktanın distalinde kalan kısım, son parçadır. Son parçada ortada aksonem ve üzerinde hücre zarı bulunur (40).

2.1.3.2 Genital Kanallar

Genital kanallar; intratestiküler kanallar ve ekstratestiküler kanallar olmak üzere ikiye ayrılır:

1- İntratestiküler Genital Kanallar

Testislerin içinde yer alan intratestiküler genital kanallar, seminifer tübüllerle epididimisi birbirine bağlar. Bu kanallar; tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentestir.

a) Tubuli Rekti: Seminifer tübüllerin mediastinum testis içerisinde devamı olan kısa, düz kanallardır. Tubuli rekti, seminifer epitelde oluşturulan spermatozoayı rete testise iletir. Seminifer tübüllere yakın olan ilk yarısı Sertoli hücreleriyle, rete testise yakın olan kısmı ise basit kübik epitel ile döşelidir. Bu kübik hücreler kısa, küt mikrovillüsler ve tek bir flagelluma sahiptir (18,19,36,37).

b) Rete Testis: Mediastinum testis içerisinde yer alan, tek katlı kübik epitel ile döşeli labirent şekilli boşluklardan oluşur. Tubuli rektideki gibi kübik hücreler çok sayıda kısa, küt mikrovillüsler ve tek bir flagelluma sahiptir (19,36,37)

c) Duktuli Efferentes: Rete testisten çıkan 10-20 kısa kanalcık şeklindeki yapılardır

ve tunika albugineayı geçerek spermatozoaları epididimise iletir. Her bir kanalcığın lümenini çevreleyen epitel silsiz kübik hücrelerden silli prizmatik hücrelere doğru değişim gösterir. Epitel hücrelerinin bu dizilimi kanal lümenine kavisli bir görünüm kazandırır. Silli kübik hücreler sayesinde spermatozoonlar epididimise iletilir. Tüm duktus sisteminde kinosilyanın görüldüğü tek yer duktuli efferentes epitelidir (18,19,36,37,41).

2- Ekstratestiküler Genital Kanallar

Testislerin dışında bulunan ekstratestiküler genital kanallar; epididimis, duktus deferens ve ejakülator kanalıdır.

a)Epididimis: Testisin üst ve arka yüzeyleri boyunca ilerleyen 7 cm uzunluğunda oldukça kıvrımlı ince uzun tübüler yapılardır. Üç bölümden oluşur. Bunlar; baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kauda)dur. 10-20 adet duktuli efferentesin birleşmesiyle oluşan baş kısım oldukça kıvrımlıdır ve gövde kısmı ile devam eder. Bu kıvrımlı yapısı kuyruğun distal kısmında kaybolur ve duktus deferens ile devam eder. Epididimisin lümenini psödostratifiye epitel oluşturur ve iki farklı tip hücre içerir. Bunlar Bazal Hücreler ve Esas Hücrelerdir.

Bazal Hücreler; epitelde bulunan kısa boylu hücrelerdir. Şekilleri piramidalden polihedrale doğru değişkenlik gösterir. Nukleusları yuvarlak ve yoğun heterokromatiktir. Stoplazma miktarı ve organel sayısı azdır bu yüzden soluk renkli gözüktürler. Epitelin kök hücreleri olan Bazal hücrelerin bölünmeleri sonucu esas hücrelere de kaynak sağlarlar (19,36,37)

Esas Hücreler; epitelde bulunan uzun boylu hücrelerdir. Baş bölgesinde bulunan Esas hücreler çok uzunken kanal boyunca kademeli olarak azalarak gövde kısmında alçak prizmatik kuyrukta ise kübik şekillidir. Bu hücrelerin serbest yüzeyinde uzun boylu mikrovillus demetleri vardır. Bunlar hareketsizdirler ve stereosilya olarak adlandırılırlar. Nukleusları oval şekilli, bir veya iki nukleolus içerirler. Bazal hücrelere göre nukleusları daha soluktur. Sitoplazmalarında nukleus ve bazal plazmalemma arasına yerleşmiş bol miktarda düz endoplazmik retikulum bulunur. Ayrıca Golgi kompleksi, çok sayıda apikal yerleşimli granüllü endoplazmik retikulum, endolizozom ve multiveziküler cisimler de vardır (19,20,36,37).

Esas hücrelerden salgılanan gliserofosfokolin ve sialik asit gibi glikoproteinler spermatozoon kapasitasyonunu engelleyerek dişi genital kanala girene kadar sekonder bir oositi döllemesini engellemiş olur. Testisten ayrıldığında fizyolojik açıdan tam olgunlaşmamış olan spermatozoonlar Epididimisinde toplanır, olgunlaşır ve depolanır. Üç ile beş günlük süre içerisinde epididimisin baş ve gövde kısımları boyunca ilerlerken hareketlilik ve dölleme yeteneği kazanır (20,36,42). Epididimis epiteli altındaki gevşek bağ dokusu, dairesel olarak düzenlenmiş düz kas hücrelerinden oluşan bir tabaka ile sarılıdır. Bu tabakanın peristaltik kasılmaları ile spermatozoonların duktus deferense iletilmesi sağlanır (19,37,40).

b) Duktus Deferens (Vaz Deferens): Epididimisten duktus deferense geçişte lümen genişler ve duvar kalınlaşır. Her bir duktus deferens küçük, düzensiz şekilli bir lümene sahip kalın duvarlı, yaklaşık 45 cm uzunluğunda müsküler birer kanal şeklindedir. Bu kanal epididimisin kuyruk kısmından ejakülatör kanala doğru spermatozoonları taşır.

Duktus deferensin epiteli sterosilyalı psödostrafiye kolumnar epiteldir. Epididimis epiteline benzer ancak esas hücreler daha kısadır. Epitelin altındaki fibroelastik gevşek bağ dokusu kalın düz kas tabakası ile çevrelidir. Bu düz kas tabakası içte ve dışta longitudinal yerleşimli, ortada ise dairesel yerleşimlidir. Her bir duktus deferensin genişlemiş olan son kısmı oldukça kıvrımlı kalın bir epitele sahiptir ve bu kısım ampulla olarak isimlendirilir. Ampullanın seminal vezikülle birleşme yeri de ejakülatör kanal olarak adlandırılır (18,19,20,36,37).

c) Ejakülatör Kanal: Duktus deferensin ampullası ile seminal vezikül kanalının birleştiği yerde bulunan yaklaşık 2 cm uzunluğundaki bu kanallar, prostat bezi ile çevrelenmiş ve onun içine girmiş olan kısa düz tübüllerdir. Ejakülatör kanalın lümeni basit prizmatik epitelle döşelidir. Supepitelyal bağ dokusu kıvrımlıdır, bu yüzden lümen düzensiz şekillidir. Bu kanalın duvarında hiç düz kas yoktur.

2.1.3.3 Yardımcı Genital Bezler

Erkek genital sistemde bulunan yardımcı bezler; bir çift veziküla seminalis, bir çift glibulboüretalis bez ve prostat bezidir.

1- Seminal Vezikül: Çift olarak bulunan seminal veziküller yaklaşık 15 cm uzunluğunda, çok kıvrımlı tübüllerdir. Prostat bezi ile idrar kesesinin boyun kısmının arka yüzü arasına yerleşim gösterirler ve prostat bezinin tam üzerinde duktus deferensin ampulla kısmına katılırlar (36,37,43).

Seminal veziküllerin mukozası çok sayıda katlantılar içerir. Böylece salgı yüzey alanı artar. Katlantıların oluşturduğu düzensiz bölmeler lümen ile iletişim halindedir. Seminal vezikül epiteli yalancı çok katlı prizmatiktir. Epitel uzun, silyumsuz prizmatik hücreler ve bazal lamina üzerine oturan kısa, yuvarlak hücrelerden oluşur. Prizmatik hücreler, apikal sitoplazmalarında bulunan büyük salgı vezikülleri ve iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ile protein salgılayan hücrelerin yapılarına sahiptirler.

Semen hacminin %70'ni oluşturan seminal vezikül salgısı beyazımsı sarı renkte visköz yapıdadır. Salgı başta fruktoz olmak üzere spermatozoa için gerekli olan basit şekerler, aminoasitler, askorbik asit ve prostaglandinleri içerir (19, 20).

2- Prostat Bezi: Yaklaşık 20 gr ağırlığındadır. Prostat; symphysis pubica'nın alt kısmının arka tarafında ve septum rectovesicale'nin önünde yer alır. Üst yüzü direk olarak mesanenin altına oturur ve apeksi aşağı doru olup m.sphincter urethrae externus ile temas halindedir (21). Prostat bezi, üretra ve ejakülator kanalların açıldığı en büyük yardımcı bezdir. Bez pelvis içerisinde, mesanenin altında yer alır ve üretranın prostatik parçasını çevreler. 30-50 kadar tübüloalveolar bezden oluşur. Prostat bezinin elemanları tek katlı veya yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşelidir. Hücrelerde bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum, büyük bir Golgi, çok sayıda salgı granülü ve lizozom vardır. Temel fonksiyonu, seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunan şeffaf, seröz lipidlerden, proteolitik enzimlerden, asit fosfatazdan, kalsiyumdan, fibrinolizinden ve sitrik asitten zengin hafif alkali (pH 7,29) salgıyı salgılamaktır (19,20,36). Alkali olması döllenme olayı için önemlidir. Çünkü erkek genital kanalın diğer salgıları ve vajinal salgılar asidik özelliğe sahiptir.

Spermatozoaların hareket yeteneği kazanabilmesi için de ortam pH'sının 6,0-6,5 arasında olması gerekir. Bu yüzden de prostat sıvısı ejakülat içerisindeki diğer sıvıların asiditesini nötralize eder. Böylece spermatozoa motilitesi ve fertilizasyon yeteneği artmış olur (42).

3- Bulboüretal Bezler (Cowper's Bezleri): 3-5 mm çapında olan bulboüretal bezler penis köküne ve membranöz üretranın tam başlangıç kısmına doğru yerleşim gösterirler. Bezler, yapısal olarak mukus salgılayan bezlere benzeyen bileşik tübüloalveolar bezlerdir. Epitel tek katlı prizmatiktir ve boyu bezin fonksiyonuna bağlı olarak değişir.

Bulboüretal bezlerin salgısı, üretranın lümenini kayganlaştırmada rol oynayan koyu kaygan bir sıvıdır. Salgısı, berrak mukus benzeridir ve bol miktarda galaktoz ve galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metilpentoz içerir. Tüm yardımcı bezlerin salgıları, penis ereksiyonunu takiben salınmaya başlar (18,19,20,36,37).

2.1.4 Erkek Genital Sistem Histofizyolojisi

Vücut içi sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (pleksus pampiniformis) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.

Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin foliküler stimülan (FSH) ve lüteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH intertisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteronu yapımını stimüle eder. FSH'nin ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile

bağlanır ve testosteronu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronla da inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir (18,44).

2.2 KANSER VE ALKİLLEYİCİ AJANLAR

Kanser; hücre büyümesi ve bölünmesindeki döngüyü düzenleyen mekanizmalardaki bozukluk sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Kanser hücrelerinin kontrolsüz bir biçimde bölünüp çoğalması sonucu, normal doku ve organlara metastaz yaparak tüm vücuda yayılır. Kanserler üç ana grupta toplanır: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusunda gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir. Tümörler ayrıca geliştikleri organa ve ilgili hücrenin türüne göre de sınıflandırılır (45).

Günümüzde kanser tedavilerine her geçen gün yenileri eklenmektedir. Klasik tedavi yöntemleri; cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapidir. Bu tedavi yöntemlerine ek olarak alternatif tedaviler, lazer tedavisi, gen tedavisi, immünoterapi, anjiogenez inhibitörleri, kemik iliği transplantasyonu ve kök hücre nakli uygulaması gibi tedavi yöntemleri bulunmaktadır (46).

Kemoterapide kullanılan antineoplastik tedavinin amacı normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerin büyüme ve çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı selektiflikleri azdır. Bu yüzden kanser hücresine karşı sitotoksik etki gösterirken aynı zamanda gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl follikülleri ve spermatozoalar gibi hızlı bölünen normal hücrelere de etki etmektedir (47,48). Antineoplastik ilaçlar etki mekanizmalarına göre; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, serbest radikaller, mitotik inhibitörler şeklinde sınıflandırılmaktadır (49).

2.2.1 Alkilleyici Ajanlar

Alkilleyici ajanlar çeşitli kimyasal bileşiklerden oluşan ve hücre siklusuna bağlı olmayan ön ilaçlardır. Genel olarak lösemi, lenfoma gibi hastalıklar ve kemik iliği transplantasyonu öncesi hazırlık rejiminde kullanılmaktadır. Bu ajanların çoğu kanserli hücrede kendilerine uyan etilenimonyum türevlerine ve daha sonra pozitif yükle yüklü karbon içeren karbonyum türevlerine dönüşmektedirler. Etkilerini, DNA molekülünde genellikle bir pürin bazı olan guaninin yedi numaralı azotuna bağlı nükleofilik grupları alkilleyen, önce etilenimonyum türevlerine sonra da pozitif yüklü karbon içeren karbonyum türevlerine dönüşürler. Sonuçta da bazların çapraz bağlanmasına, anormal baz çiftlerine ve DNA zincir kırıklarına neden olurlar (50). Akut yan etkiler diğer ilaçlarla benzer olmakla beraber; gonadal atrofi, pulmoner fibrozis, renal toksisite, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etki gibi uzun dönemli kalıcı yan etkiler de görülür (51). Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması;

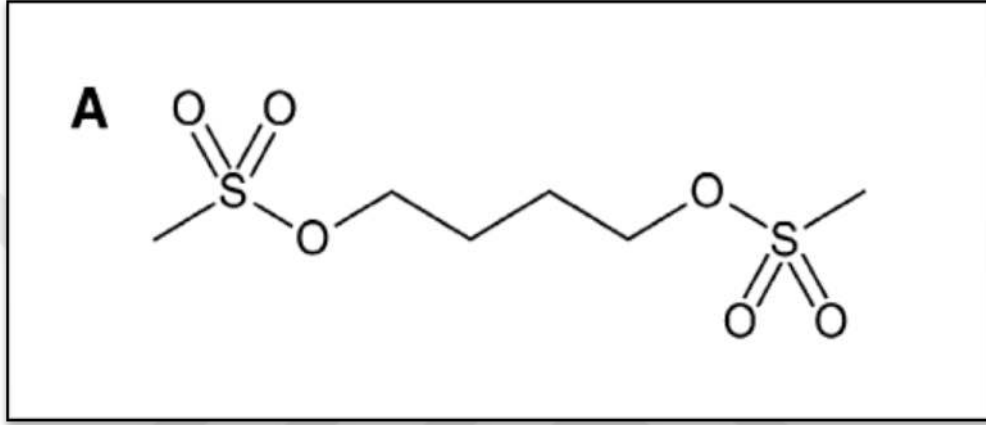
- Azotlu hardallar (mekloreteamin, siklofosfamid, klorambusil, melfalan)
- Nitrozüreler (busulfan, tiyotepa, karmustin, lomustin, streptozotosin)
- Non-klasik alkilleyici ilaçlar (prokarbazin, dakarbazin ve altretamin)
- Platin bileşikleri (sisplatin, karboplatin) (52).

2.2.1.1 Busulfan

Busulfan ilk defa 1954 yılında kronik myeloid lösemi tedavisinde kullanılmıştır (53). Günümüzde kullanımı devam eden Busulfan, erişkin ve pediatrik siklofosfamid ya da fludarabin/klofarabin ile birlikte kemik iliği transplantasyonu hazırlık rejiminde kullanılmaktadır. Ayrıca kronik myeloid lösemi ve diğer lösemiler, lenfoma ve myeloproliferatif hastalıklarda da kullanılmaktadır (7). Kemik iliği transplantasyonu ile ciddi immun yetmezliği olan hastalarda işlevi bozulan B hücreleri ve kaybedilen T hücrelerinin de yerine konması sağlanmaktadır. Hastada bulunan hasarlı B hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla nakil öncesi Busulfan gibi immunosüpresan bir ajan kullanılır (10).

2.2.1.1.1 Busulfan Kimyasal Yapısı

Busulfan (1,4-bis[metansulfonyl] butan), alkil sülfonat ailesine ait çift fonksiyonlu anti-neoplastik, alkileyici bir ajandır. Molekül ağırlığı 246,3 dalton olup dört karbonlu alkil zincirinin zıt kutuplarına iki metansülfonat grubunun eklenmesiyle oluşur. Beyazımsı kristalize toz yapısındadır. Su, alkol ve eterde hafifçe, aseton ve kloroformda serbestçe çözünür. İritan bir maddedir. Eriyik halde oda sıcaklığında 4 saat, 4°C'de 30 gün stabilitesini korur (53,54).



Şekil 3: Busulfan'ın kimyasal yapısı a (1,4-butanediol dimethanesulphonate) (55)

2.2.1.1.2 Busulfan Metabolizması

Busulfan küçük ve ileri derecede lipofilik bir moleküldür. Proteinlere minimal bağlanır. Kan-beyin bariyeri ve plasentayı aşar. Beyin omurilik sıvısı ve plazma oranı 1.3:1.0 yani benzer oranda bulunur. Esas olarak karaciğerden metabolize edilir (53,11). Busulfan'ın yarılanma ömrü yaklaşık 2,5 saattir. Toplam plazma klirensi ise 2.25–2.74 mL/dk/kg'dır. Uygulanan dozun %30 kadarı 48 saat içinde ve bunun %1'i değişmemiş halde idrarla atılır. Major idrar metaboliti metan sülfonik asittir (8,56). Busulfan doku dağılımında en fazla karaciğerde bulunur, glutatyon-S-tranferaz (GST) enzim ailesi tarafından inaktif metabolitlerine metabolize edilmektedir (11). Glutatyon-S-tranferaz enzimleri farklı kromozomlarda yer alan bir süpergen ailesidir. Bu enzimler, busulfan ve siklofosfamid gibi kimyasalların metabolitleri ve reaktif oksijen radikalleri gibi güçlü elektrofilleri glutatyon ile konjuge ederek detoksifikasyona uğratırlar. Busulfan karaciğerde GST tarafından sulfonyum iyonuna metabolize edilir, bu da lipofilik olan tetrahidrotiofene parçalanır. Tetrahidrotiofen hepatositlere ve sinusoidal endotel hücrelere toksiktir (57). Glutatyon-S-tranferaz aşırı ekspresyonu

kemoterapötiklerin sitotoksik etkisine dirence neden olurken; aksine daha az işlevsel olduğu bireyler kemoterapötik ajanların toksisitesine duyarlı olurlar (11).

2.2.1.1.3 Busulfanın Yan Etkileri

Hücre siklusunun her evresindeki hücreye etki edebilir; hücre replikasyonu, DNA tamiri ve gen transkripsiyonunu bozar. Temel biyolojik aktivitesini hücre içi nükleofillerin alkilasyonu yolu ile oluşturur. Diğer alkilleyici ajanlar reaktif ara metabolit oluşturarak etki ederken, busulfan, bimoleküler yer değiştirme reaksiyonu oluşturur. Sarmal içi veya sarmal arası guanin ile busulfanın reaksiyonu sonucu DNA-DNA çapraz bağları gerçekleşir. Bu sayede diğer alkilleyici ajanlardan farklı olarak myeloid prekürsörler üzerine olan derin etkisi açıklanabilir. Busulfanın oluşturduğu DNA-protein çapraz bağları ise sitotoksitede rol oynar. Ayrıca güçlü mutajenik etkisi ile kromozomal aberasyonlara yol açabilir (11,53,58).

Busulfanın yapılan insan ve hayvan çalışmalarındaki raporlara göre karsinojenik etkisi, mutajenik ve teratojenik etkileri bulunmaktadır. Busulfan içeren rejimler sırasında birçok toksisite görülmektedir. Bunlar;

Veno-oklüziv hastalık (VOH); Busulfan, özellikle siklofosamid veya melfalan ile birlikte uygulandığında hepatik toksisiteye neden olmaktadır. Genellikle hematopoetik kök hücre nakli sonrası ilk 3 hafta içinde %5-31 oranında çocuk ve erişkinlerde VOH görülebilir, mortalite oranı %50'ye kadar çıkabilir (58,59). Hassas hepatomegali, sıvı retansiyonu, kilo artışı ve serum bilirubin yüksekliği ile karakterizedir. Karaciğerde sentrilobüler bölgedeki hepatositlerin nekrozu sonucu intrahepatik venüllerin non-trombotik obstrüksiyonu VOH'a neden olmaktadır (11).

Gastrointestinal Sistem; bulantı, kusma ve iştahsızlık diğer kemoterapötik ilaçlarda olduğu gibi busulfanın en sık görülen yan etkilerindendir. Ayrıca evre II ve III mukozit görülme sıklığı sırasıyla %44 ve %26 olarak bildirilmiştir (60).

