

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



SIÇANLARDA CİSPLATİNLE İNDÜKLENEN TESTİKÜLER
HASARA KARŞI CHRYSİNİN ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

Atınç KALAYCI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Aslıhan ŞAYLAN

BOLU, OCAK - 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Atınç KALAYCI tarafından hazırlanan “**Sıçanlarda Cisplatinle İndüklenen Testiküler Hasara Karşı Chrysinin Etkisi**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 3/01/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Aslıhan ŞAYLAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için BAİBÜ Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulundan 2023/12 sayısı ile etik izin alınmıştır.

Atınç KALAYCI

ÖZET

SIÇANLARDA CİSPLATİNLE İNDÜKLENEN TESTİKÜLER HASARA KARŞI CHRYSİNİN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATINÇ KALAYCI

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ASLIHAN ŞAYLAN)

BOLU, OCAK - 2025

XII + 77

Sisplatin, etkili bir kemoterapötik ajan olmasına rağmen, özellikle nefrotoksisite ve testis hasarına sebep olması nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Günümüzde kemoterapötiklerin kullanımı sırasında oluşan doku hasarını azaltmak için en yaygın tedavi yöntemi antioksidan maddelerin kullanımıdır. Krisin, yapısındaki hidroksil grupları aracılığıyla serbest radikaller üzerinde eliminasyon etkisine sahiptir ve yüksek antioksidan özelliği göstermektedir. Çalışmamızda sisplatin ile indüklenen testiküler hasara karşı Krisinin etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Grup 1 (Kontrol grubu): Herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup 2 Mısır yağı (Çözücü): 7 günlük deney süresi boyunca her gün 1 ml dozunda mısır yağı oral olarak uygulandı. Grup 3 (Sisplatin): Deneyin ilk günü 7 mg/kg sisplatin tek doz intraperitoneal olarak uygulandı. Grup 4 (Krisin): Mısır yağı içinde çözölmüş 50 mg/kg Krisin toplamda 9 gün boyunca oral olarak uygulandı. Grup 5 (Sisplatin + Krisin): Deneyin ilk günü 7 mg/kg sisplatin uygulandı ve deneyden 2 gün önce başlamak üzere 50 mg/kg dozunda Krisin toplamda 9 gün oral olarak uygulandı. Sakrifikasyon sonrası elde edilen testis dokuları; %10'luk formaldehit içinde fikse edildikten sonra doku takibine geçildi. Histopatolojik inceleme için H&E boyama yapılarak, testiküler değerlendirmede Johnsen skorlaması kullanıldı. Apoptozun değerlendirilmesi amacıyla immünohistokimyasal yöntemlerden faydalanılarak Kaspaz-3 primere dayalı bir boyama gerçekleştirildi. Elde edilen semen örneklerine motilite analizi uygulandı. Ayrıca biyokimyasal olarak; serum örneklerine tiyol-disülfid homeostazisinin parametre düzeyleri ölçüldü. Tüm sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak bu çalışma ile Sisplatin'in testis dokusunda oluşturduğu hasarın üzerinde Krisin antioksidanının olumlu yönde etkileri gözlemlenmiştir. Krisin antioksidanı etkisi, histolojik incelemeler motilite ve biyokimyasal analizlerle desteklenmiş olup iyileşme sağlanmıştır ($p<0.001$). Bu bulgular, Krisin'in sisplatin kaynaklı testis hasarını hafifletmede ve spermatogenez sürecini desteklemede potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir. Gelecekte farklı dozajlar ve tedavi süreleri ile Krisin'in etkinliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için klinik ve prelinik araştırmalar yapılmalıdır.

ANAHTAR KELİMELEER: Antioksidan, Krisin, Sisplatin, Testis hasarı

ABSTRACT

THE EFFECT OF CHRYSIN ON TESTICULAR INJURY INDUCED BY CISPLATIN IN RATS

MSC THESIS

ATINC KALAYCI

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY DEPARTMENT

(SUPERVISOR: ASC. PROF.DR, ASLIHAN ŞAYLAN)

BOLU, JANUARY 2025

XII + 77

Although cisplatin is an effective chemotherapeutic agent, its use is limited, especially because it causes nephrotoxicity and testicular damage. Today, the most common treatment method to reduce tissue damage caused by the use of chemotherapeutics is the use of antioxidant substances. Chrysin has an elimination effect on free radicals through the hydroxyl groups in its structure and shows high antioxidant properties. Our study aims to investigate the effect of chrysin against cisplatin-induced testicular damage. In our study, 40 male rats were used. Group 1 (Control group): No treatment was applied. Group 2 Corn oil (Solvent): Corn oil was administered orally at a dose of 1 ml every day for a 7-day experimental period. Group 3 (Cisplatin): On the first day of the experiment, a single dose of 7 mg/kg cisplatin was administered intraperitoneally. Group 4 (Chrysin): 50 mg/kg Chrysin dissolved in corn oil will be administered orally for a total of 9 days. Group 5 (Cisplatin + Chrysin): 7 mg/kg cisplatin was administered on the first day of the experiment and 50 mg/kg Chrysin was administered orally for a total of 9 days, starting 2 days before the experiment. The testicular tissues obtained after sacrifice were fixed in 10% formaldehyde and tissue follow-up was performed. H&E staining was used for histopathologic examination and Johnsen scoring was used for testicular evaluation. In order to evaluate apoptosis, a staining based on Caspase-3 primer was performed using immunohistochemical methods. Motility analysis was performed on the semen samples obtained. In addition, biochemical parameters of thiol-disulfide homeostasis were measured in serum samples. All results were evaluated semiquantitatively.

As a result, this study observed the positive effects of Chrysin antioxidant on the damage caused by Cisplatin in the testicular tissue. The effect of Chrysin antioxidant was supported by histological examinations, motility and biochemical analyses and recovery was achieved ($p < 0.001$). These findings indicate that Chrysin may be a potential treatment option in alleviating cisplatin-induced testicular damage and supporting the spermatogenesis process. In the future, clinical and preclinical studies should be conducted to better understand the effectiveness of Chrysin with different dosages and treatment durations.

KEYWORDS: Antioxidant, Chrysin, Cisplatin, Testicular damage

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
FOTOĞRAF LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgiler.....	3
1.1.1 Testisin Anatomisi	3
1.1.2 Testisin Embriyolojisi	5
1.1.3 Testisin Histolojisi	7
1.2 Sisplatin	16
1.2.1 Sisplatin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri	17
1.2.2 Sisplatinin Toksik Etkisi.....	18
1.3 Antioksidanlar.....	19
1.3.1 Serbest Radikaller.....	19
1.3.2 Antioksidanların İşlevi	20
1.4 Krisin	21
1.4.1 Krisinin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri	21
1.4.2 Krisinin Etki Mekanizması.....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM	23
2.1 Etik Beyan	23
2.2 Deney Hayvanları	23
2.3 Kimyasallar.....	24
2.4 DeneySEL Tasarım	24
2.4.1 Deney Grupları	24
2.5 Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması.....	25
2.6 Histolojik Doku Takip İşlemleri ve Boyama.....	27
2.6.1 Histopatolojik İnceleme.....	27
2.6.2 İmmünohistokimya Boyama Metodu	29
2.7 Semen Analizi ve Johnsen Skorlama.....	31
2.7.1 Sperm Motilite Analizi	31
2.7.2 Johnsen Skorlama	32
2.8 Biyokimyasal Analiz	34
2.9 İstatistiksel Analiz	34
3. BULGULAR	35

3.1 Ağırlık Değişimlerinin Değerlendirilmesi	35
3.2 Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması	37
3.3 Motilite Analizi	39
3.3.1 İleri Hareketli Hücrelerin Motilite Analizi	39
3.3.2 Yerinde Hareketli Hücrelerin Motilite Analizi	41
3.3.3 Hareketsiz Hücrelerin Motilite Analizi	43
3.4 Biyokimyasal Bulgular	45
3.5 Histopatolojik Bulgular	51
3.6 İmmunohistokimyasal Bulgular	56
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	77