Nörotoksisite; hematopoetik kök hücre nakli hazırlama rejiminde kullanılan busulfan ensefalopatinin sık nedenlerinden biridir. Rutin antikonvülzan profilaksisi öncesinde yüksek doz busulfan alan erişkin hastaların yaklaşık %10'unda, çocukların %7,5'unda nöbet görülmektedir. Bu nöbetler genellikle jeneralize; nadiren çok sayıda ve komplike karakterlidir (61).

Gonadal Yetmezlik; alkilleyici ajanların özellikle hızlı bölünen hücreleri etkilemeleri nedeniyle üreme hücreleri üzerine de negatif etkileri bulunmaktadır. Ovum ve primordial folikül sayısında azalma (62), testiküler histolojik hasar ve atrofi, spermatozoa sayısı ve hareketliliğinin azalması ve kalıcı sterilite de dahil olmak üzere üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri vardır. Meydana gelen bu infertiliteye yönelik yetişkin erkek hastalarda tedavi öncesi spermatozoa ya da testis kriyoprezervasyon işlemi gerçekleştirilirken prepubertal dönemdeki erkek hastalarda henüz spermatozoa üretimi olmadığından yalnızca spermatogonial hücrelerin dondurulması mümkündür. Fakat prepubertal testis dokusunun dondurulması henüz deneysel aşamadadır. Ayrıca dondurulan hücrelerin genetik hasarındaki yüksek risk de henüz ölçülebilir değildir (63).

2.3 ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Canlılar için gerekli olan oksijen belli koşullar altında insan sağlığını olumsuz etkiler. Bu etki, oksijenin moleküler durumu ile ilgili olup, aerobik metabolizma sürecinde oksijenin moleküler formunun azalmasından dolayı potansiyel olarak reaktif moleküllerin oluşmasından kaynaklanır. Serbest radikaller enzimlerin çeşitli etkileri ile oluşabilir ve aşırı derecede üretilmesi sonucu serbest radikaller lipitlere, proteinlere, şekerlere ve DNA'ya oksidatif hasar yükler. Serbest radikallerin bu zararlı etkilerine karşı organizmada bulunan koruyucu maddelere 'Antioksidan' maddeler, olaya da 'Antioksidan savunma sistemi' denir (64). Normal şartlarda serbest radikallerin konsantrasyonları fizyolojik antioksidanlarla dengelenir. Ancak serbest radikallerin aşırı derecede üretilmesi sonucu antioksidanların tükenmesine neden olur. Bu redüksiyon oksidasyon eşitsizliği oksidatif stres olarak tanımlanır ve bu durum doku hasarı süreci ve gelişmesine neden olarak, çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynar (65). Fizyolojik antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda bu zararlı etkiler enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından dengelenir. Bu antioksidan koruma sistemleri serbest radikalleri direk olarak ortadan kaldırdıkları için biyolojik sistemler için yüksek düzeyde koruma sağlarlar. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (66):

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

a) Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,

- b) Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- c) Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

a) Temizleme (scavenging) etkisi: Oksidanları daha zayıf bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve Mikromoleküller bu yolla etki ederler.

b) Baskılama (quencher) etkisi: Oksidanlara bir proton ekleyerek aktivitelerini azaltma veya inaktif hale dönüştürmedir. Flavonoidler ve vitaminler etkilerini bu yolla gösterirler.

c) Onarma (repair) etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarmadır.

d) Zincir koparma (chain breaking) etkisi: Oksidanları kendilerine bağlayarak fonksiyonlarını engellemez. Bazı ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini ise etkilerini bu şekilde gösterirler (67).

Antioksidanlar; endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılır (Tablo 1).

Tablo 1: Antioksidanların sınıflandırılması (66).

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Makromoleküller	Mikromoleküller
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Seruloplazmin	Vitamin E
Katalaz (CAT)	Transferin	Vitamin C
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	Ferritin	Vitamin A
Glutasyon Redüktaz (GR)	Hemoglobin	Tiyol içerenler:
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Miyoglobin	• Glutasyon
Mitokondrial sitokrom oksidaz		• N-asetil sistein
Hidroperoksidaz		• Metiyonin
		• Kaptopril
		Glukoz
		Ürik asit
		Bilirubin
		Albumin
		Ubiquinon
		Melatonin
		Selenyum
		Lipoik asit

EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Trolox-C
Allopurinol	Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler. • Ebselen, Asetilsistein
Oksipurinol	
Folik asit	Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları • Mannitol, DMSO
- NADPH oksidaz inhibitörleri	
Adenozin	Demir selatörleri • Desferroksamin • Dimetiltiyoüre
Lokal anestezikler	
Kalsiyum kanal blokörleri	
Non-steroid antiinflamatuvarlar	Sitokinler • TNF, İnterlökin-1
- Nötrofil adezyon inhibitörleri	
- Soya fasulyesi inhibitörleri	Barbitüratlar
- Rekombinant human-SOD	Flavonoidler

2.3.1. Enzimatik Antioksidan Savunma

Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz enzimi ilk kez 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Bu enzim, süperoksit anyonunu hidrojen perokside ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (68,69).



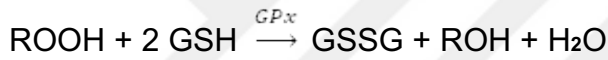
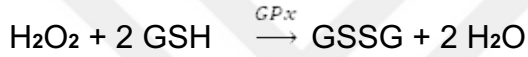
Enzimatik sistemler sitozolik, mitokondrial ve ekstrasellüler olmak üzere SOD'un 3 tipini içerir (70). İnsanda SOD' nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitoplazmada bulunan Cu ve Zn içeren SOD ve mitokondride bulunan Mn içeren SOD' dir. Süperoksit dismutaz enzimi, oksijeni metabolize eden hücreleri serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korurken hücre membranını da lipid peroksidasyonundan korur (71).

Katalaz (KAT): Katalaz enzimi, H₂O₂' yi, oksijen ve suya parçalar (72).



Yapısında 4 tane hem grubu içerir. Çoğunlukla hücrelerin peroksizomlarında bulunur ve peroksidaz aktivitesi gösterir ancak büyük moleküllü lipit peroksitlerine etki etmez (73).

Glutasyon Peroksidaz (GPX): Sitozolik bir enzim olan GPx tetramer yapıdadır. Dört selenyum atomu içerir. GPx aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar:



Fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz da (PLGPer) monomerik, selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirgeyerek, özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar.

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma

Redükte Glutasyon (GSH): Glutasyon, başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek miktarda bulunan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptit olup aktif bir (-SH) grubuna sahiptir. Suda çözünebilen bir antioksidan ve indirgeyici ajandır. Pek çok metabolik aktiviteye sahiptir. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca protein yapısındaki -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Amino asitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler. Glutasyon peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH transferaz gibi enzimlerin substrat veya kosubstratıdır (74).

C Vitamini (Askorbik Asit): C vitamini (askorbik asit), kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilen bir vitamin olan C vitamini, insanlarda sentezlenemediğinden diyetle alınması gerekir (75). Özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunan C vitamini ince barsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır. Dokularda ve plazmada askorbat iyonu şeklinde bulunur. Askorbik asidin organizma için önemi, indirgeyici gücünün yüksek olmasından kaynaklanır. Bu özelliği ile hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek, lipitleri ve zarları da oksidan hasara karşı korur. C vitamini antioksidan özelliğinin yanında oksidan özelliğe de sahiptir. Fe^{+3} 'i Fe^{+2} 'e indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür (76). Ancak bu etkisini düşük konsantrasyonlarda gösterir, yüksek konsantrasyonlarda ise antioksidan etkiye sahiptir. Sulu fazda önemli bir zincir kırıcı antioksidandır (77).

E vitamini (α - tokoferol): E vitamini tokoferoller ve tokotrienoller olarak sınıflandırılmış bir vitamindir (78). Alfa, beta, gama ve delta olarak adlandırılan dört tokoferol karışımından oluşmaktadır (79). Antioksidan aktivitesi en yüksek olanı alfatokoferoldür. E vitamini avokado, asparagus, bitkisel yağlar, fındık, lifli yeşil sebzelerde yüksek oranda bulunur. Lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu serbest radikal temizleyicilerindendir. Zincir kırıcı bir antioksidandır. Aynı zamanda singlet oksijenin kuvvetli bir tutucusudur. Ayrıca hidroksil radikali, peroksil radikali ve süperoksitle direkt olarak reaksiyona girmektedir. Okside olan E vitamini, parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından tokoferole geri çevrilir (80).

2.3.2.1 Alfa Lipoik Asit (Ala)

Alfa lipoik asit (ALA) ya da “thioctic” asit, fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktivitesi olan doğal bir moleküldür. Hem lipofilik hem de hidrofilik ortamlarda etkinlik gösterir. Aynı zamanda radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin süpürülmesi, hücre haraplarının onarılması ve endojen antioksidan kapasitesinin artırılması gibi antioksidan savunma sisteminin

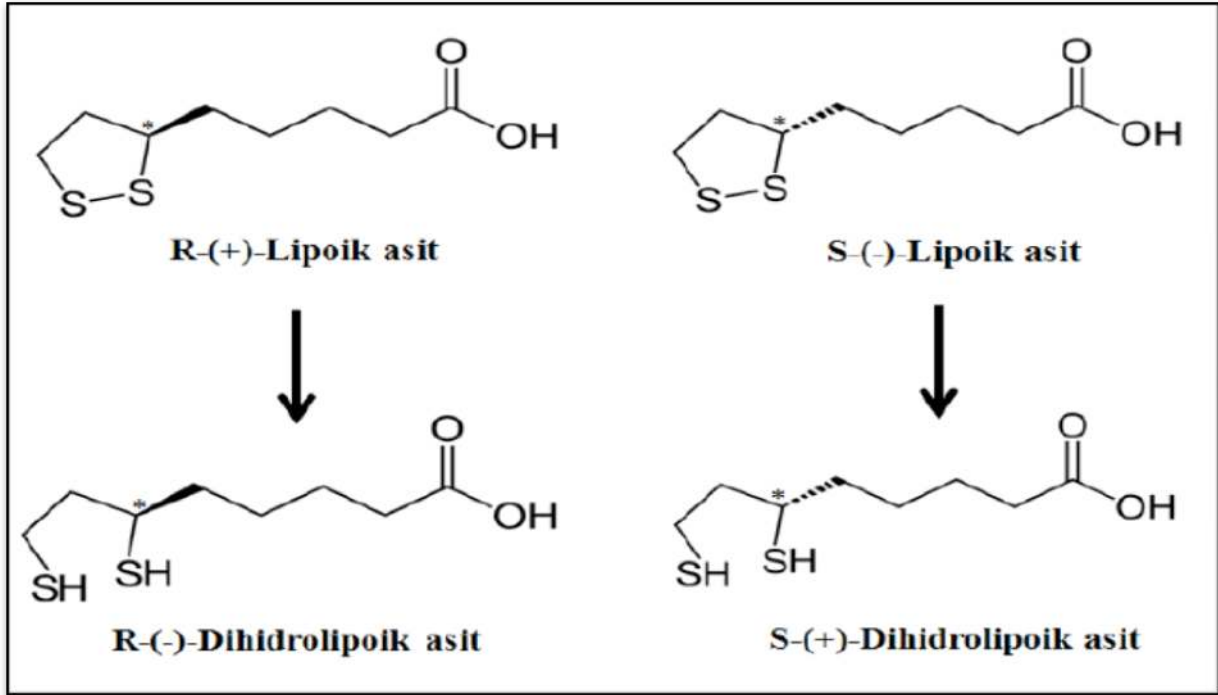
bütün basamaklarında da etkili olduğu için evrensel bir antioksidan olarak adlandırılır (81,82).

Alfa lipoik asit ilk kez Reed ve ark. tarafından 1951 yılında izole edilmiş olmasına rağmen aslında 1937 yılında Laktobasillus'un gelişimi için gerekli olan "potato growth factor" denilen patates ekstresinin bir bileşeni olarak bulunmuştur (13,14). Memeli dokuları 5-25 nmol/g Alfa Lipok Asit içermekle birlikte, bunun büyük bir kısmı proteine bağlı olarak bulunur ve dışarıdan verilmediği sürece hücrede çok az miktarda serbest Lipoik Asit bulunur (82). Çeşitli meyve, sebze ve hayvansal dokular farklı miktarda lipoik asit içerir. En fazla Alfa lipoik asit içeren bitkiler sırasıyla ıspanak, brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinçtir. Hayvansal dokular içerisinde ise böbrek, kalp ve karaciğer Lipoik asit açısından zengin kaynaklardır (83).

2.3.2.1.1 Alfa Lipoik Asitin Kimyasal Yapısı

Alfa lipoik asitin; 1,2 dithiolane-3-pentanoic acid, 6,8 thioctic acid ve 1,2 dithiolane-3-valeric acid gibi birçok kimyasal ismi vardır. Sekiz karbonlu bir molekül olan Alfa lipoik asit içerdiği beşli halka yapısında iki sülfür atomu ve bir karboksilik asit grubu bulundurur ve bu disülfid yapıdan dolayı tiyol bileşikler grubunda yer alır (84).

Alfa lipoik asit iki formda bulunur. Bunlardan okside formuna Alfa lipoik asit ya da lipoik asit, redükte formuna ise Dihidrolipoik asit (DHHLA) denir. Okside Lipoik asitte 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı bir halka meydana getirirken, redükte DHHLA açık zincir şeklinde olup 6. ve 8. pozisyonda bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunur. Alfa lipoik asit içerdiği asimetrik karbon atomundan dolayı da, R-lipoik asit (R-ALA) ve S-lipoik asit (S-ALA) olarak iki optik izomere sahiptir (Şekil 4). R formu doğal olarak oluşurken S formu sentetiktir. Gerek redükte gerekse okside formu biyolojik aktivite göstermesine karşın Alfa lipoik asitin en aktif formunun DHHLA olduğu belirtilir (85).



Şekil 4: Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asidin R- ve S- Formları

2.3.2.1.2 Alfa Lipoik Asitin Metabolizması

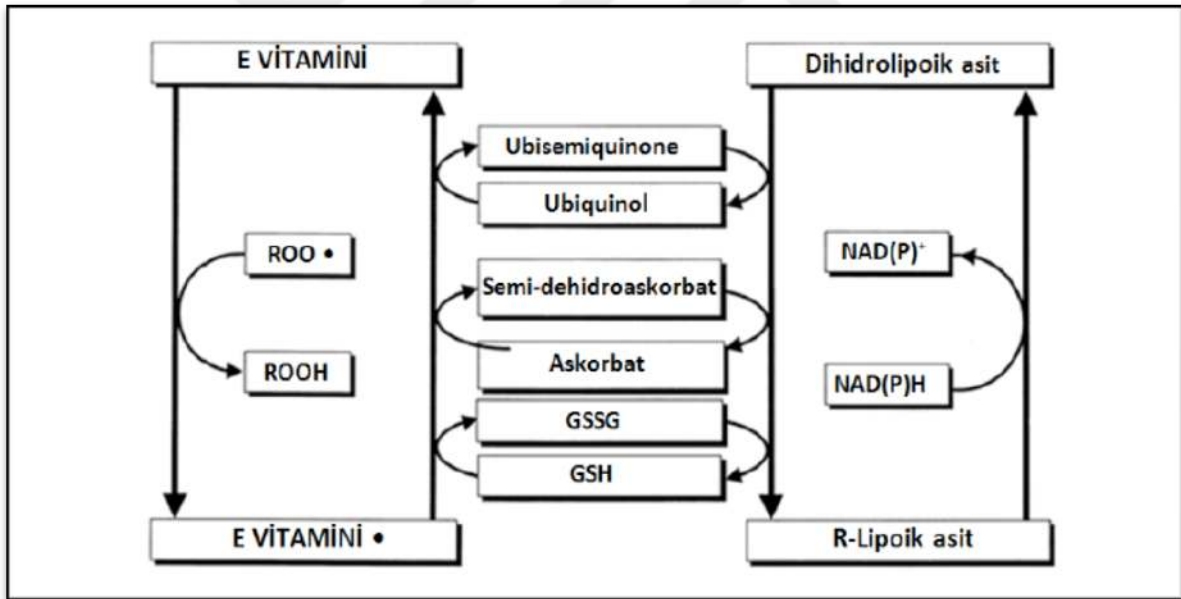
Alfa lipoik asit diyetle alındığında %93'ünden fazlası barsaklardan hızla emildikten sonra, başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda daha aktif formu olan DHLA' e indirgenerek metabolize olur (86). Alfa lipoik asit hücreye girdikten sonra sitozolik enzimler olan GSH Redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E3 tarafından indirgenir. Mitokondrial enzim E3, NAD(P)H harcayarak Alfa lipoik asiti DHLA'de indirger ve sonuçta da idrarla atılır (87). Alfa lipoik asitin hem redükte hem de okside formu güçlü bir antioksidan işleve sahiptir (88).

İnsanlar için Alfa lipoik asitin kullanılabilir üst sınırı belirlenmemiş olmasına karşın hayvanlarda LD50 dozları hayvan türüne bağlı olarak farklılık gösterir. Köpeklerde 400-500 mg/kg, kedilerde 30 mg/kg, farelerde 500 mg/kg ve ratlarda >2000 mg/kg olarak belirlenmiştir (89,90,91,92). İnsanlarda intravenöz olarak 600 mg/kg/gün dozunda 3 hafta boyunca ve oral olarak günde 3 defa (600 mg) olmak üzere 6 ay boyunca 1800 mg Lipoik asit uygulaması sonucu herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (93,94).

2.3.2.1.3 Alfa Lipoik Asitin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkileri

Alfa lipoik asit suda ve yağda çözünebilen bir antioksidandır. Serbest oksijen, süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri, hipoklorit ve peroksinitrit gibi serbest radikalleri nötralize eder (95). Metalleri şelasyon yapma yetenekleri sayesinde vücut için oldukça tehlikeli olan mangan (Mn^{+2}), çinko (Zn^{+2}), bakır (Cu^{+2}), kurşun (Pb^{+2}) gibi toksik metalleri yakalar, bağlar ve nötralize eder (96).

Lipoik asit sahip olduğu antioksidan etkilerinin yanında diğer antioksidanları yenileyici ve hücre içi düzeylerini artırıcı etkileri de vardır. Çünkü bir antioksidan serbest radikali nötralize edince antioksidan özelliğini kaybeder. Ancak başka bir antioksidan yardımı ile yenilenebilir. Lipoik asit de glutatyon, GSH, vitamin C,E ve mitokondriyal antioksidan koenzim Q10 (ubikinon) gibi bir çok iyi bilinen antioksidanı radikal veya okside formlarını indirgeyerek yenileyebilir (97).



Şekil 5: E ve C Vitamini, Ubikinol, Glutatyon ve R-Lipoik Asitin Redoks Siklusunda Aralarındaki Etkileşimi Gösteren Antioksidan Ağ (98).

Tablo 2: Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asitin Süpürülmesinde Etkili Oldukları Reaktif Oksijen Türleri (98).

OKSİDAN	LİPOİK ASİT	DİHİDROLİPOİK ASİT
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Evet	Evet
Singlet oksijen (-O ₂)	Evet	Hayır
Hidroksil radikali (OH ⁻)	Evet	Evet
Nitrik oksit radikali (-NO)	Evet	Evet
Süperoksit radikali (O ₂ ⁻)	Hayır	Evet
Hipokloröz asit (HOCl)	Evet	Evet
Peroksinitrit (ONOO ⁻)	Evet	Evet
Peroksil radikali (ROO [*])	Hayır	Evet

Serbest radikaller aktive DNA, lipid ve proteinler gibi maddelerde hasar oluştururken Lipoik asit okside olmuş molekül hasarının onarımında rol alır (95). Ayrıca Lipoik asit spesifik proteinlere kovalent olarak bağlanarak kofaktör olarak görev yapar. Bu sebeple de enerji metabolizmasında önemli bir yeri vardır. Piruvatın asetil koenzim A (koA)'ya dönüşümünü katalize eden piruvat dehidrogenaz, süksinilko A oluşumunu katalize eden alfa-ketoglutarat dehidrogenaz ve nükleik asit sentezinde görev yapan glisin dekarboksilaz gibi enzimlerde açıl gruplarını bağlar ve onları enzim kompleksinin bir yerinden diğer bir yerine transfer etmektedir (99).

Klinikte lipoik asit, diyabetik nöropati için endikasyon almış olmakla birlikte Lipoik asit takviyesi insanlarda çeşitli hastalıklarda denenmektedir (100,16). Bunlar arasında diyabette kan şekerinin düşürülmesi, damar hastalıkları, metabolik sendrom, multipl skleroz, Alzheimer, demans sayılabilir (101,102,96,103). Yapılan hayvan çalışmalarında ise iskemi-reperfüzyon hasarı, katarakt oluşumu, nörodejenerasyon, yaşlanma, kolit, radyasyon hasarı ve çeşitli ilaç (adriamisin, siklofosfamid, siklosporin A) toksisitelerine karşı yararlı olduğu gösterilmiştir (104,105,106,107,108,109,110).