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Testis ve Genital Kanalların Gösterimi (Drake vd., 2009 alınarak düzenlenmiştir.).....	3
Şekil 1.2. Testis Embriyolojik Gelişim Aşamaları Diyagramı (Moore vd., 2016 alınarak düzenlenmiştir.).....	6
Şekil 1.3. Testis Dokusunda Seminifer Tübül Histolojisi.....	8
Şekil 1.4. Sertoli Hücresi ve Spermatogenik Seri Hücreleri.....	10
Şekil 1.5. Sperm Yapısına ait Genel Görünüm.....	11
Şekil 1.6. Spermatogenezin Genel Görünümü (Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014'ten alınarak düzenlenmiştir.).....	13
Şekil 1.7. Sisplatinin Moleküler Yapısı	17
Şekil 1.8. Serbest Radikaller ve Antioksidanların İşlevi	20
Şekil 1.9. Krisinin Moleküler Yapısı	21
Şekil 3.1. Ağırlık Değişimlerinin Dağılımı.....	36
Şekil 3.2. Johnsen Skorlaması Dağılımı	37
Şekil 3.3. İleri Hareketli Hücrelerin Dağılımı	39
Şekil 3.4. Yerinde Hareketli Hücrelerin Dağılımı	41
Şekil 3.5. Hareketsiz Hücrelerin Dağılımı	43
Şekil 3.6. Native Veri Düzeyleri.....	45
Şekil 3.7. Total Veri Düzeyleri.....	47
Şekil 3.8. Disülfid Veri Düzeyleri	48
Şekil 3.9. Index Veri Düzeyleri	49
Şekil 3.10. Kontrol grubu genel görünüm, H&E: X10.....	51
Şekil 3.11. Kontrol grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X20.....	51
Şekil 3.12. Sham grubu genel görünüm, H&E: X10	52
Şekil 3.13. Sham grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X20.....	52
Şekil 3.14. Sisplatin grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X10	53
Şekil 3.15. Sisplatin grubu genel görünüm, H&E: X20	53
Şekil 3.16. Krisin grubu genel görünüm, H&E: X10	54
Şekil 3.17. Krisin grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X20	54
Şekil 3.18. Sisplatin+Krisin grubu genel görünüm, H&E: X10	55
Şekil 3.19. Sisplatin+Krisin grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E:X2055	
Şekil 3.20. İmmun Boyama Skorlaması Veri Düzeyleri.....	56
Şekil 3.21. Kontrol grubu, Kaspaz-3: x20	57
Şekil 3.22. Kontrol grubu, Kaspaz-3: x40	57
Şekil 3.23. Sham grubu, Kaspaz-3: x20.....	58
Şekil 3.24. Sham grubu, Kaspaz-3: x40.....	58
Şekil 3.25. Sisplatin grubu, Kaspaz-3: x20.....	59
Şekil 3.26. Sisplatin grubu, Kaspaz-3: x40.....	59
Şekil 3.27. Krisin grubu, Kaspaz-3: x20.....	60
Şekil 3.28. Krisin grubu, Kaspaz-3: x40.....	60
Şekil 3.29. Sisplatin+Krisin grubu, Kaspaz-3: x20	61
Şekil 3.30. Sisplatin+Krisin grubu, Kaspaz-3: x40	61

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Doku Takip İşlemi	27
Tablo 2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	28
Tablo 2.3. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	30
Tablo 2.4. Johnsen Skoru	33
Tablo 3.1. Deney Gruplarında Ağırlık Değişimlerinin Karşılaştırmaları	35
Tablo 3.2. Johnsen Skorlaması Tanımlayıcı İstatistikleri	37
Tablo 3.3. İleri Hareketli Hücre Sayısının Tanımlayıcı İstatistikleri	39
Tablo 3.4. Yerde Hareketli Hücre Sayısının Tanımlayıcı İstatistikleri	41
Tablo 3.5. Hareketsiz Hücre Sayılarının Tanımlayıcı İstatistikleri	43
Tablo 3.6. Native Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri	45
Tablo 3.7. Total Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri	47
Tablo 3.8. Disülfid Bağı Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri	48
Tablo 3.9. İndeks-Tiyol Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri	49
Tablo 3.10. İmmun Boyama Skorlamasının Tanımlayıcı İstatistikleri	56

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 2.1. Çalışmada kullanılan Deney Hayvanları.....	23
Fotoğraf 2.2. Sakrifikasyon Öncesi Hazırlık	25
Fotoğraf 2.3. Sıçanlardan Alınan Dokular	25
Fotoğraf 2.4. Alınan Kan Örnekleri ve Santrifüj Cihazı.....	26
Fotoğraf 2.5. Makler Sperm Sayım Kamarası	31
Fotoğraf 2.6. Makler Kamarası ile Görüntülenen Semen Örneği, X10	32



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

CAT	: Katalaz
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin Kromojen
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H&E	: Hematoksilen-Eozin
HRP	: Horseradish Peroksidaz
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IHC	: İmmünohistokimya
IP	: Intraperitoneal
KR	: Krisin
KG	: Kilogram
MG	: Miligram
ML	: Mililitre
NAC	: N-Asetil Sistein
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SP	: Sisplatin
SRY	: Cinsiyet Belirleyici Bölge
TBF	: Testis Belirleyici Faktör

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesiyle desteğini gördüğüm değerli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Aslıhan ŞAYLAN'a çok teşekkür ederim.

Süreç boyunca bizlere yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Doç. Dr. Tülin FIRAT hocama teşekkür ederim.

Her zaman desteğini ve anlayışını bizlerden asla esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ömür Gülsüm DENİZ hocama teşekkür ederim.

Tezimin birçok aşamasında bana katkı sağlayan değerli hocalarım Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA'ya, Doç. Dr. Murat ALIŞIK'a ve Dr. Öğr. Üyesi Murat DIRAMALI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimin her aşamasında bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Sevdenur UZUN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman koşulsuz sevgi ve destekleriyle yanımda olan çok değerli aileme ve bu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (2023-TYL6.12.56-0015) destekleri için teşekkür ederim.

Atınç KALAYCI

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle başlayan ve dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bir hastalıktır (C. Kim & Kim, 2018).

Kanser, hücrelerin gereksiz ve kontrolsüz büyümesinden kaynaklanır. Pek çok farklı kanser türü vardır ve bunların hepsi anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), 2020 yılında kanser hastası sayısının 19,3 milyon olduğunu açıklamıştır. IARC bu sayının 2040 yılında 28,4 milyona ulaşmasının beklendiğini bildirmektedir (Sung vd., 2021). Kanser tedavisinde; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hormon tedavileri yer almaktadır (Sudhakar, 2009a).

Günümüzde geliştirilen kemoterapi ilaçları bu hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili olmakla birlikte kullanımları çeşitli yan etkilere neden olmaktadır. Sisplatin, çeşitli genitoüriner tümörleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir antitümör ajanıdır ve 1972'de Rosenberg ve Vancamp tarafından klinik kullanıma sunulmuştur (Simsek vd., 2016).

Sisplatin oldukça etkili bir kemoterapötik ajan olmasına rağmen, toksisitesi, özellikle nefrotoksosite ve testis hasarı, kullanımını sınırlamaktadır. Sisplatinin toksisitesinin nedeni reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıdır. ROS üretimi testis hücrelerine, özellikle de spermlere zarar verir. Çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşan sperm hücre zarının ana bileşeni ROS'a aşırı duyarlıdır. Bu nedenle ROS üretimi erkek kısırlığının ana nedenidir.

Kemoterapi ilaçlarının kullanımından kaynaklanan doku hasarını azaltmak için günümüzde en yaygın kullanılan tedavi antioksidanların kullanılmasıdır. Bu nedenle sisplatinin neden olduğu testis toksisitesinin antioksidanlar tarafından azaltılabileceğine inanılmaktadır (Yucel vd., 2019). Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemleridir (Karabulut & Gülay, 2016a).

Flovonoidler, meyve ve sebze gibi gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler çoğu gıdada bulunur, yüksek antioksidan özelliklere sahiptir ve çeşitli faydalar sunar. Krisin (5,7-dihidroksiflavon), geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan ve birçok bitki özü, bal ve propolisin içerisinde yer alan doğal bir flavonoid grubudur (Kucukler vd., 2021).

Krisin, yapısındaki hidroksil grupları sayesinde serbest radikalleri temizlemede etkilidir ve güçlü antioksidan özellikleriyle bilinmektedir (Aksu vd., 2018). Krisin ayrıca anti inflamatuvar, antikanser, antidiyabetik ve antiapoptotik etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik olarak aktif özelliklere sahiptir (Eldutar vd., 2017). Yararlı etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamış olsa da (Del Fabbro vd., 2019), krisinin erkek üreme sistemi üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu etkilerin serbest radikalleri yok etme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Krisin'in sisplatinin neden olduğu testis hasarı üzerinde olumlu bir etkisi olup olmadığına dair araştırma bilgisi mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışma, literatürdeki bilgileri genişletmek amacıyla sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarı üzerine krisinin etkisinin araştırılmasını amaçlamaktadır.

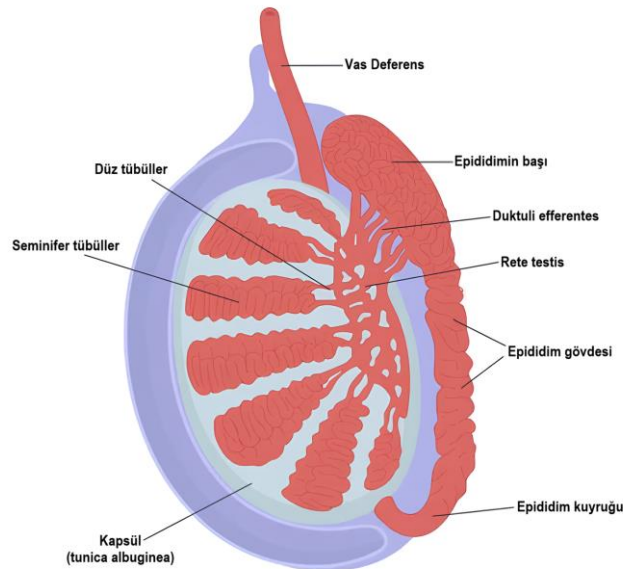
1.1 Genel Bilgiler

1.1.1 Testisin Anatomisi

Erkek üreme sistemi, bir çift testis, üreme kanalı, aksesuar bezi ve penisten oluşur. Testis erkeklerde üreme organı olarak görev alan iç genital organdır. Testosteron hormonu salgılanmasında görevli skrotumda bir çift şeklinde asılı olarak konumlanır. Testisler oval şekilde olup bir yetişkinde 4 ile 5 cm uzunluğa, 2 ile 2,5 cm genişliğe ve yaklaşık 3 cm kalınlığa sahiptir. Skrotum içinde testislerden biri diğerine oranla daha aşağı konumlanmıştır. (Arıncı & Elhan, 2020).

Testisler, tunica albuginea adı verilen yoğun bir bağ dokusu kılıf sistemi ile çevrilidir. Bu kılıf sistemi testisin arka kısmında kalınlaşır. Bu yapıya mediastinum testis ismi verilir. Bu bölge testis yapısının sinir ve kan damarlarının girip çıktığı yerdir. Tunika albugineaya giren bu çıkıntılar testisi lobül adı verilen parçalara böler. Bu parçalar yaklaşık 300-400 lobdan meydana gelir. (Caroppo, 2011).

Testisin her kısmı kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve başlangıçta kördür. Sperm üretiminin gerçekleştiği seminifer tübüller ve Leydig hücrelerini içeren bağ dokusundan oluşan bir stromadan oluşur.



Şekil 1.1. Testis ve Genital Kanalların Gösterimi (Drake vd., 2009 alınarak düzenlenmiştir.)

Testislerde yaklaşık 500-1000 seminifer tübül bulunur ve başlangıçta işlevsiz durumdadırlar. Tübüller sonlandık a lümenleri daralır ve düz tübüler yapılar veya rektal tübüller adı verilen kısa yapısal bölümler oluşturmak üzere birleşirler (Batislam & M. Murad, 2004).

Bu düz tübüller uçlara doğru seminifer tübülleri birbirine bağlar ve arka kısımda rete testisin oluşmasını sağlar. Rete testis yapısı epididimisin baş bölgesine 10-15 efferent yol ile bağlanan tek kanallı bir yapıdır (Arıncı & Elhan, 2020; Batislam & M. Murad, 2004).

Skrotumun içinde testisler neredeyse tamamen parietal peritondan kaynaklanan ve az miktarda viskoz sıvı içeren kapalı bir kese olan tunika vajinalis ile kaplıdır. Bu kese, her testisin  n yüzeyini ve yanlarını kaplar ve periton kesesi görevi görerek testis yüzeylerini yağlayarak sürtünmesiz harekete izin verir. Epididimis tek bir kalın spiral tüpten oluşur.    bölüme ayrılır: baş, gövde ve kuyruk (Batislam & M. Murad, 2004; Jones, 2023).

Baş: Epididimisin en proksimal kısmı. Spermi testislerden epididimise taşıyan testislerin efferent tübülleri tarafından oluşturur.

Gövde: Epididimis kanalının yoğun sarmal kısmıdır.

Kuyruk: Epididimisin en distal kısmıdır. Ejekülasyon için spermi üretraya taşıyan Vas Deferens'e açılır.

1.1.2 Testisin Embriyolojisi

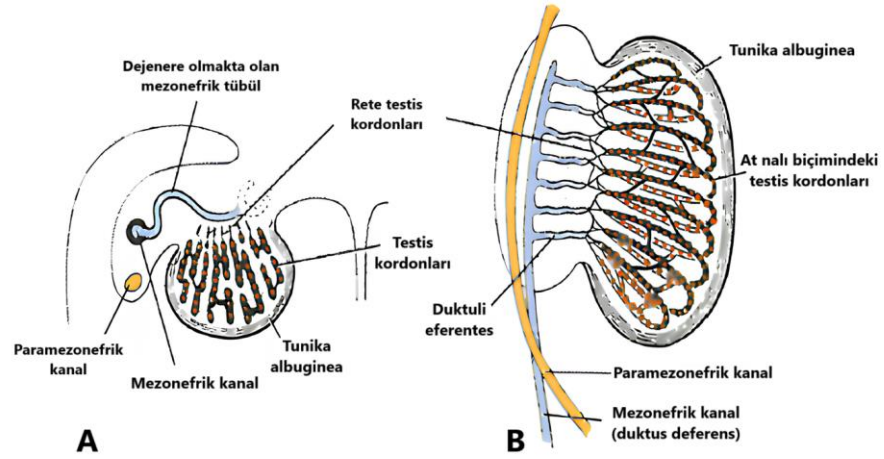
Embriyonun genetiği ikincil yumurtayı dölleyen spermin türüne bağlıdır. Krozomal ve genetik cinsiyet, X kromozomu içeren bir yumurtanın X veya Y kromozomu ile döllenişle belirlenir (Batislam & M. Murad, 2004).

Bu iki kromozom yapısı embriyonik yaşamın yedinci haftasına kadar benzerdir, embriyo yedinci haftaya kadar dişi veya erkek olarak ayırım göstermez. Cinsiyet, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yer alan SRY geninin varlığıyla belirlenir. Testis belirleyici faktör (TBF), testis tespiti için gerekli tek gen olan SRY'nin cinsiyet belirleyici bölgesi olarak bilinir. Bu genin yokluğunda embriyolar dişi yönünde gelişim gösterir (Moore vd., 2016).