Yukarıdaki bilgiler ışığında güçlü bir antioksidan ve diğer antioksidanların aktivasyonunu tetikleyici bir molekül olan ALA'nın, alkilleyici bir ajan olan Busulfan'ın oluşturduğu toksisiteye karşı etkili olabileceği düşüncesiyle çalışmamızı planladık.

2.4 APOPTOZ

Bütün hücreler doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur. Nekroz, genellikle dokunun bütününde bir arada görülür. En sık sebebi iskemidir. İskemi dışında toksik maddeler, ağır metaller, fiziksel ve kimyasal hasarlayıcılar da nekroza sebep olabilir. İskemide hücrenin ATP'siz kalması ve buna bağlı olarak Na/K/ATPaz pompasının devre dışı kalması, hücre içindeki iyonik denge sürdürülemediği için hücrenin şişmesi ve parçalanmasıyla hücre içeriğinin dokuya saçılması izlenir. Hücre içeriğinin dokuya saçılması diğer hücrelerde hasara ve enflamasyon cevabına sebep olur. Enflamasyon sürecinde dokuya lökositler infiltre olur, parçalanmış hücreler temizlenirken serbest radikal hasarı nedeniyle dokudaki hasar daha da artar ve süreç fibrozisle sonuçlanır (111,112) (Tablo 3) .

Tablo 3: Apoptoz ve nekrozda görülen temel farklılıklar (126).

	APOPTOZ	NEKROZ
Yol açan nedenler	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması, HIV Kanser ilaçları, radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNRF-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Viral enfeksiyon, Toksik maddelerin yüksek Konsantrasyonları, Şiddetli oksidatif stress
Morfolojik özellikler	İntakt hücre membranı fakat membrandan “bleb”lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması, hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin “flocculation”u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun Dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi
Biyokimyasal özellikler	Kontrollü, bazı aktivasyonların ve Enzimatik basamakların olması ATP gereklidir +4°C’ de gerçekleşmez DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır Prelitik DNA fragmentasyonu	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez. +4°C’de gerçekleşebilir. DNA rastgele parçalanır (agaroz jel Elektroforezinde “smear” görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)
Diğer özellikler	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İnflamasyon görülmez.	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. İnflamasyona neden olur.

Apoptoz tek hücreli organizmalarda hücrenin yaşamının sonlanmasının alternatifsiz tek yoludur. Gelişmiş organizmalarda ise hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden ölümüdür. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen “apoptozis” adı verilmiştir. Yunancada apoptozis, apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuştur (113,114,115,116).

Hormonal olarak aktif hale gelen çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar aracılığıyla gerçekleşen hücresel hasarlar ya da genetik faktörlerle başlatılan hücresel süreç apoptoza sebep olur. Vücutta fizyolojik bir durum olan apoptoz, anormal olmayan hücrelerin yok edilmesinden de sorumludur. Çok hücreli organizmalarda genetik oluşumlu hücre hasarının durdurulması ya da hücrenin tamamen ortamdaki kaldırılması apoptoz aracılığıyla olur. Bu şekilde hasarlı hücrenin yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıkların önüne geçilmiş olur (117).

Apoptoz fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda gerçekleşir.

Fizyolojik olaylar

- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı içi boşluklu organların lümenlerinin oluşması)
- Barsak kriptada epitel gibi sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde)
- Menstruel siklusa endometriyum hücrelerinde (menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda)

- T lenfositlerinin kontrolünde (matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde, immatür B lenfositlerinin gelişi gibi immun sistemin düzenlenmesinde)
- Epiderminin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür.

Patolojik olaylar

- Her türlü neoplastik oluşumda (hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gibi hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda)
- Hormonlara bağılı olarak dokularda patolojik atrofide, otoimmun hastalıklarda sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde
- Pankreasta ve böbrek gibi parankimden zengin dokularda duktus tıkanması sonrası patolojik atrofide apoptoz görülür (118).

2.4.1 APOPTOTİK HÜCREDE GERÇEKLEŞEN DEĞİŞİKLİKLER

Apoptotik hücrede gerçekleşen değişiklikler morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler olarak ikiye ayrılır.

Morfolojik Değişiklikler

Yüzey Organellerinin Kaybı; apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (119,120).

Hücre Büzülmesi; apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (121). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (113,119,120).

Kromatin Yoğunlaşması; çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzüşür (121). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (113,120).

Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması; hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (113,119).

Apoptozis için morfolojik değişimler olan hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması gelişirken fosfatidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfatidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (122).

Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmantasyonu; hedef proteinlerden biri olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirir. Çekirdek içine giren Ca^{+2} Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur ve merdiven basamağı adıyla karakterizedir (123).

Hücre İskeletinin Yıkılması; kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (124).

Hücre Membranı Değişiklikleri; Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adheziv bir glikoprotein ve bazı hücrelerin adhezyon moleküllerini (ICAM 3) içerirler.

Bu membran değişiklikleri apopitotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanmasını ve apopitotik cisimlerin oluşmasını sağlarlar. Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçölüp büzölürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir (125).

Fagositoz: apopitotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagositte edilerek dokulardan temizlenir (125).

2.4.2 APOPİTOZ MEKANİZMASI

Apoptoz süreci; hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla (ekstresek), DNA hasarına genlerin yanıtıyla (intresek) veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişıyle (Perforin–Granzim) 3 farklı şekilde gelişebilir (126).

Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol

Hücre dışından kaynaklanan ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin tutulması ile düzenlenen apoptozdur. Apoptozun dış yolu Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır. Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların belki de en iyi anlaşılmış örneği sitokine bağlı dış apoptozis yoludur. TNF-alfa, TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar (126). Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında 3 Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) denen adaptör proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar (123).

İntrensek (mitokondrial) Yol

Apoptozun yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. İç sinyaller ile oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Dış zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzim, sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar (127). Apoptozom, kaspaz 9 u aktiveştirmek üzere keser, kaspaz 9, diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktiveştirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (Tablo 4).

Tablo 4: Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler.

Apoptozu baskılayan genler	Apoptozu indükleyen genler
Bcl-2 ailesi grubundan; • BHRL-1, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, • mcl-1, A1 • C-ab1 geni • A20 • Çözünebilir fas • P35 • Ras onkogeni	Bcl-2 ailesi grubundan; • Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bik, Hrk1 • C-myc • p53, p21 • Fas (CD95/APO1) FADD/MORT, • RIP, FAST • İnterlökin dönüştürücü enzim • benzeri proteinler (İCE) • LOH (MTS1/CDK41)

4.2.3 APOPTOZ VE SPERMATOGENEZ

Apoptoz testislerde spermatogonia, spermatositler ve spermatidlerde yaygın olarak araştırılmış ve birçok apoptotik faktör tanımlanmıştır. Normal spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu spermatozoon oluşumunda kritik rol oynar. Sonuçta spermatozoon potansiyel sayısı tahminen %75'i kadar azalır. Testiküler germ hücre apoptozisi fizyolojik ve devamlı olarak hayat boyu meydana gelir. Apoptozisin normal spermatogenez

sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktır. Sperm matürasyonu ve fonksiyonu fertilitéyle korelasyon gösterir ayrıca anormal spermatogenezde bir genin disfonksiyonel ekspresyonu sonucu olur (128).

Sperm apoptozu ve sperm DNA'sında hasar; erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptoz ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur ve p53, p21, Kaspaz, Bcl-2 ve Fas düzeyleriyle değişik yollarla saptanabilir (129).

Bazı çalışmalarda germ hücrelerinin apoptozunda testosteronun da etkili olduğu bildirilirken, spermatogenez sırasında apoptozun başlatılmasında etken bir başka faktör de germ hücreleri ve lökositlerden kaynaklanan ROS yapımı ve miktarıdır. İnsan spermi ile yapılan çok sayıdaki çalışmada, hücre ölümü ile ROS üretimi arasında sıkı ilişki bulunduğu vurgulanmıştır (130).

Hipofizektomize immatür ratlarda, hem germinal hem de somatik hücrelerde apoptozun ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da insan karyonik gonadotropin hormonu (Human Chorionic Gonadotropine Hormone, hCG) tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (131).

Seminifer tübül epitelinin ısı, kemoterapötik ajan, toksik madde, radyasyon veya soğuk gibi faktörlere olan duyarlılığı da germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür. Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşma ihtimali yüksektir (132).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ:

Prospektif deneysel bir araştırma.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI:

Araştırma Şubat 2016'da literatür taraması ile başlamıştır. Mart 2016'da etik kurul onayı alındıktan sonra deneysel aşama DEU Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Emriyoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal değerlendirmeler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda deney yoluyla veri toplanmış Mart 2017'de tez savunmasıyla sonlanmıştır.

3.3.ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI

Araştırmada 4 deney grubu olmak üzere toplamda 28 deney hayvanı (sıçan) kullanılmıştır ve deney grupları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

GRUP I; KONTROL GRUBU (n=7)

Bu gruptaki deneklere yalnızca oral gavaj ile serum fizyolojik (SF) uygulanıp 5 hafta sonunda sakrifiye edilmiştir.

GRUP II; BUSULFAN GRUBU (n=7)

Bu gruptaki deneklere 21 gün ara ile iki doz 10 mg/kg Busulfan (Busilvex) uygulanıp 5 hafta sonunda sakrifiye edilmiştir.

GRUP III; ALA GRUBU (n=7)

35mg/kg ALA (Sigma-Aldrich) 5 hafta boyunca oral gavaj yöntemiyle uygulanıp 5 hafta sonunda sakrifiye edilmiştir.

ALA'nın Hazırlanışı; 35 mg/kg ALA önce SF ile karıştırılıp sonrasında 1M NaOH eklenip ardından pH'sı 1 M HCl ile 7.4'e ayarlanmıştır.

GRUP IV; BUS+ALA GRUBU (n=7)

21 gün ara ile iki doz 10 mg/kg Busulfan (Busilvex) uygulamasından 1 gün sonra 35 mg/kg ALA (Sigma-Aldrich) aynı şekilde hazırlanıp 5 hafta boyunca oral gavaj yöntemi ile verilmiştir.

Busulfan'ın Hazırlanışı; Busilvex prospektüsünde yer alan tekniğe göre hazırlanmıştır. Busulfan ve Busulfan+ALA gruplarındaki her bir denek ayrı ayrı tartılıp ağırlıklarına göre 10 mg/kg Busulfan miktarı hesaplanmıştır. Her deneğe toplamda 1ml intraperitoneal enjeksiyon yapılacak şekilde hesaplanan Busulfan miktarı enjeksiyon iğnesine çekilip SF ile 1 ml'ye tamamlanarak deneklere i.p. olarak verilmiştir. 21 gün sonra Busulfan ve Busulfan+ALA gruplarındaki denekler tekrar tartılarak gerekli busulfan miktarı hesaplanıp ikinci doz busulfan aynı şekilde uygulanmıştır. Örneğin 10mg/kg Busulfan, 100 gr ağırlığındaki denek için 1mg'dır. Busilvex 60mg/10ml olduğundan 1,66 ml Busulfan flakondan çekilmelidir. Ancak yoğun formundan dolayı önce 8,34 ml SF enjeksiyon iğnesine çekilip üzerine 1,66 ml Busulfan çekilmelidir.

5 hafta sonunda her bir deneğin ağırlıkları alınarak ketamin ksilazin anestezisi (80-100 mg/kg ketamin – 5-10 mg/kg ksilazin) uygulandı. Anestezinin derinleşmesini takiben ratlar operasyon masasına sabitlendi. Skrotal bölge traş edilip temizlendikten sonra povidon-iyot solüsyonu ile dezenfekte edilerek skrotal orta hat insizyon uygulandı. İnsizyon sonrası tunika vajinalise ulaşıldı. Tunika vajinalis iki pens yardımıyla tutup kaldırılarak bir makas yardımıyla keskin diseksiyonla geçilerek testise ulaşıldı. Testis skrotumdan doğurtularak parmakla künt diseksiyonla kord ve gubernakulum serbestleştirildi ve spermatik kord kesilerek sol testislere orşiektomi uygulandı. Sol testis dokusu histolojik analizler için %10'luk formaldehit solüsyonu içeren doku kaplarına alındı. Sağ testis ise biyokimyasal analizler için ependorf tüplere alındı ve dokular, derin dondurucuda (–80 °C) muhafaza edildi.

3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ

Araştırmada DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen 5 haftalık, 28 adet Wistar-Albino suşu erkek sıçan kullanılmıştır. Rastgele olarak seçilen sıçanlar, her kafeste 7 adet olacak şekilde ayrılmış ve kafesler etiketlenmiştir. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar sıcaklığı $21^{\circ}\text{C}\pm 1$, %50-60 nisbi nem ve 12 saat gündüz/ 12 saat gece aydınlatma periyotlarında bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırılmıştır. Denekler ad libitum olarak dinlendirilmiş su ve pellet yem ile beslenmiştir. Hayvanlara uygulanan deneysel uygulamalar ve sakrifikasyon, DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Bağımsız değişken: Madde uygulamaları (SF, ALA, Busulfan)

Bağımlı değişken: Ölçülen ürünler (MDA, GPx, GSH, doku histolojisi)

3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.6.1 Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada hayvan ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi; deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör, eliza cihazı ve buzluk kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Busulfan ve Alfa Lipoik Asit'in Hazırlanması

3.6.2.1. Busulfan'ın Hazırlanması

Busulfan (Busilvex 6mg/ml) BRK Kimya'dan temin edilmiştir. Busulfan 21 gün ara ile 10 mg/kg iki doz olacak şekilde intra peritonel yolla deneklere uygulanmıştır. Busulfan ve Busulfan+ALA gruplarındaki her bir denek ayrı ayrı tartılıp ağırlıklarına göre 10 mg/kg Busulfan miktarı hesaplanmıştır. Her deneğe toplamda 1ml intraperitonel enjeksiyon yapılacak şekilde Busulfan miktarı, çözücüsü olan SF ile 1 ml'ye tamamlanarak deneklere verilmiştir. 21 gün sonra Busulfan ve Busulfan+ALA

gruplarındaki denekler tekrar tartılarak gerekli busulfan miktarı hesaplanıp ikinci doz busulfan uygulanmıştır.

3.6.2.2. Alfa Lipoik Asit'in Hazırlanması

Alfa Lipoik Asit (($\pm$)- α -Lipoic acid BioReagent, cell culture tested, $\geq 99\%$ Sigma Aldrich) kullanılmıştır. ALA ve Busulfan+ALA grupları için belirlenen 35 mg/kg ALA dozu her gün tartılan deneklerin ortalama ağırlıklarına göre hesaplanarak oral gavaj yöntemiyle verilmiştir. Ortalama 100 gr gelen denek için, ALA miktarı 3.5 mg olacak şekilde tartılıp SF içerisinde 1M NaOH ile çözülerek 1M HCl ile Ph'sı 7.4'e ayarlanmıştır. Çözelti tazeliğini koruması amacıyla günlük olarak hazırlanıp oral gavaj yöntemiyle verilmiştir.

3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takibi prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS), immünohistokimyasal olarak apoptozun belirlenebilmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 boyamaları yapılmıştır. Biyokimyasal olarak MDA, GPx VE SOD düzeyleri ölçülmüştür.

3.6.3.1. Denek Ağırlıkları Ve Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcından itibaren 5 hafta boyunca denek ağırlıkları düzenli olarak takip edilmiştir. Veriler SPSS 22,0 programında değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırılmasında $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Deney sonunda kurban edilen deneklerin testis ağırlıkları alınmış. Sonuçlar SPSS 22,0 programında değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırılmasında $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6.3.2. Histolojik Boyama

Sakrifikasyon sonunda alınan sol testis histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Sağ testis ise biyokimyasal incelemeler için ependorf tüplere alınarak örnekler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

3.6.3.2.1 Rutin Doku Takibi

Alınan testis dokusu %10'luk formaldehit solüsyonunda 3 gün fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80, %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflandırma amacıyla 30'şar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik iki kez parafin ile immersiyonu sağlandı. Tüm bu işlemler 60°C'lik etüv içerisinde gerçekleştirildi. Daha sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 3). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığıyla bloklardan 5µ'luk parafin kesitler poly-L lysine kaplı lamlara alındı.

Tablo 5:Doku Takip Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Ksilen 1-2	30'şer dakika
	Erimiş Parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.3.2.2 Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi de 20'şer dakika oda ısısında olan üç farklı ksilende bekletildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 kere absolü alkol, %96, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (Bio-Optica 05-06002/L) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 15 saniye Eozin-y (Bio-Optica 05-10003/L) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflandırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 6: Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	MADDE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70 'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eozin	15 Saniye
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.2.3 Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi de 20'şer dakika oda ısısında olan üç farklı ksilende bekletildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 kere absölü alkol, %96, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 2 dakika Periyodik asit (Merc) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için saf su ile iyice yıkandı. Ardından Schiff solüsyonu ile (Merc) 20 dakika karanlıkta bekletildi. Boyamadan sonra kesitler 10 dakika çeşme suyunda yıkandı ve nukleuslar 15 saniye Mayer's Hematoksilen ile boyandıktan sonra çeşme suyunda yıkanıp daha sonra da dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 7: Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	MADDE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Periyodik Asit	2 Dakika
Yıkama	Distile Su	1-2 Dakika
Boyama	Schiff Solüsyonu	20 Dakika
Yıkama	Çeşme suyu	10 Dakika
Nukleus Boyaması	Hematoksilen	15 Saniye
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3 Histolojik Skorlama

3.6.3.3.1 Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması

Kesitler PAS ile boyandıktan sonra her bir denek için ayrı ayrı 100 adet tübül değerlendirilerek her bir tübüle Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı. Skor tablosu Tablo 7'de gösterilmiştir. Değerlendirilen tübül skorlamalarının ortalaması alınıp gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi Testi, grupların ikili karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 8: Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması

SKOR	HİSTOLOJİK BULGULAR
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenesiz
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitelyum bozuk ve lümen oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birkaç spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10)
5	Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatid var
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid, spermatozoa yok
3	Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, Sertoli hücreleri mevcut
1	Tübüller içerisinde hücre yok

3.6.3.3.2 Seminifer Tübül Çap Ölçümü

PAS ile boyanan kesitlerden her denek için rastgele seçilen 3 farklı alanda her alanda 10 tübül olacak şekilde toplamda 840 tübül de, 10x'lik büyütme kullanılarak Image J görüntü analiz programında çap ölçümleri yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi Testi, grupların ikili karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı. $P<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.3.3.3 Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

PAS ile boyanan kesitlerden her denek için rastgele seçilen 3 farklı alanda her alanda 10 tübül olacak şekilde toplamda 840 tübül de, 10x'lik büyütme kullanılarak Image J görüntü analiz programında bazal membran kalınlık ölçümü yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi Testi, grupların ikili karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı. $P<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.3.4 İmmunohistokimyasal İncelemeler

Apoptoz (fizyolojik hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal (DNA

parçalanması, fosfotidilserin moleküllerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkması) ve morfolojik değişim (hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler) gözlenir. Bu değişimleri saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. DNA fragmentasyonu ve apoptozun incelenmesi için immunohistokimyasal olarak TUNEL ve Caspase-3 antikoru kullanıldı.

3.6.3.4.1 Aktif Caspase-3 Protokolü

Doku kesitleri deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi de 20'şer dakika oda ısısında olan üç farklı ksilende bekletildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 kere absolü alkol, %96, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalandı. Daha sonra 1/9 oranında hazırlanan sitrat solüsyonu (Bio-Optica) içerisinde, 600 wattta 5 dakika kaynatılıp 20 dakika soğuması beklendi. Ardından dokular pap pen (Invitrogen) ile sınırlandırılıp 3 kez PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %10'luk H₂O₂ (Merck) ile 10 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda kesitler 3 kez PBS ile yıkanıp doku etrafındaki fazla su alındıktan sonra sekonder kit (Invitrogen) içerisindeki A (blocking Solution) ile 20 dakika bekletildi. Ardından yıkama işlemi yapmadan PBS ile 1/100 oranında hazırlanan Aktif Caspase-3 (Millipore) antikoru ile +4'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitler B (Broad Spectrum Second Antibody) ile 20 dakika bekledikten sonra PBS ile yıkanıp ardından C (HRP-Streptavidin) ile 20 dakika bekletilip PBS solüsyonu ile yıkandı. Reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla DAB (Roche) ile muamele edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra mayers Hematoksilen ile artalan boyaması yapıp akarsuda yıkandı. Ardından artan alkol serilerinden geçirilip şeffaflandırmak için de 3 seri ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.3.4.2 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase- Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling (TUNEL) Boya Protokolü

Doku kesitleri deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi de 20'şer dakika oda ısısında olan üç farklı ksilende bekletildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 kere absolü alkol, %96, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalanıp dokuların

etrafı pap pen ile sınırlandırıldı. Ardından distile su ile 1/20 oranında hazırlanan Proteinase-K (Millipore) ile 15 etüvde bekletilip süre sonunda PBS ile yıkandı. Ardından TUNEL kit (Roche) içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (%70 reaksiyon solüsyonu + %30 TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 1 saat 37°C'lik etüvde bekletildi. Reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla DAB ile muamele edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra mayers Hematoksilen ile artalan boyaması yapıp akarsuda yıkandı. Ardından artan alkol serilerinden geçirilip şeffaflandırmak için de 3 seri ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.3.5 Biyokimyasal Analizler

3.6.3.5.1 Homojenizasyon

Tüm deneklerden sakrifikasyon sonrası soğuk zemin üzerinde sağ testis disseke edildi, soğuk serum fizyolojik ile hemen yıkandı ve yarısı buz dolu kap ile lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), antioksidan Glutasyon (GSH) ve antioksidan enzim Glutasyon Peroksidaz (GPx) ölçümü için homojenize edildi. Doku örnekleri ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) 0.15 M KCl içinde homojenize edildi.

Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı.

Homojenatlar +4°C'de 600 g'de 10 dk santrifüj edilerek MDA ölçümü için ependorf tüpüne ayrıldı, geri kalan homojenat +4°C'de 10000 g'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant enzim ve protein ölçümleri için ayrılarak -80°C'de saklandı. 30 gün içinde ölçümler yapıldı.

3.6.3.5.2 Enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinin saptanması

MDA değerleri The Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar µM olarak ifade edildi. Kitin çalışma yöntemi kromojenik bir reaktif ile MDA'nın 45°C'de reaksiyona girmesi temeline dayanır. 586 nm'de absorbans ölçülerek standart eğrisinden MDA değerleri belirlendi.

GSH ve GPx enzim aktiviteleri Oxis Research kitleri kullanılarak spektrofotometre (T80, PG instruments, UK) ile ölçüldü. Enzim aktiviteleri hazırlanan süpernatantlardan ölçüldü, GSH sonuçları μM , GPx sonuçları $\text{ünite/mg protein (U/mg pr)} \pm \text{Standart Hata (SH)}$ olarak gösterildi. GSH seviyeleri Bioxytech GSH-420 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. Kitin çalışma yöntemi chromophoric thione oluşumu temeline dayanır. Tamponla karıştırılan süpernatana indirgeyici ajan eklenerek oksidize glutatyon indirgenmiş forma dönüştürülür. Daha sonra kromojen eklenip pH arttırılarak chromophoric thione oluşturulur. 420 nm'de absorbans ölçülerek GSH konsantrasyonu belirlendi.

GPx aktivitesi Bioxytech GPx-340 (Oxis International, USA) kiti ile saptanmıştır. Bu kit Paglia ve Valentine'ın tanımladığı yöntemle göre hazırlanmıştır. GPx, kümen hidroperoksit ile glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH okside olarak NADP'ye dönüşür. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbansdaki azalma ölçüldü.

Doku protein ölçümleri RANDOX'un U/CSF protein kitiyle yapıldı. Kitin çalışma prensibinde önce örnek magnezyum iyonlarını uzaklaştırmak ve proteini çöktürmek amacıyla EDTA içeren alkalın solüsyonla karıştırılır, sonra benzethonyum klorid eklenir, turbidite oluşturarak spektrofotometrede 600 nm'de absorbans okundu.

3.7 ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ

- Tez Konusunun Belirlenmesi ve Literatür Taraması
- Etik Kurul, Yönetim Kurulu Onayı ve Tez Öneri Formunun Hazırlanması
- Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP) Başvuru Yapılması (Ağustos 2016)
- Deneysel Verilerin Toplanması ve Deneyin Yapılması (Haziran 2016-Kasım 2016)
- Verilerin Analizi ve Tez Yazımı (Kasım 2016–Şubat 2017)

3.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 22.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapma ya da standart hata, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde medyan (ortanca) ve minimum-maksimum kullanılarak verildi. Bağımsız gruplarda (ikili gruplar arası karşılaştırma) normal dağılmayan değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, normal dağılan değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda t testi kullanıldı. Bağımlı grupların (grup içi önce-sonra karşılaştırmalarda vb.) karşılaştırmalarında normal dağılım göstermeyen durumda Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanıldı. Tanıdaki (Kontrol, Busulfan, Alfa Lipoik Asit, ALA+BUS) grupların birbiriyle değişkenler (*denek ağırlığı, testis ağırlığı, bazal membran kalınlığı, tübül çapı ölçümü, Johsen Skoru, TUNEL pozitif ve Kaspaz pozitif hücre sayımı*) arasında karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc karşılaştırmalar Tukey testi kullanılarak yapıldı. p-değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlıdır.

3.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Çalışmada hasar oluşturmak için kullanılan Busulfan'ın literatürde çok farklı dozlarda uygulanmış olmasından dolayı doz optimizasyonunu sağlamak ve DMSO içerisinde çözmeyp klinikte kullanılan hazır Busilvex flakon kullanılarak doz belirlemek amacıyla ön çalışma yapılmıştır.

3.10 ETİK KURUL ONAYI

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 01/06/2016 Gündem No/Toplantı No/Yıl ve 15 Mart 2016 toplantı tarihinde 44/2015 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

Busulfan kullanımı sonrasında alfa lipoik asit uygulamasının testis üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmanın sonuçları; Kontrol, Bulsulfan, Alfa Lipoik Asit ve Busulfan+Alfa Lipoik Asit olmak üzere dört grup şeklinde değerlendirildi.

Tablo 9: Gruplar arasındaki tanımlayıcı istatistik

Değişkenler	Gruplar	N	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (Medyan)	Min	Max
Bazal Membran	Kontrol	7	2,87±0,44	2,809	2,3	3,6
	ALA	7	1,98±0,26	1,908	1,7	2,4
	Busulfan	7	1,32±0,13	1,358	1,1	1,5
	ALA+BUS	7	1,62±0,18	1,551	1,4	2,0
Çap	Kontrol	7	315,13±44,31	303,243	283,3	412,4
	ALA	7	308,33±22,55	319,556	266,0	327,9
	Busulfan	7	242,56±27,91	240,650	202,5	281,0
	ALA+BUS	7	233,80±15,26	233,445	216,8	259,8
Testis Ağırlık	Kontrol	7	1,24±0,14	1,190	1,1	1,5
	ALA	7	1,58±0,06	1,590	1,5	1,7
	Busulfan	7	0,88±0,12	,880	,7	1,1
	ALA+BUS	7	0,89±0,06	,900	,8	1,0
İlk Ağırlık	Kontrol	7	83,85±9,67	84,000	73,0	98,2
	ALA	7	113,07±14,96	108,800	100,1	145,0
	Busulfan	7	137,85±25,10	135,000	105,5	174,0
	ALA+BUS	7	135,85±16,92	127,500	121,0	165,5
Son Ağırlık	Kontrol	7	221,77±18,09	219,000	197,0	247,0
	ALA	7	250,60±18,88	258,000	215,0	267,4
	Busulfan	7	260,92±31,25	270,500	200,0	297,5
	ALA+BUS	7	259,35±29,73	246,000	233,0	316,0
Delta Ağırlık	Kontrol	7	137,91±12,55	142,200	113,0	148,8
	ALA	7	137,52±19,60	142,400	102,4	159,4
	Busulfan	7	123,07±24,04	120,500	94,5	160,5
	ALA+BUS	7	123,50±13,35	120,500	110,5	150,5

4.1 DENEK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Deney başlangıç ve bitişinde tartılan deneklerin ağırlıkları SPSS 22,0 paket programında Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi kullanılarak değerlendirildi ve $p<0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları;

Kontrol grubunda $83,9\pm9,67$ gr

Busulfan grubunda $137,9\pm25,10$ gr

Alfa Lipoik Asit grubunda $113,1\pm14,96$ gr

ALA+BUS grubunda $135,9\pm16,92$ gr olarak bulundu.

Deney bitiş ağırlık ortalamaları ise

Kontrol grubunda $221,8\pm18,09$ gr

Busulfan grubunda $261\pm31,25$ gr

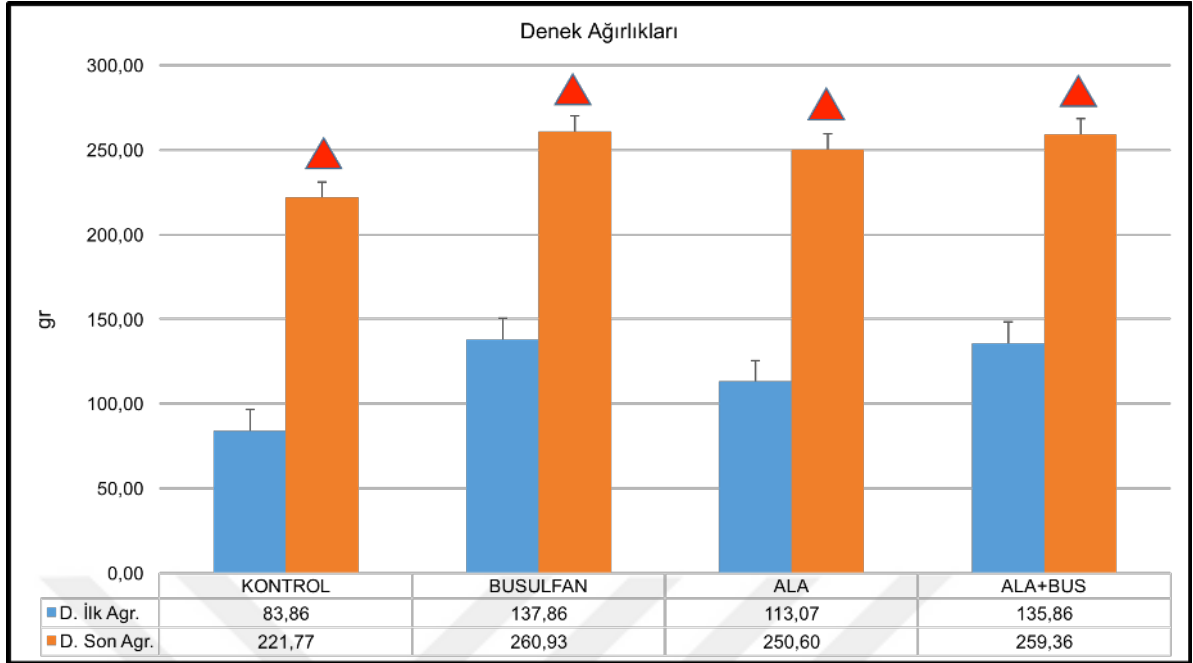
Alfa Lipoik Asit grubunda $250,6\pm18,88$ gr

ALA+BUS grubunda $259,4\pm29,73$ gr olarak bulundu.

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda;

- Kontrol grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış görüldü. ($p=0,018$)
- Busulfan grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış görüldü. ($p=0,018$)
- Alfa Lipoik Asit grubu başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış görüldü. ($p=0,018$)
- ALA+BUS grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış görüldü. ($p=0,018$) (Şekil 6).

Grup içinde deneklerin kilo artışını değerlendirmek için (son ağırlık ve ilk ağırlık arasındaki farkı) 'Δ' delta ağırlık değerleri hesaplandı. Her grubun delta değerleri incelendiğinde anlamlı bir fark yoktur (Tablo 7).



Şekil 6: Deneklerin deney başlangıç ve sonundaki ortalama ağırlıkları.

(▲) Anlamlı artış.

4.2 TESTİS AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Deney sonunda deneklerin testis ağırlıkları arasındaki farklar SPSS 22,0 paket programında Mann Whitney U Testi kullanılarak değerlendirildi ve $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grupların testis ağırlık ortalamaları;

Kontrol grubunda $1,35 \pm 0,16$ gr

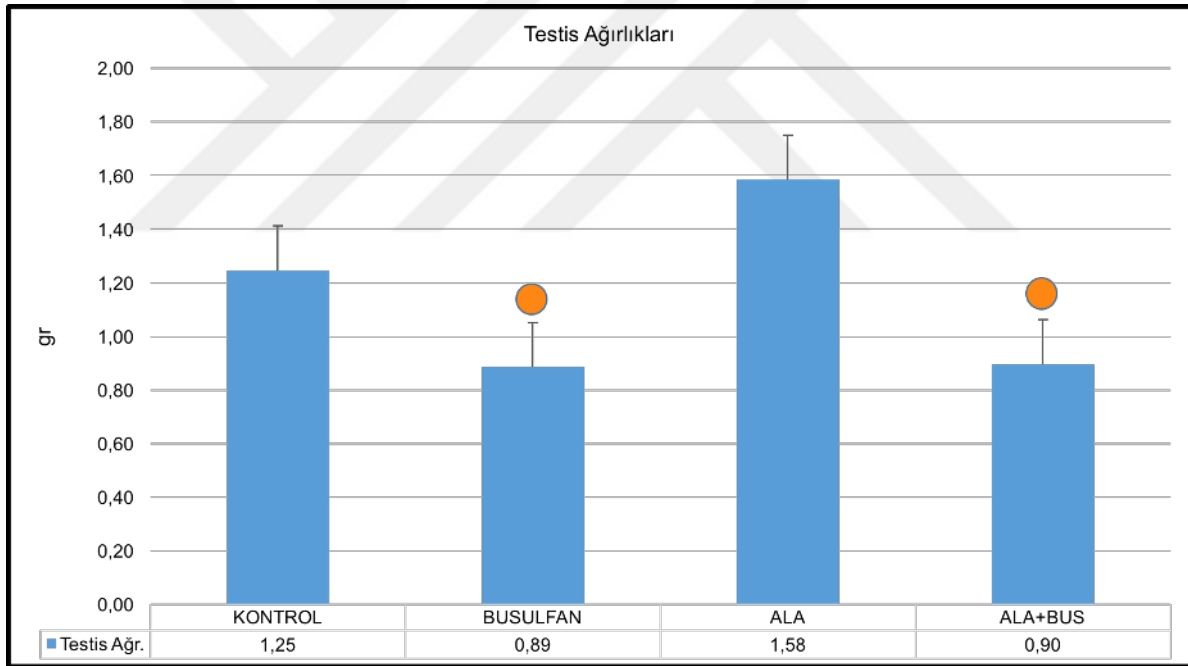
Busulfan grubunda $0,88 \pm 0,12$ gr

Alfa Lipoik Asit grubunda $1,58 \pm 0,14$ gr

ALA+BUS grubunda $0,89 \pm 0,08$ gr olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında 4 grup arasında Kruskal Wallis Varyans Analizi ile anlamlı fark bulundu ($p = 0,00$). Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann Whitney U testi ile incelendi.

- Kontrol grubu ve Busulfan grubunu karşılaştırdığımızda testis ağırlığı Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Kontrol grubu ve ALA grubunu karşılaştırdığımızda testis ağırlığında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,094$).
- Kontrol grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda testis ağırlığı ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Busulfan grubu ve Alfa Lipoik Asit grubunu karşılaştırdığımızda testis ağırlığı Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Busulfan grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda testis ağırlığında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,94$).
- Alfa Lipoik Asit grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda testis ağırlığında ALA+BUS grubu anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$) (Şekil 7).



Şekil 7: Deneklerin deney soundaki ortalama testis ağırlıkları.

(●) Kontrol grubuna göre anlamlı azalış.

4.3 IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

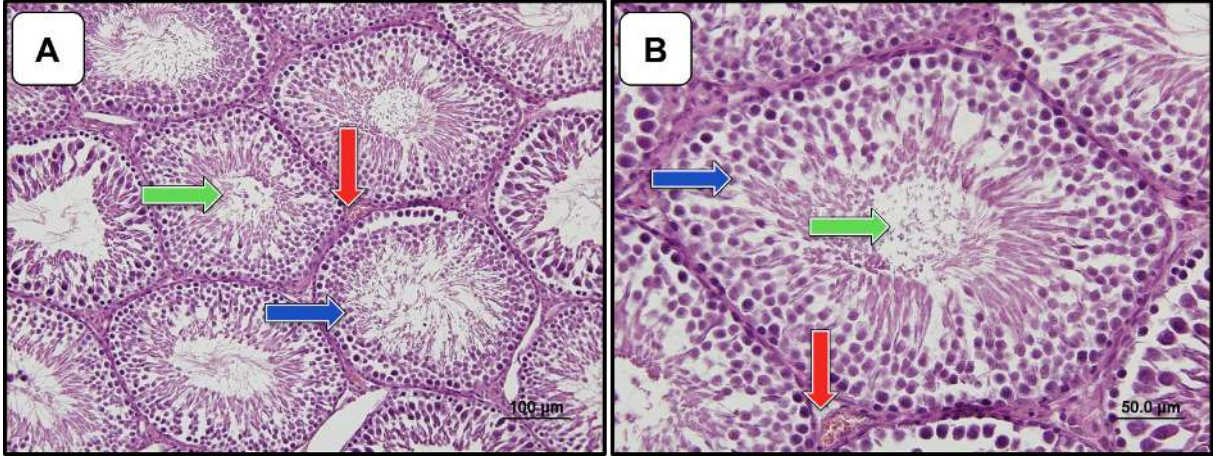
Işık mikroskopik inceleme için kesitler Hematoksilen&Eozin boyaması ile boyandı, görüntüler Olympus Bx51 mikroskobu ve Olympus DP71 kamerası kullanılarak elde edildi.

Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde seminifer tübül çaplarının birbirine yakın olduğu görüldü. Tübül içerisinde koyu nukleuslu spermatogonyumların bazal membranın hemen üzerinde yer aldığı, tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serilerinin düzgün olarak sıralandığı ve tübül lümeninde de gelişmekte olan spermiumlar görüldü. İntertisyel alanda ise leydig hücreleri, bağ doku hücreleri ile kan ve lenf damarları görüldü (Şekil 8).

Busulfan grubuna ait kesitler incelendiğinde tübül çaplarında azalma ve bazal membran ondülasyonu gözlemlendi. Tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre diziliminde düzensizlik, kayıp ve bazal membrandan ayrılma görüldü (Şekil 9).

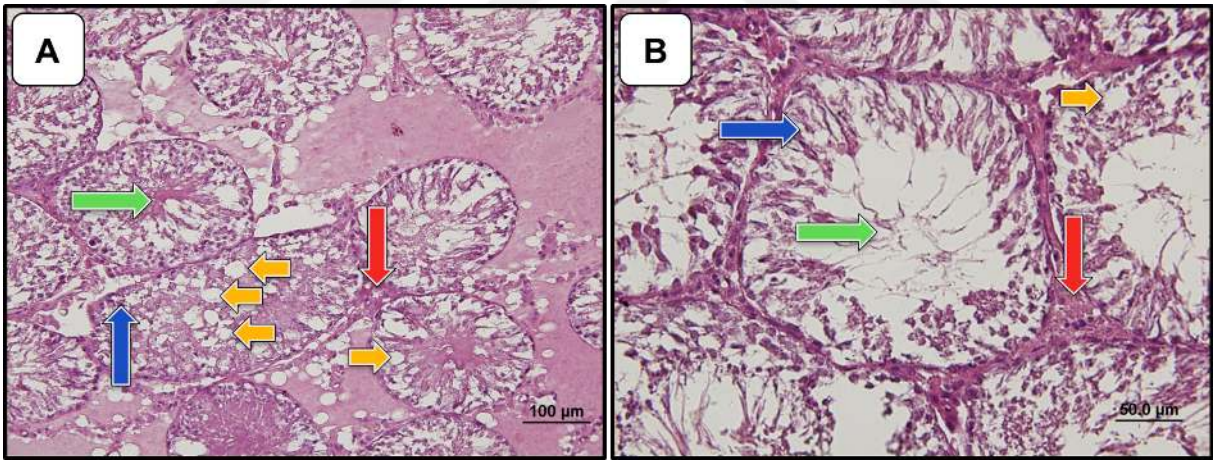
Alfa Lipoik Asit grubuna ait kesitler incelendiğinde seminifer tübül çaplarının birbirine yakın olduğu görüldü. Tübül içerisinde koyu nukleuslu spermatogonyumların bazal membranın hemen üzerinde yer aldığı, tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serilerinin düzgün olarak sıralandığı ve tübül lümeninde de gelişmekte olan spermiumlar görüldü. İntertisyel alanda ise leydig hücreleri, bağ doku hücreleri ile kan ve lenf damarları görüldü (Şekil 10).

ALA+BUS grubuna ait kesitler incelendiğinde tübül çaplarında ve bazal membran kalınlığında azalma görüldü. Tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre diziliminde düzensizlik, kayıp ve bazal membrandan ayrılma görüldü (Şekil 11).