SRY geni, testis farklılaşmasını uyaran SOX9 otozomal genini aktiveleştirir. SOX9 geni, Sertoli hücre farklılaşmasının destekleyici hücre progenitörlerinden başlatılması için gerekmektedir. SOX9 geni aktive edilmezse destek hücreleri foliküler hücrelere farklılaşır. Bu genler Sertoli hücrelerinin farklılaşmasında, stromal hücrelerin myoid hücrelere dönüşmesinde, Leydig hücrelerine farklılaşmasında ve testis kordonu oluşumunda rol oynar (Moore vd., 2016; Titi-Lartey & Khan, 2023).

SRY geninin etkisi altındaki cinsiyet kordonları testiküler veya meduller kordonlar oluşturacak şekilde çoğalır ve medullaya ilerler. Kordonlar bezin hilusuna geldiklerinde rete testisi oluşturmak için ağısı dağılım gösterirler. Gelişimin daha sonraki aşamalarında testis kordonu, yüzey epiteli ve testis arasındaki ilişki Tunika Albugineanın araya girmesiyle sonlanır (Moore vd., 2016).

Dördüncü ayda testis kordonu at nalı formunu alır ve bu at nalının ucu testis ağlarına doğru devam eder. Testis kordonlarının oluşumunu sertoli hücreleri destekler. Leydig hücreleri ise kordonların arasında yer alır ve kordonların ayırım göstermeye başlamasından sonra gelişmeye başlar (Titi-Lartey & Khan, 2023).



Şekil 1.2. Testis Embriolojik Gelişim Aşamaları Diyagramı (Moore vd., 2016 alınarak düzenlenmiştir.)

Gelişimin 8. haftasında Leydig hücreleri testosteron üretimine başlar. Testisler artık üreme sistemi ve dış cinsel organların cinsiyetini etkilemeye başlamıştır. 26. hafta embriyodaki büyüme, testislerin kasık kanallarına doğru ilerlemesini ve buradan skrotuma inışı başlatır. (Moore vd., 2016; Sadler, 2005).

Bu süreç gubernakulum ve androjenik hormonlar kontrolünde gerçekleşir. Peritonun parmak benzeri uzantısı olan prosesus vajinalis, fetal gelişim sırasında testisin aşağı inmesiyle ön karın duvarının katmanlarında yanına alarak skrotuma ulaşır. Testisler 2-3 gün içerisinde skrotuma tümüyle inmiş olur (Sadler, 2005).

Cinsel olgunluk evresi tamamlandıktan sonra testis kordonlarının lümenleri açılır ve seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer yapılar kanalize olduktan sonra rete testis tübülleri ile birleşip eferent tübüllere açılır. Bu kanallar mezonefrik sistemin gerisinde kalan boşaltım tübülleridir. Vas deferens adı verilen bu kanallar, rete testisi mezonefrik veya Wolffian kanallarına bağlar (Schoenwolf vd., 2015).

1.1.3 Testisin Histolojisi

Her testis, karın boşluğundan dışarı doğru uzanan bir kese içinde konumlanır. Bu boşluk, peritonun geri kalanı gibi, fibröz bağ dokusu tarafından desteklenen mezotelyal hücrelerden oluşan bir seroza ile kaplıdır.

Testislerin etrafındaki paryetal peritona tunika vajinalis, visseral peritona ise tunika albuginea adı verilir. Her iki kapsül de mezotelyal yüzeye sahip fibröz bağ dokusundan oluşur. Tunika albugineanın kalınlaşmış arka kısmına mediasten denir ve testisleri besleyen kan damarlarını, lenf damarlarını, sinirleri ve kanalları kapsar. Fibröz septum, mediastenden testis gövdesinin sınırına kadar yayılır (Milikowski & Berman, 1997).

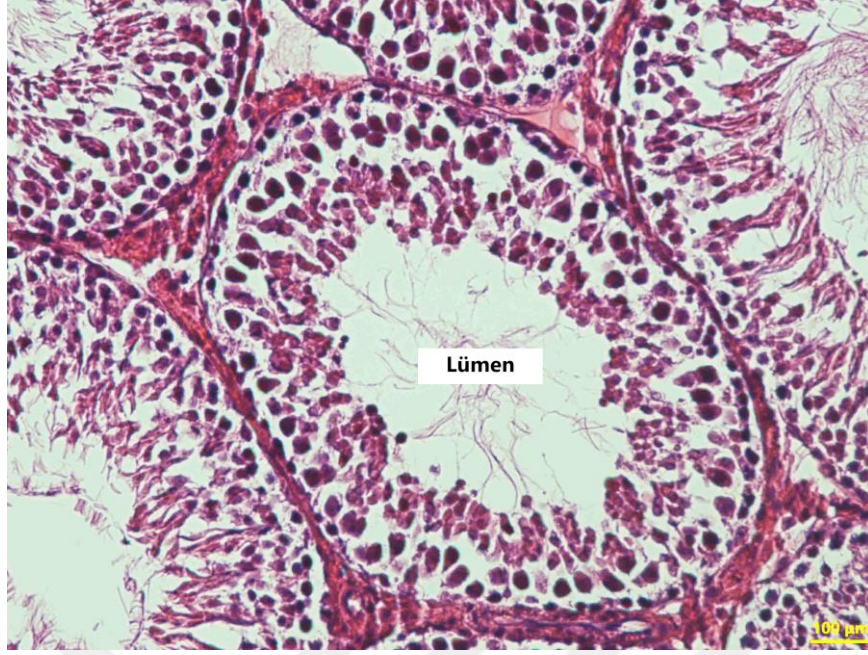
Ayrıca adrenal korteks ve erkek eşey hücreleri tarafından androjen salgılanır. Bu yapılar spermatogenezi, cinsel farklılaşmanın oluşumunu ve gonadotropinlerin salgılanmasını kontrol eder.

1.1.3.1 Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, tunika propriya ile çevrelenmiş epitelden oluşur. Seminifer epitel, iki temel hücre popülasyonundan türeyen karmaşık ve çok katmanlı farklı bir epitelidir.

Bu iki temel hücre, destek hücresi olarak da bilinen sertoli hücreleri ve periyodik olarak çoğalıp olgun spermatozoaya farklılaşan spermatogenik seri hücrelerdir (Ross & Pawlina, 2014).

Tübüller ince bir kontraktil miyoid hücre tabakasıyla çevrilidir. Tipik bir ekzokrin bezin tübüllerinden farklı olarak, her bir seminifer tübül, uçları rete testise açılan yaklaşık 1 metre uzunluğunda kıvrılmış sıkı bir halka oluşturur (Ross & Pawlina, 2014).



Şekil 1.3. Testis Dokusunda Seminifer Tübül Histolojisi

1.1.3.2 Sertoli Hücreleri

Destek hücreleri olarak adlandırılırlar. Bu hücreler basit, uzun ve silindirik bir epitel yapısı şekillendirir. Her Sertoli hücresi bazal membran üzerinde bulunur ve lümene doğru uzanır. Sertoli hücreleri, germ hücrelerinin gametogenezin temel üreme fonksiyonunu gerçekleştirebileceği bir ortam yaratır. Komşu Sertoli hücrelerinin tabanına yakın hücreler arası bağlantılar kan-testis bariyerini kurar. Spermatogonia bu bariyerin kan tarafındadır. Bu hücreler mitoz başladığında spermatositlerin bir bariyerden geçmesi gerekir. Bu yüzden spermatogenez esnasında bu bariyer sürekli olarak yenilenir (Mescher, 2018).

Erişkin testislerde Sertoli hücre çekirdekleri, mayoz ve olgunlaşmanın çeşitli aşamalarındaki çok sayıdaki germ hücre çekirdekleri arasında genellikle göze çarpmaz. Bununla birlikte, Sertoli hücre çekirdeği, uzun ve silindirik biçimdeki epitelin tipik çekirdeği olarak kolayca tanınır (oval, ökromatik bir çekirdek, belirgin bir nükleolus). Sertoli hücrelerinin sitoplazması, mayozun farklı aşamalarında germ hücrelerini saran karmaşık bir şekil alır (King, 2023; Young vd., 2014).

Mitoz yoluyla spermatogoniadan oluşan primer spermatositler, epitel tabanından uzağa göç eder ve Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarla bazal yüzeyden ayrılır. Sertoli hücreleri antijenik olarak yabancı olan haploid germ

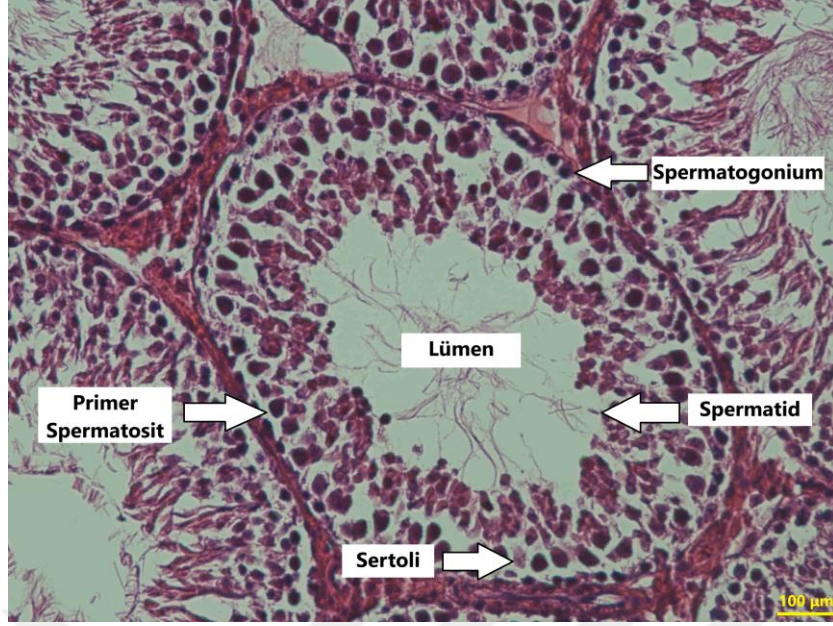
hücrelerini dolaşımdaki antikorlardan ayırma yetkisine sahiptir. Mayoz bölünme ile; oluşan germ hücreleri sertoli hücrelerinin sitoplazmik ceplerinde yerleşik kalır. Sertoli hücrelerinin spesifik fonksiyonları arasında besleme desteği, spermatidlerden arta kalan kalıntıların fagositozu ve sertoli salgılanması bulunur (King, 2023; Young vd., 2014).

1.1.3.3 Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler, düzenli olarak çoğalan ve olgun spermlere farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, gonadların yolk kesesinden çıkan ilkel germ hücrelerinden t rer ve testis gelişiminin erken aşamalarında genital sırtta toplanır. Sertoli hücreleri arasında gelişim ilerledikçe spermatogenik hücreler belirsiz katmanlar şeklinde yapılır.

Spermatogonia adı verilen en olgunlaşmamış spermatogenik hücre yapıları bazal tabakada bulunur. Tunika propria tipik fibroblast içermeyen çok katmanlı bağ dokusu yapısına sahiptir. Tunika propria, insan seminifer tübüllerinin bazal tabakasının dışında yer alan miyoid hücreden ve kollajen fibrillerden oluşur. Miyoid hücreleri, bir bazal katman ve bol miktarda aktin filamentleri içermeleri bakımından düz kas hücrelerine özgü özelliklere sahiptir. Bu hücrelerde önemli miktarda granüllü endoplazmik retikulum (GER) bulunmaktadır. Bunun sebebi, fibroblastların yokluğunda kollajen sentezinden sorumlu olmalarındandır (Kierszenbaum, 2020).

Miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları, sperm ve testis sıvısının seminifer tübüllerden duktal sisteme ilerleyişini kolaylaştıran peristaltik dalgalanmalara neden olur. Miyoid tabakanın dışında kan damarları, ortak lenfatik damarlar ve Leydig hücreleri bulunur. Yaşlanmanın normal bir sonucu olarak tunika proprianın kalınlığı artar. Bu kalınlaşmaya spermatogenez oranında bir azalma ve seminifer tübüllerin genel ölçeğinde bir küçülme eşlik eder (Kızılay & Altay, 2019).



Şekil 1.4. Sertoli Hücresi ve Spermatogenik Seri Hücreleri

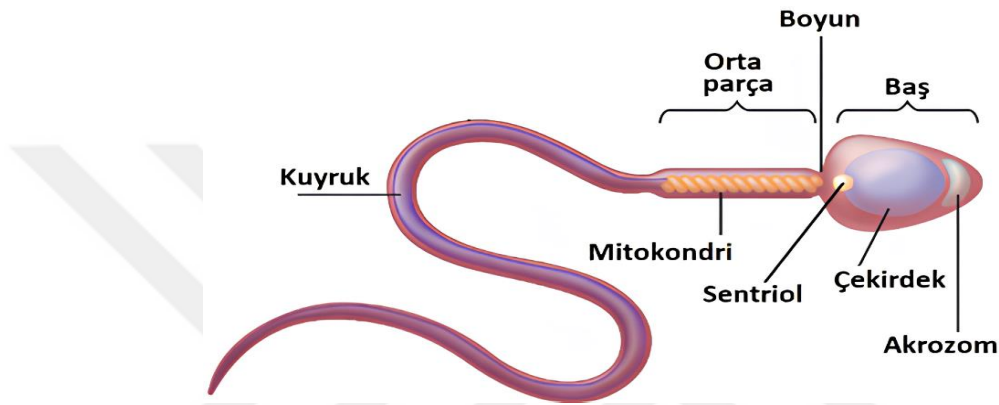
1.1.3.4 Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri genellikle lipid damlacıkları içeren oval veya yuvarlak şekilli olarak gözükten eozinofilik hücrelerdir. Bu hücreler genellikle karakteristik çubuk şekilli sitoplazmik kristaller olan lipofuscin pigmenti ve Reinke kristallerini içerir. Diğer steroid salgılayan hücreler gibi Leydig hücrelerinde de fazlaca granülsüz endoplazmik retikulum bulunur (King, 2023; Young vd., 2014).

Bu özellikleri eozinofilik yapılarının nedenidir. Fetal yaşamın erken döneminde farklılaşırlar ve testosteron salgırlar. Testosteron cinsel olgunlaşma, embriyonik gelişim ve üreme için gereklidir. Puberte döneminde testosteron salgılanması, sperm üretiminin başlatılmasında, yardımcı bezlerin salgılanmasında ve sekonder seks karakter özelliklerinin şekillenmesinde rol oynar. Yetişkinlerde spermatogenez, üreme sistemi ve yardımcı bezlerin bakımı için testosteron salgılanması gereklidir (King, 2023; Young vd., 2014).

1.1.3.5 Spermin Yapısı

Olgun sperm hücrelerinin oluşumu spermatojenik sürecin sonunda gerçekleşir. Bu süreç seminifer tübüllerde başlar ve sperm hücrelerinin tamamen farklılaşıp olgun yapılara dönüşmesiyle sona erer. Olgun bir sperm yaklaşık 60 µm uzunlukta olup baş, orta ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Her parçanın kendine özgü işlev ve özellikleri barındırır. Bu süreç yaklaşık 64 ila 74 gün sürer ve erkeklerde periyodik olarak tekrarlanır (Satar & Gençdal, 2013).