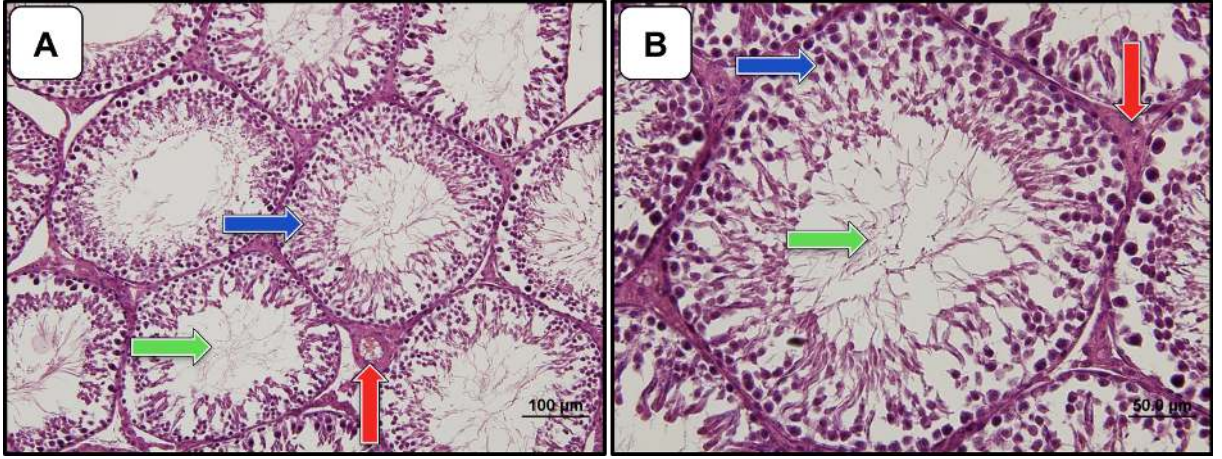
Şekil 8: Kontrol grubuna ait testis kesiti. **A;** H&E x20 **B;** H&E x40 büyütme.

(→)Seminifer Tübül Lümeni, (→)Spermatogenik Seri Hücreleri,
(→) İnterstisyel Alan



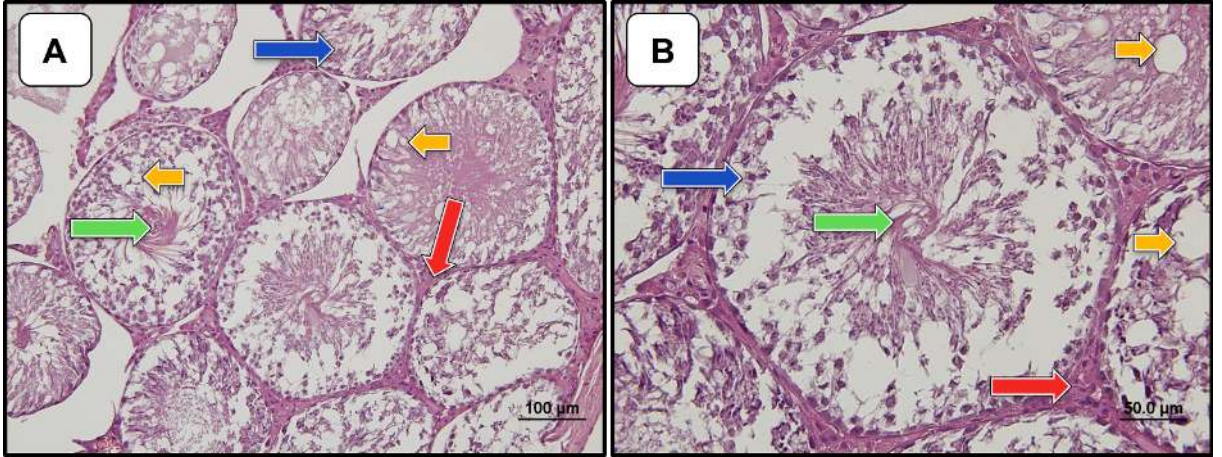
Şekil 9: Busulfan grubuna ait testis kesiti. **A;** H&E x20 **B;** H&E x40 büyütme.

(→) Seminifer Tübül Lümeni, (→) Spermatogenik Seri Hücreleri,
(→) İnterstisyel Alan, (→) Vakuolizasyon oluşumları



Şekil 10: Alfa Lipoik Asit grubuna ait testis kesiti. **A;** H&E x20 **B;** H&E x40 büyütme.

(→) Seminifer Tübül Lümeni, (→) Spermatogenik Seri Hücreleri
(→) İnterstisyel Alan



Şekil 11: ALA+BUS grubuna ait testis kesiti. **A;** H&E x20 **B;** H&E x40 büyütme.

(→) Seminifer Tübül Lümeni, (→) Spermatogenik Seri Hücreleri,
(→) İnterstisyel Alan. (→) Vakuolizasyon oluşumları

4.3.1 Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Çalışmamızda gruplar arası seminifer tübül çap ölçümü karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grupların ortalama seminifer tübül çap ölçüm ortalamaları;

Kontrol grubunda $300,84 \pm 12,26 \mu\text{m}$

Busulfan grubunda $233,00 \pm 23,71 \mu\text{m}$

Alfa Lipoik Asit grubunda $311,65 \pm 16,05 \mu\text{m}$

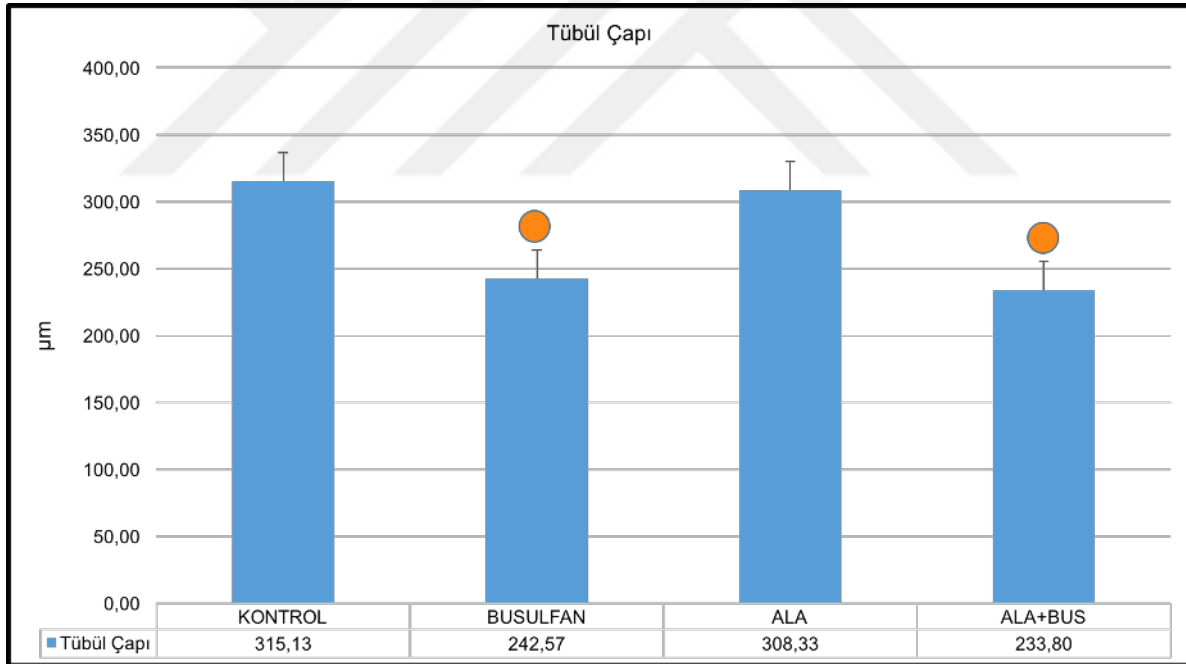
ALA+BUS grubunda $233,80 \pm 15,26 \mu\text{m}$ olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında 4 grup arasında Kruskal Wallis Varyans Analizi ile anlamlı fark bulundu ($p=0,00$). Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann Whitney U testi ile incelendi.



Şekil 12: Image J programında seminifer tübül çap ölçümü.

- Kontrol grubu ve Busulfan grubunu karşılaştırdığımızda seminifer tübül çap ölçümü Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Kontrol grubu ve ALA grubunu karşılaştırdığımızda seminifer tübül çap ölçümünde anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,110$).
- Kontrol grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda seminifer tübül çap ölçümü ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Busulfan grubu ve Alfa Lipoik Asit grubunu karşılaştırdığımızda seminifer tübül çap ölçümü Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Busulfan grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda seminifer tübül çap ölçümü anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,848$).
- Alfa Lipoik Asit grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda seminifer tübül çap ölçümü ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$) (Şekil 12).



Şekil 13: Grupların ortalama seminifer tübül çap ölçümleri.

(●) Kontrol grubuna göre anlamlı azalış.

4.3.2 Bazal Membran Ölçümü

Çalışmamızda gruplar arası bazal membran kalınlıklarının karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi uygulanmıştır. $P < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grupların bazal membran ölçüm ortalamaları;

Kontrol grubunda $2,73 \pm 0,30 \mu\text{m}$

Busulfan grubunda $1,32 \pm 0,13 \mu\text{m}$

Alfa Lipoik Asit grubunda $2,40 \pm 0,42 \mu\text{m}$

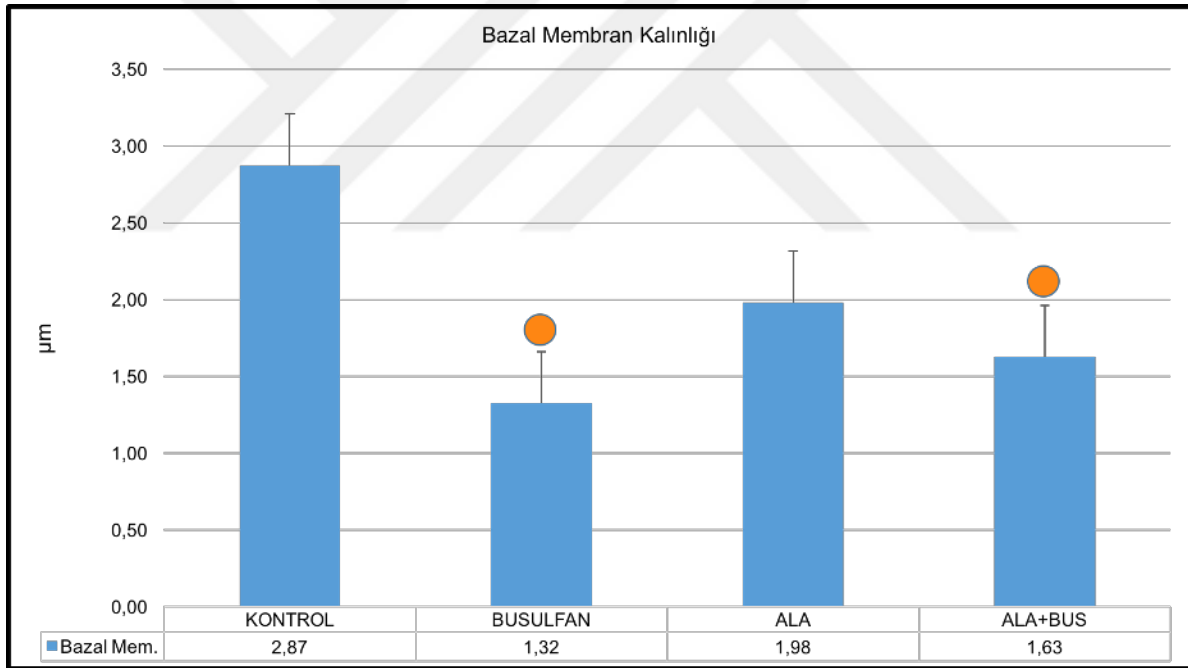
ALA+BUS grubunda $1,62 \pm 0,18 \mu\text{m}$ olarak bulundu.

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında 4 grup arasında Kruskal Wallis Varyans Analizi ile anlamlı fark bulundu ($p=0,00$). Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann Whitney U testi ile incelendi.



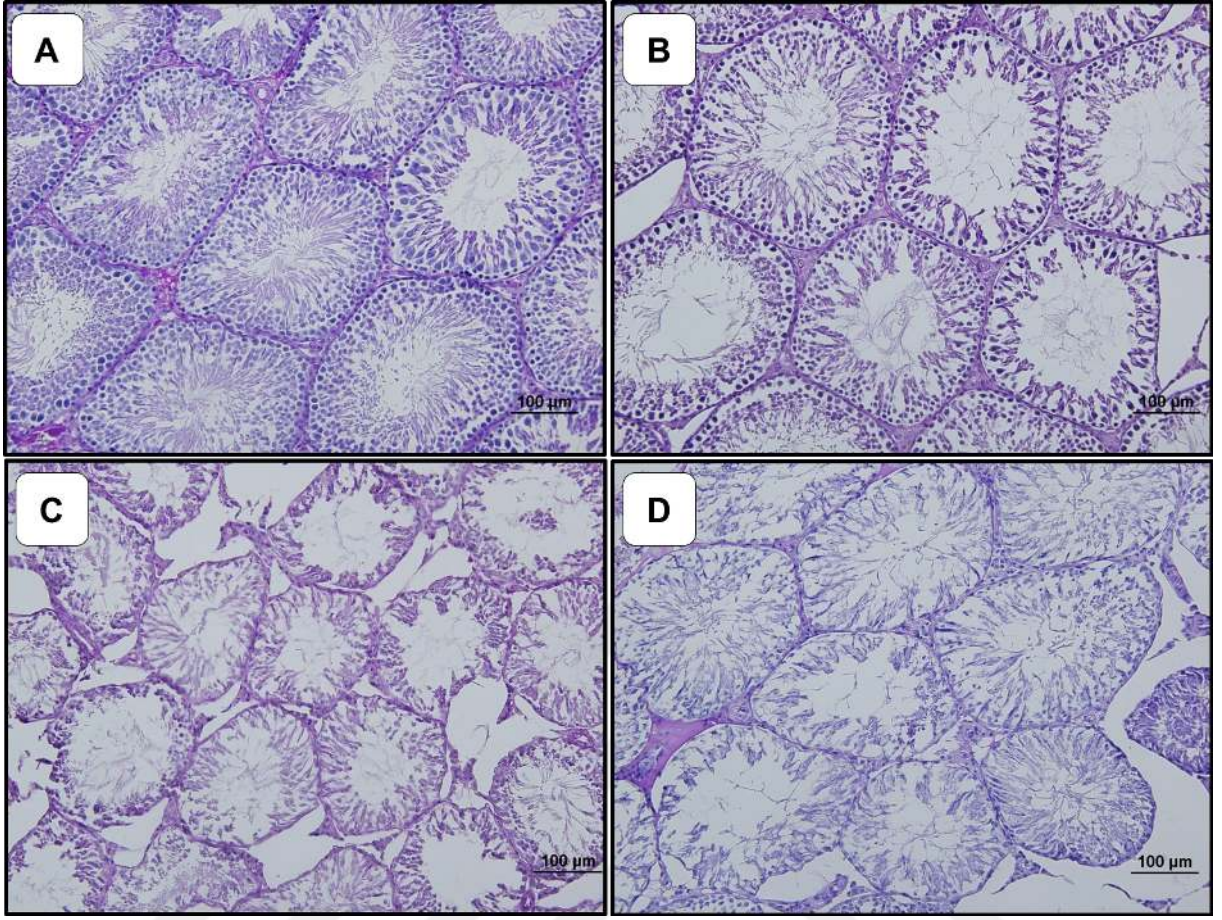
Şekil 14: Image J programında bazal membran ölçümü.

- Kontrol grubu ve Busulfan grubunu karşılaştırdığımızda bazal membran ölçümü Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Kontrol grubu ve ALA grubunu karşılaştırdığımızda bazal membran ölçümünde anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,180$).
- Kontrol grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda bazal membran ölçümü ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Busulfan grubu ve Alfa Lipoik Asit grubunu karşılaştırdığımızda bazal membran ölçümü Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).
- Busulfan grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda bazal membran ölçümü Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,04$).
- Alfa Lipoik Asit grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda bazal membran ölçümü ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,002$).



Şekil 15: Deneklerin seminifer tübül bazal membran ölçümleri.

(●) Kontrol grubuna göre anlamlı azalış.



Şekil 16: PAS boyaması görüntüleri (A) Kontrol Grubu, (B) Alfa Lipoik Asit Grubu, (C) Busulfan Grubu, (D) ALA+BUS Grubu

4.3.3 Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

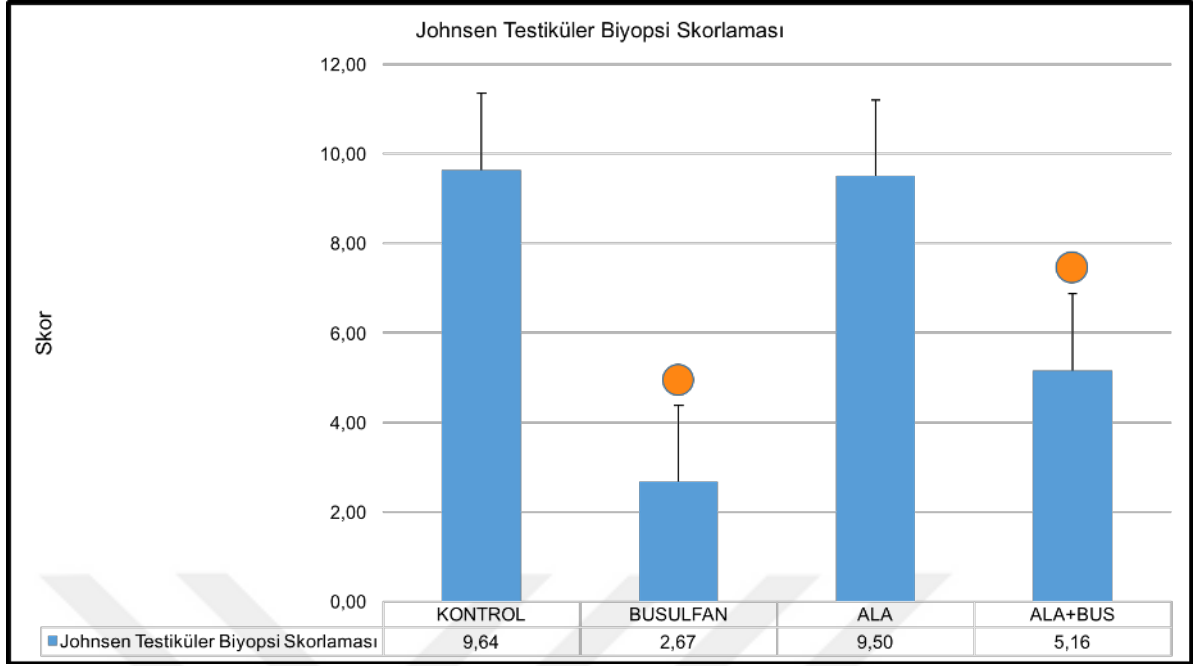
Deney gruplarındaki her bir denek için ayrı ayrı 20 adet tübül değerlendirilerek her bir tübüle Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden olan Tukey HSD testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubu skor ortalaması $9,64 \pm 0,07$

Busulfan grubu skor ortalaması $2,67 \pm 0,07$

Alfa Lipoik Asit grubu skor ortalaması $9,50 \pm 0,07$

ALA+BUS grubu skor ortalaması $5,17 \pm 0,07$ olarak bulundu.



Şekil 17: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

(●) Kontrol grubuna göre anlamlı azalış.

- Kontrol grubu ve Busulfan grubu karşılaştırıldığında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması Busulfan grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,001$).
- Kontrol grubu ve ALA grubu karşılaştırıldığında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. ($p=0,25$).
- Kontrol grubu ve ALA+BUS grubu karşılaştırıldığında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,001$).
- Busulfan grubu ve Alfa Lipoik Asit grubu karşılaştırıldığında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması Alfa Lipoik Asit grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$).
- Busulfan grubu ve ALA+BUS grubu karşılaştırıldığında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması ALA+BUS grubunda anlamlı olarak artmıştı. ($p=0,001$).
- Alfa Lipoik Asit grubu ve ALA+BUS grubu karşılaştırıldığında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması ALA+BUS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0,001$).

4.4 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik hücrelerin DNA fragmentasyonunun ve apoptozun değerlendirilmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 boyaması yapıldı. Deney gruplarındaki her bir denek için on ayrı tübüldeki TUNEL pozitif ve Kaspaz pozitif hücreler sayıldı. Sonuçların karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 10: Kaspaz ve TUNEL pozitif hücre sayımları için gruplarası istatistik verileri.