Şekil 1.5. Sperm Yapısına ait Genel Görünüm

Spermin Bölümleri:

1) Baş: Bu kısımda genetik materyali taşıyan nükleer bir yapı bulunur. Baş kısmı oval ve yassı tipte olup yaklaşık 4,5 µm uzunluğundadır. Akrozom adı verilen organellerle kaplıdır. Akrozom, sperm hücresinin yumurta hücresine ulaşması için gerekli enzimleri içerir. Bu enzimler yumurtanın koruyucu zarından geçerek döllenmeyi sağlar. Baş bölümünde spermin genetik bilgisini de içeren hücre çekirdeği bulunur. Sperm başının içeriği, spermin genetik yükünü taşıyan, kromatin ile sıkı bir şekilde paketlenmiş DNA'dan oluşur (Kierszenbaum, 2020).

Akrozom: Akrozom, başın ön kısmında protein içeren bir yapıdır. Sperm yumurtaya yaklaştığında akrozomdaki enzimler yumurtanın dış zarını (zona pellucida) çözerek döllenmeyi sağlar.

Çekirdek: Baş kısmında bulunur ve yoğun bir şekilde paketlenmiş sperm DNA'sı içerir. Sperm çekirdeğinde yalnızca 23 kromozom bulunur. Bu, erkek gamet ile dişi gamet birleştiğinde 46 kromozomlu bir zigot oluşturduğu anlamına gelir.

Ayrıca spermin bir boyun bölgesi bulunmaktadır. Boyun; baş ve kuyruk arasında bağlantıyı sağlayan bir çift sentriyolden oluşmaktadır. Boyun bölümü sperm sağlığı açısından önemlidir. Burada meydana gelebilecek bir bozulma hem morfolojik açıdan hem de fonksiyonel açıdan spermi etkilemektedir.

2) Orta kısım (gövde): Bu bölüm ise spermin başı ile kuyruğu arasında yer alır ve yoğun bir mitokondri bölgesi içerir. Bu bölgedeki mitokondri spermin hareketi için lazım olan enerjiyi sağlar.

Yaklaşık olarak 7 µm uzunluğundadır. Orta kısım spermin hareket etmeye devam etmesi için gerekli ATP'yi sağlar. Enerji, sperm hareketliliği için gerekli olan mitokondriyal oksidatif fosforilasyon tarafından üretilir (Bulduk & Cengiz, 2015).

3) Kuyruk (kamçı): Sperm kuyruğu sperm hareketliliğini sağlayan ana yapıdır. Kuyruk mikrotübüllerden oluşan flagellar bir yapıya sahiptir. Yaklaşık olarak 50 µm uzunluğundadır. Bu yapı hareket için gerekli dalgaları yaratır. Kuyruğun hareketi, hücre gövdesinin mitokondriden aldığı enerjiyi kullanarak ileri doğru hareket etmesini sağlar (Bulduk & Cengiz, 2015).

Kuyruk yapısı baş enerjisini sperm hücrelerine aktarır ve ortamda hareket etmek için gerekli biyomekanik fonksiyonları sağlar. Sperm hücresinin kuyruğu sperm hareketliliğini belirleyen önemli bir yapıdır.

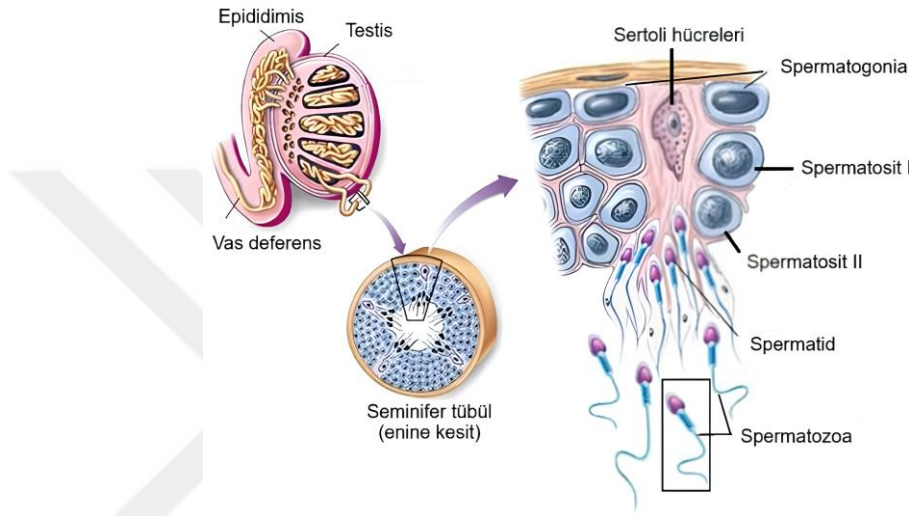
1.1.3.6 Spermatogenez

Spermatogonia'nın spermatozoaya dönüşmesini sağlayan tüm hücresel değişiklikleri içeren sürece spermatogenez denir. Ergenlikten kısa bir süre önce başlar ve yaşam boyu devam eder. Spermatogenez üç aşamaya ayrılır (Kızılay & Altay, 2019).

1.Spermatogoniyal aşama: Bu, spermatogonianın bölünerek kendini yenilemesi ve ardından primer spermatositlere farklılaşmasıdır.

2.Mayoz veya spermatosit aşaması: Primer spermatositler, ikinci mayoz bölünme sırasında hem kromozom sayısını hem de DNA miktarını yarıya indirerek haploid spermatositleri oluşturur.

3.Spermatid aşaması: Sperm hücrelerinin şekil değiştirip olgun spermatozoaya dönüştüğü aşamayı tanımlar. Spermatogenez sonucu sperm hücreleri son olgunluk durumuna ulaşır.



Şekil 1.6. Spermatogenezin Genel Görünümü (Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014'ten alınarak düzenlenmiştir.)

1.1.3.7 Spermatogoniyal aşama

Spermatogenezin başlangıç aşamasıdır ve üreme hücresi olan sperm hücrelerinin temelini oluşturur. Bu aşamada testislerde bulunan seminifer tübüllerin bazal tabakasında gerçekleşir ve spermatogonia ismi verilen hücrelerin çoğalıp farklılaşmasıyla karakterizedir. Ayrıca sperm hücrelerinin ve germ hücre havuzlarının sürekli üretimi burada sağlanır (Cheng & Mruk, 2010).

Spermatogonia genellikle iki farklı tipte sınıflandırılır. Bunlar A tipi spermatogonia ve B tipi spermatogonia olup, A tipi spermatogonia kendini yenileyen kök hücrelerdir ve B tipi spermatogoniaya farklılaşabilmektedir. B tipi spermatogonia ise spermatositlere farklılaşma yeteneğine sahiptir (Cheng & Mruk, 2010).

Tip A ve Tip B Spermatogoniyal kök hücreler birden fazla mitotik bölünmeye uğradığı için farklı nükleer görünüme sahiptirler. Görünümleri genel olarak 3 şekle ayrılır (Cheng & Mruk, 2010; Kızılay & Altay, 2019).

- 1) **Koyu tip A spermatogonia**, ince granüler kromatin ve oldukça bazofilik, oval şekilli çekirdeklere sahip bir hücredir. Seminifer epitelin kök hücreleri olan bu hücreler, düzensiz döngülerde mitozla çoğalarak koyu tip A spermatogonia çiftleri ve açık tip A spermatogonia çiftlerini oluşturur.
- 2) **Açık tip A spermatogonia**, ince granüler kromatin ve oval çekirdeğe sahip, parlak renkli hücrelerdir. Bu spermatogonia, sperm üretmek için farklılaşma sürecinde önemli rol oynar. Art arda birkaç mitoz geçirerek sayısını artırır.
- 3) **B tipi spermatogonia**, merkezinde bir nükleolus ve çevresinde yoğunlaştırılmış kromatin bulunan yuvarlak çekirdeğe sahip hücrelerdir. Bu spermatogonial sürecin aşamasının son aşamasıdır.

1.1.3.8 Spermatozit aşaması

Spermatogoniumlardan oluşan primer spermatozitten (haploid kromozomlu) birinci mayoz bölünmeyi tamamladıktan sonra iki sekonder spermatozit (diploid kromozomlu) meydana gelir.

Sekonder spermatozitlerden ise mayoz bölünmenin ikinci bölünmesinin tamamlanmasıyla birlikte sekonder spermatozitlerden spermatidler gelişir. Dolayısıyla oluşan hücreler haploid sayıda kromozoma ve haploid DNA içeriğine sahiptir. Bu, döllenme sırasında oluşan yeni zigotta türe özgü sayıda kromozomun korunmasını sağlar (Griswold, 2016).

1.1.3.9 Spermatid aşaması

Bu aşamada sperm hücreleri, olgun spermatozoaya farklılaşırken kapsamlı bir yeniden yapılanmaya uğrar. Bu farklılaşma sürecine spermiyogenez denir. Dört aşamadan oluşmaktadır (Cheng & Mruk, 2010; Griswold, 2016).

Golgi aşaması: Spermatidlerde bulunan çok sayıda golgi kompleksi tarafından bir araya getirilen proakrozomal granüller, akrozomal keseciği oluşturmak üzere bir araya gelir. Akrozomal vezikül, nükleer membrana bitişik ve membranla kaplı bir yapıda bulunmaktadır. Konumu spermin ön kutbunu belirler. Bu süre zarfında akrozomal vezikülün içeriği artar ve genişler. Sentioller, sperm hücresinin arka kutbuna doğru hareket eder ve sperm kuyruğu aksonunun yapımı başlar.

Kep aşaması: Bu süre zarfında akrozomal kesecik hücre çekirdeğinin ön yarısına yayılır. Bu yeniden düzenlenmiş yapıya akrozomal başlık adı verilir. Akrozomal başlığın altındaki nükleer zarf gözeneklerini kaybeder ve kalınlaşır. Bu dönemde çekirdek içeriği de artacaktır.

Akrozom aşaması: Bu aşamada sperm hücreleri yeniden düzenlenir. Baş, Sertoli hücrelerine derin bir şekilde sabitlenmiştir, ancak gelişen kamçı, seminifer tübüllerin lümenine kadar uzanır. Spermatidin yoğunlaşmış çekirdeği düzleşir ve uzar. Çekirdek ve çevresindeki akrozom, hücre zarının ön kısmına bitişik bir konuma hareket eder ve sitoplazma arkaya doğru hareket eder. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kısmından spermatidlerin arka kutbuna kadar uzanan bir bölüm oluşturur.

Kamçının oluşumunu başlatan merkezci kısımdan geriye doğru, hücre çekirdeğinin arkasına doğru hareket eder. Bağlantı bölgeleri veya boyun bölgeleri adı verilen yapıları oluşturacak şekilde değiştirilirler. Hücre zarı büyüyen kamçıyı çevrelemek için geriye doğru hareket ettikçe arka kutupta oluşan bölüm kaybolur. Mitokondri göç eder ve boyun bölgesinin hemen arkasında sıkı bir spiral kılıf oluşturur. Bu bölge sperm kuyruğunun orta kısmını oluşturur. Ana kısım orta kısımdan uzakta bulunur. En distaldeki kısa segment son kısmı oluşturur.

Olgunlaşma aşaması: Bu son aşamada kamçıları çevreleyen fazla sitoplazma uzaklaştırılır ve olgun spermatozoa oluşturulur. Bu yapılara kalıntı adı verilir ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Sperm hücreleri artık birbirlerine bağlı değildir çünkü hücreler arası köprüler kalıntıda kalır. Olgunlaşma aşamasının sonuna doğru, sertoli hücrelerinden seminifer tübüllerin lümenine uzamış spermatidler salınır. Bu sürece spermiyasyon denir.

1.2 Sisplatin

Sisplatin, 1845'te Michele Peyrone tarafından keşfedilen ve kimyasal yapısı 1893'te Alfred Werner tarafından açığa kavuşturulmuş ilk metal bazlı kemoterapi ilaçlarından biridir (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

Sisplatinin klinik araştırmalara dahil edilmesi, Ulusal Kanser Enstitüsü'nün ilaç geliştirme programı kapsamında incelendiğinde deneysel tümör modellerinde etkili olduğunun gözlemlenmesiydi. Bu araştırma sonucunda sisplatin, klinik deneyler için geliştirildi ve Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yeni bir ilaç uygulamasının temel unsuru haline geldi.

Sisplatin yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Nefrotoksisite ve ototoksisitenin doz sınırlamaları bulunmaktadır. Nörotoksisite, kardiyotoksisite, miyelosupresyon ve gonadotoksisite gibi yan etkiler klinik olarak da önemlidir. Aktif oksijen türleri sisplatinin metabolizması yoluyla üretilir. Metabolitlerinin doku hasarına neden olduğu düşünülmektedir (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

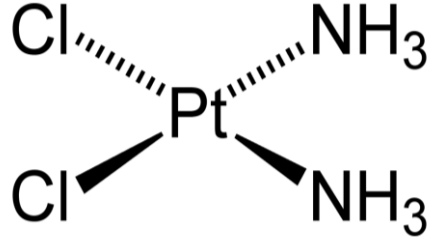
Sisplatin kanser hücrelerinde DNA hasarına sebep olur. Hücresel plazmaya girdiğinde su molekülleri ve klor atomları yer değişimi göstererek aktif hale gelir. Aktivasyon sonrası DNA'ya bağlanma gerçekleşir ve bu bağlanmanın antitümör özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (Carter & Goldsmith, 1974; Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

Genomik DNA'ya bağlanmasıyla oluşan hasarın; replikasyonu veya transkripsiyonu etkilediği düşünülmektedir. Bu bozulmaların kanser hücresi ölümüne yol açtığı ve sitotoksik olayları tetiklediği vurgulanmıştır (Carter & Goldsmith, 1974).

Gametlerde sisplatin kaynaklı gonadotoksisiteden sorumlu yapılar tam olarak açıklanamamaktadır. Çalışmalarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) arttığı, antioksidanların ise azaldığı gözlemlenmiştir (Fouad vd., 2017).

1.2.1 Sisplatin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri

Sisplatin, cis-diamindikloroplatin olarak adlandırılan, diamindikloroplatinin inorganik bir bileşiğidir ve yapısında suda çözünebilen platin içerir. İki değerlikli merkezi bir atom, iki klor bağı ve iki amonyum bağı kimyasal bileşenleri oluşturmaktadır (Cırık, 2022; Fouad vd., 2017).



Şekil 1.7. Sisplatinin Moleküler Yapısı

Sisplatin uzun süredir kanser tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır fakat biyokimyasal etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Sitotoksik özellikleri, nükleer DNA'ya bağlanarak transkripsiyona ve DNA replikasyonuna müdahale etmesiyle ilişkilidir. Ayrıca etkilerini çeşitli sinyal iletim yollarını aktif ederek gösterdiği düşünülmektedir (Cırık, 2022; Kelland, 2007).

Testis germinal epitel hücreleri, yüksek mitotik aktiviteleri sebebiyle sitotoksik kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlıdır. Hematolojik kötü huylu tümörlerin tedavisi sırasında gonadal fonksiyona, hastanın yaşına, doza ve kullanılan ilacın türüne göre değişiklik göstermektedir. (Dilek, 2010; Kelland, 2007).

Kemoterapötik ajanlar gonadal hormonların kaybına, germ hücrelerinde mutajenik değişikliklere ve fetüs üzerinde doğumsal anomalilere neden olabilir. Gonadları en çok baskılayan bu ilaçlar arasında alkile ediciler ve sisplatin bulunmaktadır. Farklı derecelerde bu kombinasyonlar gonadal toksisiteye neden olabilir. Ayrıca yüksek dozlarda sisplatin kullanımı infertiliteye yol açabilir (Dilek, 2010).

1.2.2 Sisplatinin Toksik Etkisi

Sisplatin yumurtalık ve testis kanseri tedavisinde çok başarılı olmasına rağmen birçok toksik yan etkiye de sahiptir. Bu yan etkilerin nedenlerinden biri aşırı dozdur. Sisplatin tedavisinin ana yan etkileri ototoksisite, nefrotoksisite, gastrointestinal toksisite ve hepatotoksisitedir (Astolfi vd., 2013).