	<i>KONTROL</i>	<i>BUSULFAN</i>	<i>ALFA LİPOİK ASİT</i>	<i>ALA+BUS</i>
KASPAZ	5,63±0,10	30,01±0,28	6,13±0,15	29,57±0,17
TUNEL	9,97±0,21	34,36±0,43	10,13±0,19	33,60±0,16
	KASPAZ		TUNEL	
<i>Kontrol-Busulfan</i>	p= 0,001		p= 0,001	
<i>Kontrol-ALA</i>	p= 0,072		p= 0,21	
<i>Kontrol-ALA+BUS</i>	p= 0,001		p= 0,001	
<i>Busulfan-ALA</i>	p= 0,001		p= 0,001	
<i>Busulfan-ALA+BUS</i>	p= 0,064		p= 0,23	
<i>ALA - ALA+BUS</i>	p= 0,001		p=0,001	

4.4.1 Aktif Kaspaz-3 Boyaması

Seminifer tübüllerindeki Kaspaz pozitif hücre sayımı yapıldığında;

Kontrol grubu ortalama 5,63±0,10,

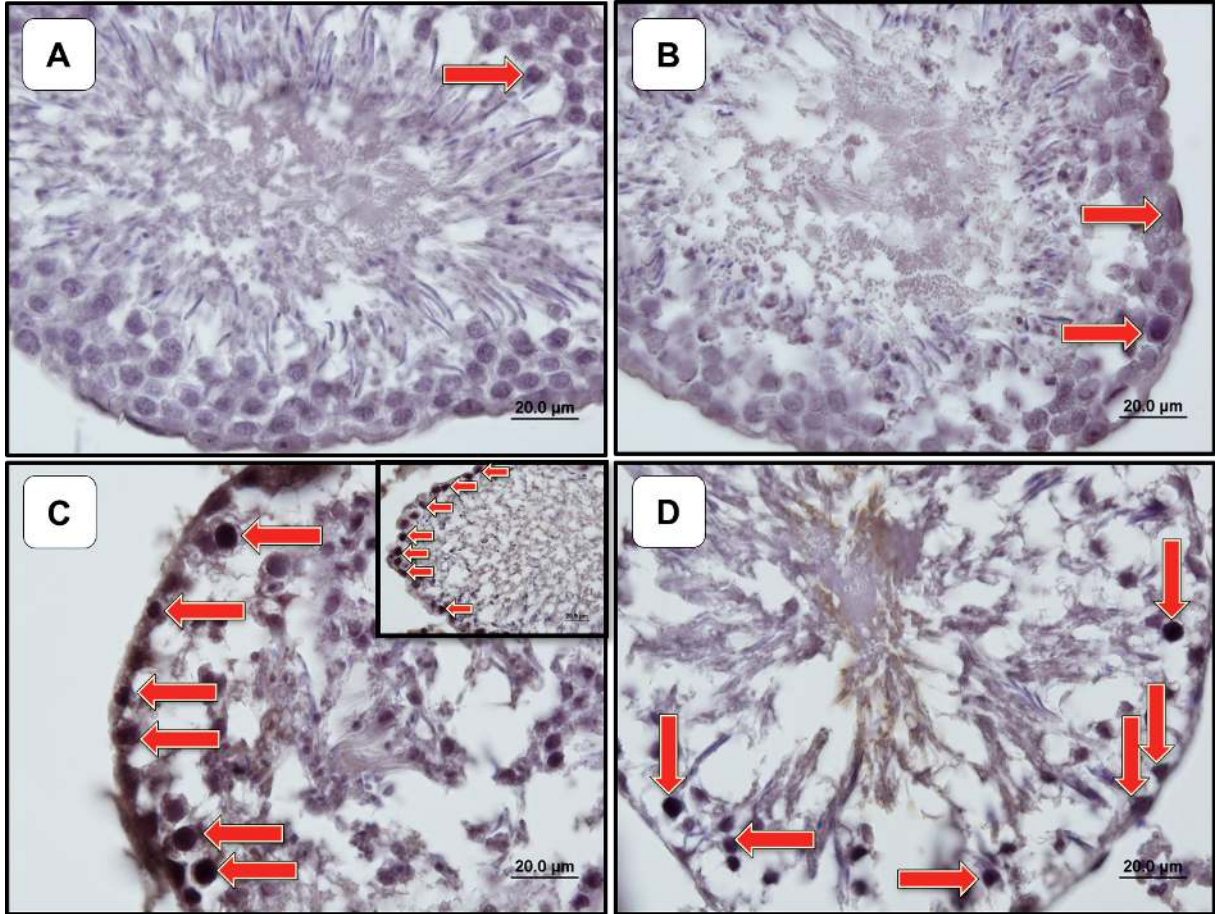
Busulfan grubu ortalama 30,01±0,28,

Alfa Lipoik Asit grubu ortalama 6,13±0,15,

ALA+BUS grubu ortalama 29,57±1,81 olarak bulundu.

- Kontrol grubu ve Busulfan grubu karşılaştırıldığında Kaspaz pozitif hücre sayısı Busulfan grubunda anlamlı olarak artmıştı. ($p=0,001$).

- Kontrol grubu ve ALA grubunu karşılaştırdığımızda Kaspaz pozitif hücre sayısında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,072$).
- Kontrol grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda Kaspaz pozitif hücre sayısı ALA+BUS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$).
- Busulfan grubu ve Alfa Lipoik Asit grubunu karşılaştırdığımızda Kaspaz pozitif hücre sayısı Busulfan grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$).
- Busulfan grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda Kaspaz pozitif hücre sayısında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,06$).
- Alfa Lipoik Asit grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda Kaspaz pozitif hücre sayısı ALA+BUS grubu anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$) (Tablo 10).



Şekil 18: Aktif Kaspaz-3 boyaması (A) Kontrol Grubu, (B) Alfa Lipoik Asit Grubu, (C) Busulfan Grubu, (D) ALA+BUS Grubu
(→) kaspaz pozitif hücreler.

4.4.2 TUNEL Terminal (Deoxynucleotidyl Transferase - Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick - End Labelling)

Seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldığında;

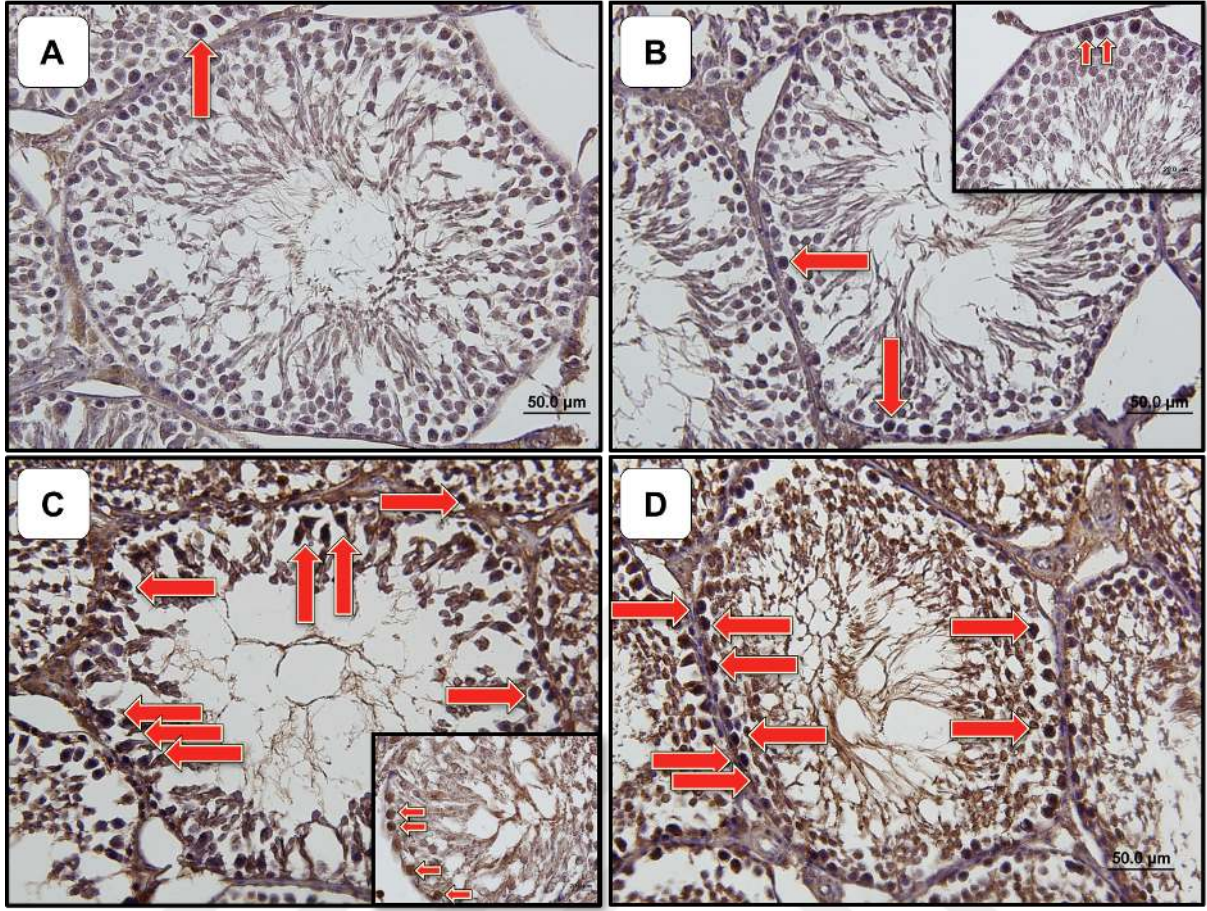
Kontrol grubu ortalama $9,97 \pm 0,21$,

Busulfan grubu ortalama $34,36 \pm 0,43$,

Alfa Lipoik Asit grubu ortalama $10,13 \pm 0,19$,

ALA+BUS grubu ortalama $33,60 \pm 0,16$ olarak bulundu.

- Kontrol grubu ve Busulfan grubu karşılaştırıldığında TUNEL pozitif hücre Busulfan grubunda anlamlı olarak artmıştı. ($p=0,001$).
- Kontrol grubu ve ALA grubunu karşılaştırdığımızda TUNEL pozitif hücre sayımı anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,21$).
- Kontrol grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda TUNEL pozitif hücre sayımı ALA+BUS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$).
- Busulfan grubu ve Alfa Lipoik Asit grubunu karşılaştırdığımızda TUNEL pozitif hücre sayımı Busulfan grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$).
- Busulfan grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda TUNEL pozitif hücre sayımı anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,23$).
- Alfa Lipoik Asit grubu ve ALA+BUS grubunu karşılaştırdığımızda TUNEL pozitif hücre sayımı ALA+BUS grubu anlamlı olarak artmıştı ($p=0,001$) (Tablo 10).



Şekil 19: TUNEL boyaması (A) Kontrol Grubu, (B) Alfa Lipoik Asit Grubu, (C) Busulfan Grubu, (D) ALA+BUS Grubu
(→) kaspaz pozitif hücreler.

4.5 BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.5.1 Enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinin saptanması

MDA değerleri The Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar μM olarak ifade edildi. Kitin çalışma yöntemi kromojenik bir reaktif ile MDA'nın 45°C 'de reaksiyona girmesi temeline dayanır. 586 nm'de absorbans ölçülerek standart eğrisinden MDA değerleri belirlendi.

GSH ve GPx enzim aktiviteleri Oxis Research kitleri kullanılarak spektrofotometre (T80, PG instruments, UK) ile ölçüldü. Enzim aktiviteleri hazırlanan süpernatantlardan ölçüldü, GSH sonuçları μM , GPx sonuçları ünite/mg protein (U/mg pr) $\pm$ Standart Hata (SH) olarak gösterildi. GSH seviyeleri Bioxytech GSH-420 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. Kitin çalışma yöntemi chromophoric thione oluşumu temeline dayanır. Tamponla karıştırılan süpernatana indirgeyici ajan eklenerek oksidize glutatyon indirgenmiş forma dönüştürülür. Daha sonra kromojen eklenip pH arttırılarak chromophoric thione oluşturulur. 420 nm'de absorbans ölçülerek GSH konsantrasyonu belirlendi.

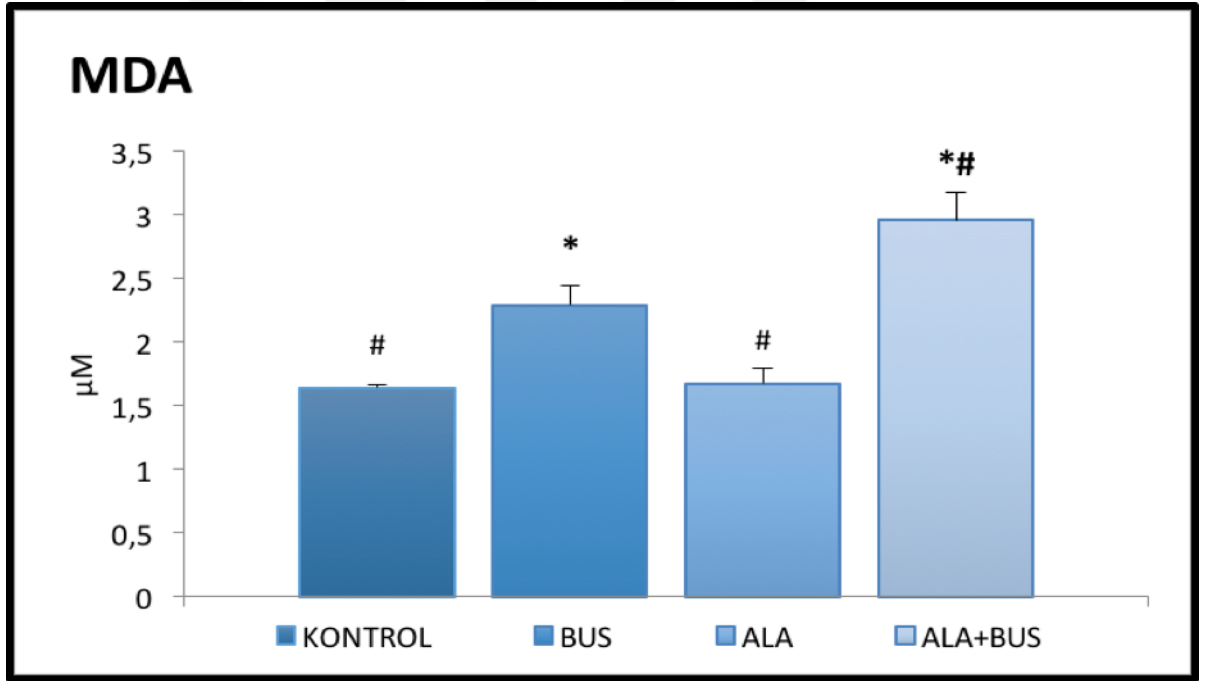
GPx aktivitesi Bioxytech GPx-340 (Oxis International, USA) kiti ile saptanmıştır. Bu kit Paglia ve Valentine'ın tanımladığı yöntemle göre hazırlanmıştır. GPx, kümen hidroperoksit ile glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH okside olarak NADP'ye dönüşür. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbansdaki azalma ölçüldü.

Doku protein ölçümleri Intron BCA protein kitiyle yapıldı (SMART BCA Protein Assay Kit, 21071). Kitin çalışma prensibi total proteinin kolorimetrik tayininde BCA (bisinkoninik asit) kullanılmasına dayanmaktadır. İki molekül BCA bir bakır iyonu ile şelatlanarak morumsu renkte reaksiyon oluşturmaktadır. Spektrofotometrede 620 nm'de absorbans okunarak standart eğrisinden protein konsantrasyonu belirlenmektedir.

Biyokimyasal değerlendirmede tüm veriler ortalama $\pm$ SH olarak gösterildi. Grupların ortalamları arasındaki farklar SPSS programında one-way ANOVA post hoc LSD testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

4.5.1.1 MDA değerleri

Tüm grupların MDA değerleri Tablo 1’de, ortalama MDA sonuçları Grafik 1’de gösterilmektedir. Busulfan grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.005$). ALA grubunda MDA değerleri Busulfan ve ALA+Busulfan gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol ve ALA grupları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Busulfan grubunun MDA değerleri ALA+Busulfan grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

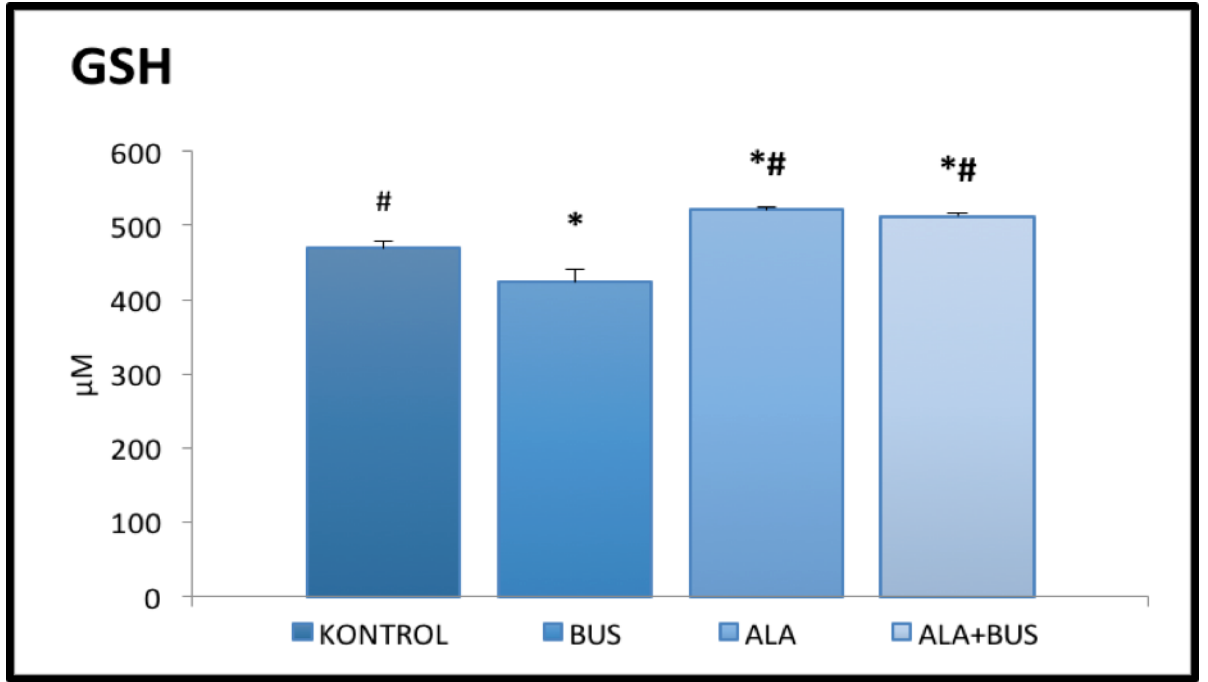


şekil 20: MDA değerleri

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı; # Busulfan grubuna göre anlamlı olarak farklı

4.5.1.2 GSH değerleri

Tüm grupların GSH değerleri Tablo 1’de, ortalama GSH sonuçları Grafik 2’de gösterilmektedir. Busulfan grubunda GSH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). ALA+Busulfan grubunda GSH değerleri Busulfan grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). ALA ve ALA+Busulfan grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

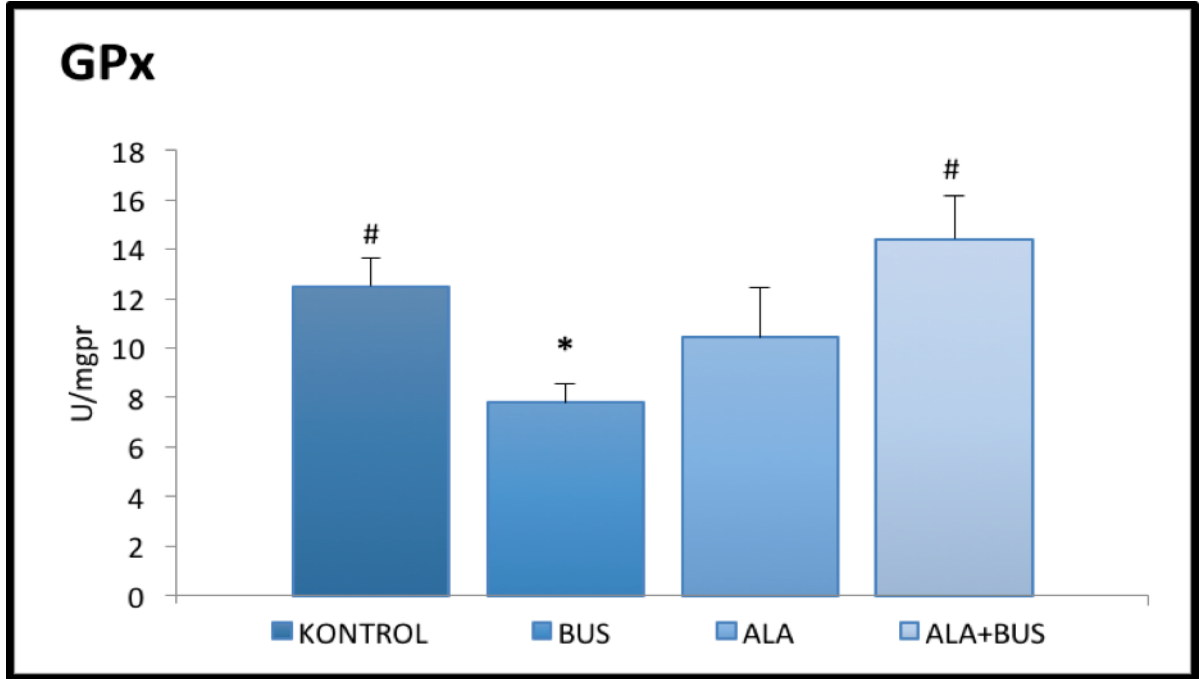


Şekil 21: GSH değerleri

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı; # Busulfan grubuna göre anlamlı olarak farklı

4.5.1.3 GPx değerleri

Tüm grupların GPx enzim aktivitesi değerleri Tablo 1’de, ortalama GPx enzim aktivitesi sonuçları Grafik 3’de gösterilmektedir. Busulfan grubunda GPx değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubu ile ALA ve ALA+Busulfan grupları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). ALA+Busulfan grubunda GPx değerleri Busulfan grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). ALA ve ALA+Busulfan grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 22: GPx değerleri

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı; # Busulfan grubuna göre anlamlı olarak farklı

Tablo 11: MDA, GSH ve GPx değerlerinin gruplar arası istatistik verileri.

GRUP	n	MDA	GSH (μM)	GPx U/mg pr
Kontrol	7	1.64±0.02#	469.95 ± 9.47#	12.49±1.15#
Busulfan	7	1.64±0.02#	423.62±16.61*	7.79±0.80*
Alfa Lipoik Asit	7	1.67±0.11#	520.98±3.03*#	10.43±2.00
Ala+Bus	7	2.95±0.21*#	512.55±4.86*#	14.4±1.78#
p		<0.001	<0.001	0.031

* Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı

Busulfan grubuna göre anlamlı olarak farklı

5. TARTIŞMA

Son yıllarda çocukluk çağı kanser tedavilerindeki kapsamlı gelişmeler bu malignitelere hayatta kalma oranını artırdı. Bu nedenle vakalardaki yaşama beklentisi de arttı (133). Uygulanan kanser tedavileri hızla bölünüp çoğalan kanser hücreleri üzerinde oldukça etkilidir. Ancak bu tedaviler tümör hücrelerini spesifik olarak hedefleyemezler. Bu da çeşitli ikincil malignitelere neden olmaktadır. Onkolojik tedavilere bağlı en önemli sorunlardan biri de infertilitedir. Sitotoksik kemoterapi ilacı olan alkilleyici ajanlar (siklofosfamid, sisplatin, busulfan vb) , germinal epitel hasarı oluşturarak oligospermi veya azospermiye neden olabilir. Bu nedenle kanserli kişilerin infertilite tedavisi için birçok girişim uygulanır. Özellikle spermatozoa dondurma yaygın bir klinik uygulamadır ve intra stoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile başarılı sonuçlar alınmaktadır. Ancak bu yöntem henüz çocukluk çağına olan hastalar için uygulanabilir değildir (134).

Busulfan klinikte kullanılan bifonksiyonel alkilleyici antineoplastik bir ilaçtır. Kronik Miyeloid Lösemi ve Polisitemia Vera gibi çeşitli malign hastalıkların tedavisinde kullanılır. Busulfan, hematolojik, sinir ve üreme organları gibi çeşitli biyolojik organlarda hem akut hem de kronik çeşitli olumsuz etkilere neden olabilen yüksek toksisiteye sahiptir. Kemoterapide kullanılan alkilleyici ajanlar germ hücreleri ve somatik hücrelerde alkil gruplarını çeşitli hücresel bileşenlere aktararak hücresel mekanizmalarda sitotoksik etkilere neden olur (134). Simone ve ark. Yaptıkları çalışmada Busulfan'ın serbest radikaller üreterek hücreleri öldürdüğünü açıklamışlardır (135). Antioksidanlar ise hem serbest radikalleri hem de bunlardan kaynaklanan oksitadif reaksiyonları nötralize ederler (134).

Alfa lipoik asit, fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren antioksidan aktivitesi olan doğal bir moleküldür. Hem lipofilik hem de hidrofilik ortamlarda etkinlik gösterir. Aynı zamanda radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin süpürülmesi, hücre haraplarının onarılması ve endojen antioksidan kapasitesinin artırılması gibi antioksidan savunma sisteminin bütün basamaklarında da etkili olduğu için evrensel bir antioksidan olarak adlandırılır (81,82). Klinikte Lipoik asit takviyesi insanlarda çeşitli hastalıklarda denenir. Bunlar arasında diyabette kan

şekerinin düşürülmesi, damar hastalıkları, metabolik sendrom, multipl skleroz, Alzheimer, demans sayılabilir (101,102,96,103). Hayvan deneylerinde ise iskemi-reperfüzyon hasarı, katarakt oluşumu, nörodejenerasyon, yaşlanma, kolit, radyasyon hasarı ve çeşitli ilaç (adriamisin, siklofosfamid, siklosporin A) toksisitelerine karşı yararlı olduğu gösterilmiştir (104,105,106,107,108,109,110).

Bu tez çalışmasında Busulfan uygulanan prepubertal erkek ratlarda oluşan testis hasarına karşı güçlü bir antioksidan olan Alfa Lipoik Asit'in etkisini incelemeyi amaçladık ve elde ettiğimiz verilerin literatüre katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Deneysel çalışmalarda Busulfan uygulanan erkek ratlarda testis ağırlığı, denek ağırlıkları, apoptoz belirteçleri ve biyokimyasal parametreler ile çalışmalar desteklenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu ögeler tübül hasarını ve antioksidan etkinliğini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Işık mikroskopik bulgular; Çalışmamızda intraperitoneal olarak 21 gün ara ile iki doz 10 mg/kg Busulfan uygulanan prepubertal erkek ratlarda oluşan testis hasarına karşı Alfa Lipoik Asit'in tedavi edici etkisini değerlendirdik. Bu değerlendirmeyi yaparken tüm gruplarda testisin histolojik yapısını koruyup korumadığını incelemek için ve seminifer tübül çap ölçümü için H&E, bazal membrandaki değişimler için PAS boyası, apoptozun değerlendirilmesi amacıyla da TUNEL ve aktif kaspaz-3 antikoru immünohistokimyasal olarak uygulandı. Ayrıca testiste oluşan hasar semikantitatif olarak skorlanarak değerlendirildi ve histomorfometrik ölçümler yapıldı.

Busulfan dozu, yapılan literatür taraması sonucunda araştırmacıların çok farklı miktarlar ve çözücü olarak da DMSO kullanmalarından dolayı ticari olarak satılan ve klinikte kullanılan Busilvex ile ön çalışma yapıldı. Optimizasyon için denenen; 14 gün ara ile 15 mg/kg, 21 gün ara ile 10 mg/kg, tek doz 40 mg/kg ve tek doz 20 mg/kg dozlardan 21 gün ara ile 10 mg/kg'ın çalışmamız için en ideal doz olduğu tespit edilmiştir (63,136,137,138).

Perez-Crespo ve ark.ları Busulfan grubunda testis ve epididimis ağırlıkları, spermatozoa konsantrasyonu ve motilitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Histolojik analizlerinde seminifer tübüllerin çaplarında azalma ve seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon, dejenere spermatosit ve germ hücrelerinde kayıp olduğunu gözlemiştir.

Mehrabani ve ark. çalışmalarında Sprague-Dawley ratlara 21 gün ara ile 10 mg/kg iki doz Busulfan'ı (Busilvex®), i.p olarak uygulamışlardır. Deney sonunda busulfan uygulanmış denek testislerini histolojik olarak incelediklerinde bir çok seminifer tübülde, seminifer tübüler atrofi ve dejenaratif germinal epitel gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin lümenlerinde geniş vakuolazisyonlar izlenmiştir ve seminifer tübüllerin periferik zonlarında ince bir tabaka halinde atrofik germinal epitel kaplandığını belirtmiştir (136).

Panahi ve ark. Sprague-Dawley rat kullandıkları çalışmalarında ilk gruba tek doz 10 mg/kg Busulfan (Busilvex®), ikinci gruba 21 gün ara ile iki doz 10 mg/kg Busulfan'ı i.p olarak uygulamış ve bu iki grubu hiçbir işlem uygulanmamış kontrol grubuyla karşılaştırmıştır.

Tek doz Busulfan grubunda hipo-spermatogenezis gözlemiştir. Çalışmalarında, germ hücrelerinde (spermatagonia, spermatosit ve spermatidler) azalma olduğunu belirtmişlerdir. Spermatogenezis aşamasında ise spermatogonia ile spermatid hücre tabakaları arasında histopatolojik bulgular tespit etmişlerdir ve spermatogenezisin sınırlandığı, tübül maturasyonunda duraksama olduğu gözlenmiştir. Ancak Leydig hücre miktarı normal olarak gözlenmiştir.

İki doz Busulfan grubunda sadece germ hücreleri ve sertoli hücrelerinde aplazi izlenmiştir. İnterstisyel alanda ve bazal membran kalınlığında görünür bir artış gözlenmemiştir. Tübül çaplarının normal veya kısmen azaldığı ve tübüllerin sadece sertoli hücreleri içerdiğini belirtmişlerdir. İnterstisyel alanda ise leydig hücre miktarı normal olarak izlenmiştir.

Khanlarkhani ve ark. yaptıkları çalışmada morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için testis ağırlıklarını ölçmüşlerdir. Kontrol grubu ile Busulfan grubunun testis ağırlıkları karşılaştırıldığında, busulfan grubunda neredeyse iki kat azaldığını ve H&E boyamasında da yüksek oranda seminifer tübüllerin boş olduğunu belirtmişlerdir (63).

Dehghani ve ark. yaptıkları çalışmada Busulfan uyguladıkları grupta testis ağırlığı, germinal epitel kalınlığı ve seminifer tübül çapında anlamlı azalmanın olduğunu belirtmişlerdir (139).

Mirhoseini ve ark.ları yaptıkları çalışmada Busulfan grubunda testis dokusunda düzensizlik, ayrılmış seminifer tübül yapısı ve bazal membrana komşu küçük germinal hücreler dışında dejeneratif germinal hücreler gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre Busulfan grubunda seminifer tübül kalınlığında anlamlı azalma tespit etmiştir (134).

Bordbar ve ark.ları yaptıkları çalışmada testis ve vücut ağırlıklarını değerlendirmişlerdir. Vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre Busulfan grubunda anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. Testis ağırlığı ve hacmi yine kontrol grubuna göre Busulfan grubu ile karşılaştırıldığında azaldığını belirtmişlerdir. Tübül hacmi ve interstisyel dokunun da Busulfan grubunda anlamlı derecede azaldığını belirtmiştir(140).

Choi ve ark.ları yaptıkları çalışmada deney aşamasında Busulfan grubunda vücut ağırlıklarında hayvanların vücut ağırlıklarında artış olduğunu belirtmişlerdir. Testis ağırlıklarında ise azalma gözlenmiştir. Germ hücrelerinde azalma ve spermatogonia hücrelerin aksine çoğunlukla spermatogenik hücrelerin yokluğu izlenmiştir (137).

Biz de yaptığımız çalışmada araştırmacıların yaptıkları çalışmalara benzer olarak Busulfan grubunda; testis ağırlıkları, seminifer tübül çapı, bazal membran kalınlığı ve germinal epitel kalınlığında azalma gözlemledik. Çalışmamızda vücut

ağırlıklarını değerlendirdiğimizde, Choi ve arkadaşlarının elde etmiş olduğu vücut ağırlığı artışını diğer çalışmacıların aksine bizde çalışmamızda benzer olarak arttığını gözlemledik. Seminifer tübül epiteli germ hücreleri arasında ve tübül lümeninde vakuolizasyon ve germinal epitel hücre kaybı olduğunu gözlemledik. Spermatogonyumlar ve tübül lümeninde spermiyum sayılarının az olduğu hatta bazı lümenlerin ise boş olduğunu gözlemledik. Sertoli hücre yapısı da normal olarak izlendi. Ancak Bordbar ve arkadaşlarının aksine biz intertisyel alanda herhangi bir değişiklik gözlemlemedik.

Dehghani ve ark.ları yaptıkları çalışmada Busulfa'nın oksidatif hasarla spermatogenezisi inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmalarında serbest radikallerin direkt olarak DNA kırıklarına veya genom'un yıkımına neden olarak, harabiyet oluşturduğunu gözlemlemişler (139).

Nasimi ve ark.ları yapmış oldukları çalışmada Busulfan'ın yapmış olduğu testis hasarına karşı Satureja khuzestanica (SKEO) bitkisi esansiyel yağının koruyucu etkisini değerlendirmişlerdir. Busulfan uygulamasından bir gün sonra SKEO verdikleri grubu kontrolle karşılaştırdıklarında TUNEL pozitif spermatozoa yüzdesinde anlamlı artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Fakat SKEO verilip ardından Busulfan uygulamasından sonra tekrar SKEO verilen grupta TUNEL pozitif spermatozoa yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılığın olmadığını tespit etmiştir (7).

Mirhoseini ve ark.ları yaptıkları çalışmada Busulfan grubunda TUNEL pozitif germ hücrelerinde oldukça anlamlı bir artışın olduğunu göstermişlerdir. Busulfanın spermatogenezise vermiş olduğu hasarın iyileştirilmesinin ise zor olabileceğini belirtmişlerdir (134).

Dalia ve ark.ları yaptıkları çalışmada Busulfan grubunda aktif-kaspaz 3 pozitif hücrelerin kontrol grubuna göre arttığını tespit etmişlerdir. Germ hücre tabakası kalınlığının azaldığını belirtmişlerdir. Bu bulgular dahilinde araştırmacılar, sitotoksik ilaçların, germinal epitelin mitotik aktivitesinden dolayı hedef alındığını belirtmektedir (141).

Li ve ark.ları yaptıkları çalışmada Bulsafının serbest oksijen radikallerinde artışı indüklediği gösterilmiştir.

Bizde çalışmamızda Dalia, Mirhoseini ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalara benzer olarak Busulfan grubunda DNA fragmentasyonunda artış ve pozitif apoptotik hücre sayısında ki artış nedeniyle spermatositogeneziste duraksama ve spermatogonik hücre serisinde azalma gözlemledik.

Mirhoseni ve ark.ları yaptıkları çalışmada, farelerde Busulfan grubunda ışık mikroskopi görüntüleme ile testiküler hasar ve spermatogenezisi değerlendirmiştir. Johnsen's skorum tekniği spermatogenezis değerlendirilmesinde kullanmıştır. Johnsen skoruması x40'lık büyütmede, her bir testis dokusunda 100 tübül sayılmıştır. Her bir tübüle 1'den 10 kadar değer vermişlerdir. Skor 1 inaktivite gösteren tübül, skor 10 ise maksimum aktivite (lümende en az 5 veya daha fazla spermatozoa) gösteren tübüldür. Busulfan grubunda Johnsen skoru (ortalama=15.50) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığını belirtmiştir (134).

Panahi ve ark.ları yaptıkları çalışmada spermatogonik hücreleri değerlendirmek için spermatogonik indeks skalasına göre sonuçları değerlendirmiştir. Bu indeks, semifer tübülde spermatogonik hücre varlığı-yokluğu , germ hücre miktarı, hücre tipleri, ve geç spermatid varlığı-yokluğuna bakılarak kantitatif olarak değerlendirilmektedir. Araştırmacılar skorum için 0 'dan 6 kadar değer vermişlerdir. Her bir tübülde, 0 skor= spermatogonik hücre yokluğu, 1 skor= sadece spermatogonia varlığı, 2 skor = spermatogonia, spermatosit, 3 skor= spermatogonia, spermatosit, erken spermatidler ve 25 ten az geç spermatidler varlığı, 4 skor= spermatogonia, spermatosit ,erken spermatidler ve 50 den fazla geç spermatid varlığı , 5 skor= tüm germ hücre tipleri ve 50 ile 100 arasında geç spermatidler, 6 skor= tüm germ hücre tipleri ve 100 den fazla geç spermatidler varlığı olarak skorlanmıştır. Araştırmacılar seminifer tübüllerin spermatogenezis indeksin, 2 doz 10

mg/kg Busulfan i.p enjeksiyon uygulanan Busulfan grubunda anlamlı olarak azaldığını göstermiştir (142).

Mehrabani ve ark.ları yaptıkları çalışmada Panahi ve arkadaşlarının çalışmasında da yer alan spermatogenik indeks skalası ile potansiyel spermatogenik hücre sayısı kantitatif olarak değerlendirmiştir. Ancak skorlamada 0 ile 5 kadar olan değer aralığı seçilmiştir. Her bir tübülde; 0 skor= spermatogenik hücre yokluğu, 1 skor= sadece spermatogonia varlığı, 2 skor= spermatogonia, spermatosit, 3 skor= spermatogonia, spermatosit, erken spermatidler ve 50 den az geç spermatidler varlığı, 4 skor= spermatogonia, spermatosit, erken spermatidler ve 50 ile 100 arasında geç spermatidler, 5 skor= tüm germ hücre tipleri ve 100 den fazla geç spermatidler gösterilmiştir. Busulfan grubu skarlama sonuçları, kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığını belirtmiştir (136).

Bizde çalışmamızda tübüllerde spermatogeneziste ki değişiklikleri kantitatif olarak göstermek için Mirhoseni ve arkadaşlarının yaptıkları gibi Johnson Skarlama Tekniğini kullandık. Elde ettiğimiz veriler SPSS 22.0 proramına yüklenerek One Way Anova programında Tukey testi ile değerlendirdiğimizde Busulfan grubu skarlama sonuçlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış olduğunu tespit ettik.

Selvakumar ve ark.ları yaptıkları çalışmada Siklofosfamid ile oluşturulan testis hasarında Alfa Lipoik Asit'in koruyucu etkinliğini biyokimyasal olarak incelediklerinde; GPX değerlerinde azalış ve GSH değerlerinde ise kontrol grubuna göre artış olduğunu belirtmiştir (143).

Lebda ve ark.ları yaptıkları çalışmada Akrilamid ile oluşturulan testis hasarına Alfa Lipoik Asit'in etkinliğini biyokimyasal olarak incelediklerinde MDA değerinin kontrol grubuna göre Lipoik Asit grubunda azaldığını, GSH ve GPX değerlerinin ise kontrol grubuna göre Lipoik Asit grubunda arttığını belirtmişlerdir.

Biz de çalışmamızda biyokimyasal analiz sonuçlarını değerlendirdiğimizde, Lebda ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer olarak Alfa lipoik Asit grubunun kontrol grubuna göre GPX, GSH değerlerinin artışıını tespit ettik. Lebda ve arkadaşları Alfa lipoik asit grubunun kontrol grubuna göre MDA değerlerinde azalış tespit ederken Selvakumar ve arkadaşları ise MDA değerlerini kontrol grubuna yakın olarak tespit etmiştir. Bizim alışmamızda ise, MDA değerlerinin Lebda ve arkadaşlarının aksine biz analiz sonuçlarımızda anlamlı olmasada artış olduğunu tespit ettik.

Yaptığımız literatür taramasına göre daha önce Busulfan'ın biyokimyasal olarak MDA, GPX ve GSH analizleri açısından değerlendirilmemiştir. Prepubertal sıçanlarda busulfan ile oluşturulan testis hasarına Alfa Lipoik Asitin etkisini değerlendirdiğimiz alışmamızda, Busulfan grubumuzda MDA değerlerinde anlamlı derecede artış, GPX ve GSH değerlerinde ise anlamlı derecede azalış olduğunu tespit ettik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Busulfan verilen grupta spermatogonium ve spermatositlerdeki DNA hasarına uğrayan hücre sayıları yüksek bulunmuştur. Bu da Busulfan'ın testis üzerinde DNA hasarına neden olduğunu kanıtlamaktadır.

Busulfan grubundan elde ettiğimiz yüksek seviyedeki MDA düzeyi ve düşük seviyedeki GPX ve GSH düzeyleri Busulfan'ın oksidatif strese de neden olduğunun bir kanıtıdır.

Gruplar arasındaki seminifer tübül çaplarını karşılaştırdığımızda Busulfan seminifer tübül çaplarında daralmaya, bazal membran kalınlığında azalmaya, spermatogenik hücre kaybına ve tübülde vakuolizasyona neden olmuştur.

Immunohistokimyasal olarak TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 IHC boyamalarında Busulfan grubunda pozitif boyanan hücre sayıları anlamlı derecede artmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız dozdaki Alfa Lipoik Asit'in Busulfan'ın neden olduğu hasarı anlamlı bir şekilde engellemediği ancak tek başına uygulandığında antioksidan etkisini koruduğu ve herhangi bir hasar vermediğini gördük.

Güçlü bir antioksidan olan Alfa Lipoik Asit'in daha önceki çalışmalarda testiste oluşturulan hasarlar üzerinde koruyucu etkisi olduğu literatürde gösterilmiştir. Busulfan'la oluşturulan hasarda ilk kez uygulanan Alfa Lipoik Asit, elde ettiğimiz veriler doğrultusunda 35 günlük süreçte beklenen etkiyi göstermedi ancak farklı süre ve dozlar belirlenerek çalışılmasının literatüre katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

- 1) Stiller, C.A., Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004. 23(38): p. 6429-44.
- 2) Center for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System.
- 3) Green DM: Evaluation of renal function after successful treatment for unilateral, non-syndromic Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer* 60 (12): 1929-35, 2013.
- 4) Sönmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004; 10; 251-66.
- 5) Blijdorp K, Dorp WV, Laven JSE, Pieters R ve ark., Obesity independently influences gonadal function in very long-term adult male survivors of childhood cancer. *Obesity A Research J*, 2014; vol 22:1896-1903.
- 6) Green D.M, Nolan V.G, Goodman P.J, Whitton J.A ve ark., The cyclophosphamide equivalent dose as an approach for quantifying alkylating agent exposure. A report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr Blood Cancer*, 2014; 61(1):53-67.
- 7) Nasimi P, Vahdati A, Tabandeh MR, Khatamsaz S ve ark, Cytoprotective and anti-apoptotic effects of *Satureja khuzestanica* essential oil against busulfan-mediated sperm damage and seminiferous tubules destruction in adult male mice. *Andrologia*, 2016;48(1):74-81.
- 8) Hassan M, Ehrsson, H, Ljungman, P. Aspects Concerning Busulfan Pharmacokinetic and bioavailability. *Leukemia and Lymphoma*, 1996; vol. 22,395-407.
- 9) Koren, G., Therapeutic Drug Monitoring Principles In The Neonate. (1997). *Clinical Chemistry* 43:1 222-227.
- 10) Nath, C.E., Shaw, P.J. Busulfan in Blood and Marrow Transplantation: Dose, Route, Frequency and Role of Therapeutic Drug Monitoring. (2007). *Current Clinical Pharmacology*, 2, 75 – 91.
- 11) Bensinger WI. High-dose Preparatory Regimens In: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin SR, Blume KG(eds): *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, 4th ed, Blackwell Publishing, NJ, USA, 2004, 316-333.

- 12)** Alpha-lipoic acid. *Alternative Medicine Review* 2006;11:232-37.
- 13)** Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. VI. Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Biochem J* 1937;31:1789.
- 14)** Reed LJ, Gunsalus IC, Schnakenberg GHF, Soper QF et al. Isolation, characterization and structure of α -lipoic acid. *JACS* 1953;75:1267-77.
- 15)** Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H et al. Investigations on pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1998;36:625-28.
- 16)** Bilska A, Wodek L. Lipoic acid—the drug of the future *Pharmacological Report* 2005;57:570-577.
- 17)** Gamish AM. The Protective Role of Alpha Lipoic Acid Against pesticides Induced testicular toxicity. (Histopathological and Histochemical Studies) *Life Science Journal*, 2010; 7, 3;117-124.
- 18)** Junqueira L.C., Carneiro J. *Temel histoloji text & atlas*. 11. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2009, 418.
- 19)** Kierszenbaum AL. *Histoloji ve hücre biyolojisi*. Çeviri Demir R. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006:531.
- 20)** Ross HM, Pawlina W. *Histoloji: Konu Anlatımı ve Atlas*. 6. Baskıdan çeviri. Ankara, Palme Yayıncılık, 2014, 784.
- 21)** Gilroy A.M. *Anatomi Temel Ders Kitabı*. 1. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2015, 118-220.
- 22)** Moore KL, Persaud TVN. *İnsan Embriyolojisi* 8. Baskıdan çeviri; Nobel Tıp Yayınları 2008;262-273.
- 23)** Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). *Langman's medikal embriyoloji*. 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 1996:274-5.
- 24)** DUDEK R.W. *BRS Embriyoloji*. 6. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2016,180.
- 25)** Petorak İ. *Medikal embriyoloji*. İstanbul: Beta Basım Dağıtım A.Ş., 1986:220-3.
- 26)** Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. *Urol Clin North Am* 1995; 22(1):107-8.

- 27) Tanyel FC. A reevaluation of the mechanism of testicular descent: reasons for failed descent or ascent. J Pediatr Surg 2000; 35:1147-9.
- 28) Abe T, Hutson JM. Calcitonin gene related peptide injected ectopically alters gubernacular migration in the flutamide-treated rat with cryptorchidism. Pediatr Surg Int 1994; 9:551-4.
- 29) Özbek E. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD Ders Notları.
- 30) Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology, 4th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2009; 479-541.
- 31) Gövsa Gökmen F. Sistemik Anatomi. İzmir, İzmir Güven Kitapevi, 2003,549
- 32) Paker Ş, Genel Histoloji; Uludağ üniversitesi güçlendirme vakfı yayın UÜİİBF işletme iktisadi ve muhasebe araştırma merkezi 1990;32: 260-289.
- 33) Lennox B, Ahmad KN. The total length of tubules in the human testis. J Anat 1970;107:191.)
- 34) Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi. 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi, 2016, 421
- 35) Lui W., Dolores M., Lee W. M., Cheng C. Y.: Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. Biology of Reproduction, 68:1087-1097. 2003.
- 36) Fawcett DW. Bloom and Fawcett. A Textbook of histology. 20th Edition. Philadelphia-London-Toronto-Mexico-Rio De Janeiro-Sydney-Tokyo-Hong Kong: W.B. Saunders Company, 1994; 768-815.
- 37) Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology, 2nd Edition. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2001;487-508.
- 38) Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology, 4th Edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2009; 479-541.
- 39) Erdoğan, D., Hatipoğlu, M. T., Görgün, M., Ilgaz, C. (2007). Özel Histoloji. 2.Basım, **Hatiboğlu Yayınevi**, Ankara.
- 40) Netter, F. H., Ovalle, W. K., Nahirney, P.C. (2009) Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çev.), **Güneş Tıp Kitabevleri**, Ankara.
- 41) Eroschenko PV. Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Ankara. Palme Yayıncılık, 2001;283-299.

- 42)** Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, 2007; 563,758,955-956.
- 43)** Stondring S. Gray's Anatomy. The Anatomical Basis of Clinical Practice. 40. Baskı. Londra. Churchill Livingstone Elsevier, 2008; 1261-1277.
- 44)** Widmaier EP, Hershel R, Strang KT. Vander İnsan Fizyolojisi. 13. Baskı. Ankara. Güneş Tıp Kitapevleri, 2014; 612-621.
- 45)** Cooper, M.G., Hausman, R.E., Hücre, Moleküler Yaklaşım, İzmit Tıp Kitap Evi, İzmir, 2006;631-673.
- 46)** Kumar M, Nagpal R, Hemalatha R, Verma V ve ark. Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. Acta Biomedica, 2012;83, 220-33.
- 47)** Demirci U, Benekli M, Büyükberber S, Coşkun U. Late side effects of cancer therapy. Int J Hematol Oncol 2010;4:250-61.
- 48)** Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. Anticancer Agents Med Chem 2010;10:92-102.
- 49)** Turci R, Sottani C, Spagnoli G, Minoia C. Biological and environmental monitoring of hospital personel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. Journal of Chromatography B. 2003; 789: 169-209.
- 50)** Boxtel CJ. Drug benefits and risks. 2nd Edition IOS Press, Sweden. 2008; Antineoplastic agents 447-464.
- 51)** Adamson PC, Balis FM, Berg S, Blaney SM. Genel Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles And Practice of Pediatric Oncology. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. pp 290-365.
- 52)** Silver RT. Chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am, 2003;17 (5):1159-vii. 233.
- 53)** Krivoy N, Hoffer E, Lurie Y, Bentur Y, Rowe JM Busulfan use in hematopoietic stem cell transplantation: pharmacology, dose adjustment, safety and efficacy in adults and children. Curr Drug Saf. 2008 Jan;3(1):60-6.
- 54)** Chen, L., Zhou, Z., Shen, M., Ma, A., Quantitative Analysis of Busulfan in Human Plasma by LC-MS-MS. Chromatographia, 2009; 70:1727.

- 55)** Houot M, Poinsignon V, Mercier L, Valade C, Desmaris R, Lemare F, Paci A, Physico-chemical stability of busulfan in injectable solutions in various administration packages. *Drugs R D*, 2013; 13:87–94.
- 56)** <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=6691>.
- 57)** Bonifazi F, Storci G, Bandini G, Marasco E ve ark, Glutathione transferase-A2 S112T polymorphism predicts survival, transplant-related mortality, busulfan and bilirubin blood levels after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014; 99(1):172-9.
- 58)** Galaup A, PaciA. Pharmacology of dimethanesulfonate alkylating agents: busulfan and treosulfan. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013 Mar;9(3):333-47.
- 59)** Brugieres L, Hartmann O, Benhamou E, Zafrani ES, Caillaud JM, Patte C, Kalifa C, Flamant F, Lemerle J. Veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in children with solid tumors: incidence, clinical course and outcome. *Bone Marrow Transplant*. 1988 Jan;3(1):53-8.
- 60)** Andersson BS, Kashyap A, Gian V, Wingard JR, Fernandez H, Cagnoni PJ, Jones RB, Tarantolo S, Hu WW, Blume KG, Forman SJ, Champlin RE. Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogeneic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(3):145-54.
- 61)** Santos, G. W. Busulfan and cyclophosphamide for marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*.(Suppl.1): 236-239, 1989.
- 62)** Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E, Bougneres PF. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22(10):989-94.
- 63)** Khanlarkhani N, Pasbakhsh P, Mortezaee K, Naji Mve ark, Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on rat busulfan-induced testis injury. *J Mol Histol*. 2016;47(1):59-67.
- 64)** Deveci HA, Güven A. Mastitisli ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerinin araştırılması, *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 2008;14 (1): 63-66.

- 65)** Tsolaki E, Nobelos P, Geronikaki A, Rekka EA. Selected heterocyclic compounds as antioxidants. Synthesis and biological evaluation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014;(22): 2462-2477.
- 66)** Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Crit Care Med*. 1993;21: 92-102.
- 67)** Gökpinar S, Koray T, Akçiçek E, Göksan, T ve ark. Algal Antioksidanlar. E.U. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. 2006;23(1/1) 85-89.
- 68)** Riemarsma RA, Wood DA, Elton RA, Oliver MF. Risk of angina pectoris and plasma concentration of vitamin A, C, E, and caroten, *The Lancet*, 1991;337, 1-5.
- 69)** Sander SC, Chang H, Salzmann S, Mueller SL ve ark. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo, *The Society for Investigative Dermatology*, 2002;118, 618-625.
- 70)** Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing, *Acta Medica*, 2011;54 (3): 97-101.
- 71)** Kim YM, Kim JE, Kim YN, Choi C, Lee BH. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats, *Nutrition Research and Practice*, 2011;5(5), 421-428.
- 72)** Benzer F, Temizer OS. Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri, araştırma makalesi, 2002;657-661.
- 73)** Alhan CC, Şan M. Koroner kalp hastalığı tedavisinde anti-oksidanlar yararlı mı?. *T. Klin J. Cardiol*. 2002;15s
- 74)** Yue Y, Zhou H, Liu G, Li Y ve ark. The advantages of a novel CoQ10 delivery system in skin photo-protection. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;392, 57-63.
- 75)** Absalan G, Arabi M, Tashkhourian J. Construction of an optical sensor for the determination of ascorbic acid using ionic liquids as modifier, *Analytical Sciences*, 2012;1225-1230.
- 76)** Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005;3: 30-39.
- 77)** Odum EP, Wakwe VC. Plasma concentrations of water-soluble vitamins in metabolic syndrome subjects, *ORIGINAL ARTICLE*, 2012; 442-447.

- 78)** Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J*, 1999;13, 1145- 1155.
- 79)** Janson M. Orthomolecular medicine: the therapeutic use of dietary supplements for anti-aging, *Clinical Interventions in Aging*, 2006;1(3), 261–265.
- 80)** Kizhakekuttu JT, Widlansky EM. Natural Antioxidants and hypertension: promise and challenges, *Cardiovascular therapeutics*, 2010; 28, 20-32.
- 81)** Karaca EG, Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe University Journal of Science*. 2008;(8)1, p 231-246.
- 82)** Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Sgherri, C., Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem*. 2002; 40:463-470.
- 83)** Kramer K. *Nutra ceutials in Heath and Disease Prevention*. Marcel Dekker Incorporated. New York, 2001; 8:113.
- 84)** Atmaca G. Sarımsağın ve tiyol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2003; 20(1–3):54-60.
- 85)** Bullock MW, Brockmann JA, Patterson EL, Pierce JV ve ark. Proposed structures for protogen-A and protogen-B. *J. Am. Chem Soc*. 1954;76:1827-1828.
- 86)** Chng HT, New LS, Neo AH, Goh CW ve ark. Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res*. 2009;1251: 80-6.
- 87)** Kim YM, Kim JE, Kim YN, Choi C ve ark. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats, *Nutrition Research and Practice*, 2011;5(5), 421-428.
- 88)** Golbidi S, BadranM, Laher I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in Pharmacology*, 2011;(2) 69,15p.
- 89)** Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995; 19 (2):227-250.
- 90)** Hill AS, Werner JA, Rogers OR. O'Neill SL ve ark. Lipoic acid is 10 times more toxic in cat than reported in humans, dogs or rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 2004; 88:150-156.
- 91)** Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol*. 1997; 29:315-331.

- 92)** Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of α - lipoic acid (ALA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006;(46)1, 29-41.
- 93)** Ziegler D, Hanefeld M, Runau KJ, Meissner HP ve ark. Threatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid, A 3-week multicentre randomized controlled trial. *Diabetologia*. 1995;38:1425-1433.
- 94)** Ziegler D, Hanefeld M, Runau KJ, Hasche H ve ark. Threatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicentre randomized controlled trial (ALADIN III study), ALADIN III Study Group, Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. 1999; 22:1296-1301.
- 95)** Karaca G. Dietilnitrozamin verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- 96)** Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M ve ark. Lipoic acid as antiinflammatory nd neuroprotective treatment for alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60: 1463-1470.
- 97)** Roy S, Packer L. Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *Biofactors*, 1998; 8: 17-21.
- 98)** Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes, complications. *Nutrition*. 2001;17 (10):888-895.
- 99)** Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Balz F. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2007;104: 4077-4082.
- 100)** Foster TS. Efficacy and safety of alpha-lipoic acid supplementation in the treatment of symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetes Educ*. 2007; 33: 111-117.
- 101)** Abdul HM, Butterfield DA. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-Lcarnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med*. 2007; 42: 371–384.
- 102)** Pershadsingh HA. Alpha-lipoic acid: physiologic mechanisms and indications for the treatment of metabolic syndrome. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(3): 291-302.

- 103)** Salinthon S, Yadav V, Bourdette DN, Carr DW. Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 2008;8: 132-142.
- 104)** Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP ve ark. The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr. Pharm. Des.* 2006;12, 2891-2901.
- 105)** Makeeva AV, Popova TN, Matasova LV, Yama IN. Effects of lipoic acid on citrate content, aconitate hydratase activity, and oxidative status during myocardial ischaemia in rats. *Biochemistry.* 2008;73: 76-79
- 106)** Manda K, Ueno M, Moritake T, Anzai K. Radiation-induced cognitive dysfunction and cerebellar oxidative stress in mice: protective effect of alpha-lipoic acid. *Behav. Brain Res.* 2007;177: 7-14.
- 107)** Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV ve ark. Alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1996;717: 184-188.
- 108)** Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P, Kumarasamy P ve ark. Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. *Toxicology.*2006;222: 225-32.
- 109)** Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Protective of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clin. Chim. Acta* 2006;367: 114-9.
- 110)** Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clin Chim Acta.* 2006;372(1-2): 134-9.
- 111)** Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Robbins Pathologic Basis of Disease 9th edition 2015:52-60.
- 112)** Garrity MM, Burgart LJ, Riehle DL, Hill EM ve ark. Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls. *Mod Pathol* 2003; 16:389-394.
- 113)** Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA- I)* 1998;1:1-19.
- 114)** Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995; 6: 3-16.
- 115)** Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.

- 116)** Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 133-44.
- 117)** Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2008;6: 93-104.
- 118)** Elmore S. A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35 4:495-516.
- 119)** Balakumran A, Champbell GA, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996; 139: 122-127.
- 120)** Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980; 284: 555- 556.
- 121)** Donepudi M, Grutter MG. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*, 2002;101 102: 145-53.
- 122)** Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, 2000; 25: 1859-1866.
- 123)** Brooks NL. Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. http://etd.uwc.ac.za/userfiles/modules/etd/docs/etd_init_5617_1174551574. 27 Ekim 2010.
- 124)** Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*, 2000;182: 171-181.
- 125)** Turgut B, Demir M, Çeliker Ü. Oftalmotolojide Apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi*, 2006;111: 6-11.
- 126)** Elmore S. Apoptosis a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35 4 495-16.
- 127)** Ow P, Green RD, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c functions beyond respiration. *Nature Reviews Mol Cell Bio*, 2008;9:532-42.
- 128)** Doğan Ş, Kovalı M, Yıldız C, Pekçetin Ç. Programlı hücre ölümü ve spermatozoon. *Erkek Üreme Sağlığı* (www.researchgate.net/publication/233903602) 2010;201-205
- 129)** Martincic DS, Klun IV, Zorn B, Vrtovec HM. Germ cell apoptosis in the human testis.; *Pflugers Arch.* 2001; 442 : 159 -160.
- 130)** Shen HM, Chia SE, Ong CN, Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999;20(6): 718-23.

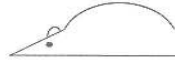
- 131)** Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, ve ark., Apoptotic cell death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351-356.
- 132)** Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Reviews*, 1995;11: 101-105.
- 133)** Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, Van Langendonck A ve ark. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):312-28.
- 134)** Mirhoseini M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A ve ark. Melatonin and testicular damage in busulfan treated mice. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(2):e144-63.
- 135)** Simone CB 2nd, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern Ther Health Med*. 2007;13(1):22-8.
- 136)** Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S ve ark. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *J. Human Rep. Sci*. 2015; DOI: 10.4103/0974-1208.158618
- 137)** Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung J. Murine germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. *Federation of European Biochemical Societies*. 2004; 41-51
- 138)** Abd El Aziz DH, Metwally HG. The effect of stem cell therapy versus melatonin on the changes induced by busulfan in the testis of adult rat: histological and immunohistochemical studies. *The Egypt J. of His*. 2013;36 175-184.
- 139)** Dehghani F, Hassanpour A, Poost-Pasand A, Noorafshan A ve ark. Protective effects of L-carnitine and homogenized testis tissue on the testis and sperm parameters of busulfan-induced infertile male rats. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(9):693-704
- 140)** Bordbar H, Esmaeilpour T, Dehghani F, Panjehshahin MR. Stereological study of the effect of ginger's alcoholic extract on the testis in busulfan-induced infertility in rats. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(9):467-472.
- 141)** Aziz A, Dalia H, Metwally, Hala G. The effect of stem cell therapy versus melatonin on the changes induced by busulfan in the testes of adult rat: histological and immunohistochemical studies. *The Egyptian J. of His*. 2013; 175-184.

142) Panahi M, Keshavarz S, Rahmanifar F, Tamadon A ve ark. Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. 2015;6(4):273-278.



8. EKLER

Ek-1 Etik Kurul Raporu



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/06/2016
Toplantı Tarihi : 15 Mart 2016

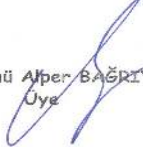
Sayın, Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

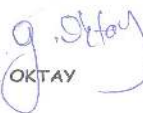
44/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Prepubertal sıçanlarda busulfan ile oluşturulan testis hasarına alfa lipoik asitin etkisi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdansaınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı


Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye


Prof.Dr.Hüsnü Alper BAŞRIYANIK
Üye


Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.katılmadı)


Prof.Dr.Mehmet Ensari GÜNELİ
Üye

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Meral KARAMAN
Üye

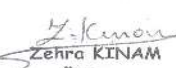
Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye


Zehra KINAM
Üye


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Ek-2 Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

MERVE AKSOY

TC Kimlik No / Pasaport No:	39511906464
Doğum Yılı:	1990
Yazışma Adresi :	Ilıca Mahallesi Lale Sokak No:26 Narlıdere/İZMİR
Telefon :	90 545 43 11 990
Faks :	
e-posta :	merveaksoy08@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TC	Hacettepe Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	
--	--

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
--	------------	------------------	------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Düzenleme Tarihi: 01/02/2017