Gerçekleştirilen bir araştırmada sisplatine maruz kalmanın, insan fetüslerinin testislerindeki toplam germ hücresi sayısını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Başlangıçta germ hücrelerinin kaybı ve ardından spermatogonyumda önemli bir azalma rapor edilmiştir. Sisplatine maruz kalma, puberte öncesi insan testis dokusundaki toplam germ hücre sayılarında benzer semptomlara neden olmuş ve pediatrik kanser hastalarıyla doğrudan ilişkilendirilmiştir (Tharmalingam vd., 2020).

1.3 Antioksidanlar

Vücutta reaktif oksijen türlerinin üretimini engelleyen, bu maddelerin zarar vermesini önleyen ve detoksifikasyonu sağlayan savunma sistemlerine "antioksidan savunma sistemleri" veya "antioksidanlar" denir (Çavdar vd., 1997; Şener & Yeğen, 2009). Antioksidanların rolleri serbest radikalleri etkisizleştirmek ve toksik etkilerine karşı koruma sağlamaktır.

Antioksidanların oluşturduğu savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan olarak gruplandırılmıştır. SOD, CAT, GPx ve GST'nin görev aldığı savunma sistemi enzimatik olarak adlandırılır. Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E ve Folik asit gibi ürünlerle gerçekleştirilen savunma ise enzimatik olmayan olarak adlandırılır (Aslankoç vd., 2019).

1.3.1 Serbest Radikaller

Serbest radikaller, elektron fazlalığı veya eksikliği nedeniyle elektriksel olarak yüklenen kimyasal olarak aktif atomlar veya moleküllerdir. Yapılarında aktif oksijen içerirler (Valko vd., 2006).

Bunlar, hidrojen peroksit, alkoksitler ve ozon gibi eşleşmemiş elektronları olmayan oksijen türevlerinin yanı sıra hidroksil, peroksil, alkoksil, nitrik oksit, nitrojen trioksit ve süperoksit radikallerini de barındırır (Valko vd., 2006) .

Bağışıklık sistemine dahil edilen mekanizmalardan biri serbest radikallerin üretilmesidir. Bu durum vücudun içindeki ve dışındaki faktörlerden kaynaklanır. Serbest radikaller ayrıca sigara, alkol, röntgen, güneş ışığı ve kirlilik gibi dış çevresel faktörlerin etkisi altında da ortaya çıkabilir.

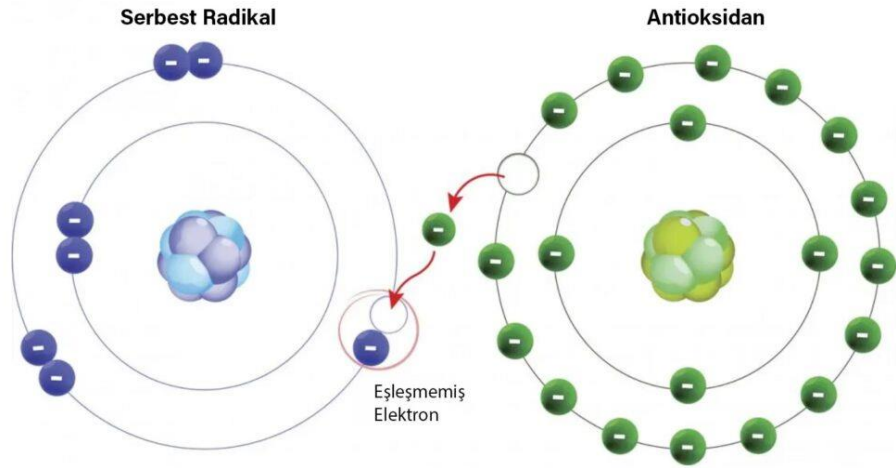
Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronu kararlı bir yapıya taşımak için başka bir elektron ararlar. Bu nedenle serbest radikallerin kimyasal aktivite potansiyeli yüksektir. Oluşabilecek kimyasal aktivite hücrelere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilir (Karabulut & Gülay, 2016b).

1.3.2 Antioksidanların İşlevi

Antioksidan; serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyon süreçlerini önler. Bu süre zarfında kendilerini oksitlerler. Bu özellikler hücrelerin anormal hale gelmesini sonuçta tümör oluşturmamasını ve hücre tahribatını azaltır. Yaşlanmanın etkilerini en aza indirirken potansiyel olarak insanların daha sağlıklı bir yaşam sürdürmesine olanak tanımaktadır (Deng vd., 2011).

Doğal antioksidanlar bitki ve hayvan dokularında bulunan ekstrakte edilebilir bileşiklerdir. Endojen antioksidanların yetersiz olduğu durumlarda vücudun eksojen antioksidanlarla desteklenmesi oksidatif stresin oluşmasını önler. Serbest radikal düzeyiyle doğrudan ilişkili olan hastalıkların önlenmesi için oksidantların ve antioksidanların dengede olması gerekir (Öğüt, 2014).

Oluşabilecek dengesizlik gastrointestinal hastalıklardan infertiliteye, kardiyovasküler hastalıklardan solunum ve boşaltım sistemi bozukluklarına kadar pek çok hastalığa yatkınlığı arttırabilir (Calogero vd., 2017).



Şekil 1.8. Serbest Radikaller ve Antioksidanların İşlevi

1.4 Krisin

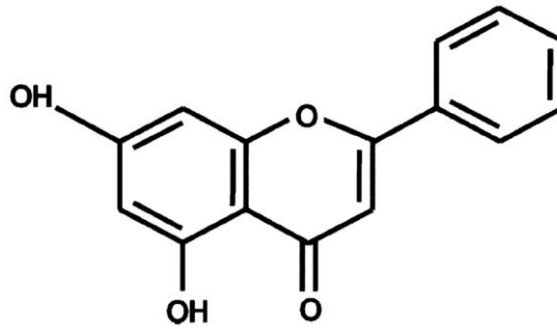
Krisin, propolis, bal ve bazı bitkilerde bulunan bir bitki bileşiği olan bir flavonoiddir. Krisin'in antioksidan, antiinflamatuvar, östrojenik, antikanser ve sinir sistemine etkileri dahil olmak üzere birçok biyolojik etkisi vardır. Krisinin bu etkileri hücre içi sinyal yollarını ve gen ifadesini düzenleyerek gösterir. Örneğin, krisin'in antioksidan özellikleri serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak hücre hasarını önlemeye yardımcı olabilir (Naz vd., 2019).

Ayrıca, KR'nin anti-inflamatuvar etkileri, inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak ve inflamasyonla ilişkili enzimleri inhibe ederek ortaya çıkar. Östrojenik özellikleri östrojen reseptörleri ile etkileşimde bulunarak hormonal dengenin düzenlenmesine yardımcı olur (Naz vd., 2019).

Bazı çalışmalar, KR'nin kanser hücresi çoğalmasını durdurabileceğini ve apoptozu destekleyebileceğini öne sürmektedir. Yararlı etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır.

1.4.1 Krisinin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri

Krisin, çeşitli bitkilerde doğal olarak oluşan bir flavonoid bileşiğidir. Kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_4$ 'tür. Flavonoidler genellikle bitkilerin çiçeklerinde, yapraklarında ve meyvelerinde bulunur. Krisin özellikle mavi çiçekli yasemin (*Passiflora caerulea*) gibi bitkilerde mevcuttur. Bu bileşiğin moleküler yapısı, bir fenilbenzoil grubu ($C_6H_5COC_6H_5O-$) aracılığıyla bağlanan iki fenil halkasından birleşimiyle oluşur (Mani & Natesan, 2018).



Şekil 1.9. Krisinin Moleküler Yapısı

1.4.2 Krisinin Etki Mekanizması

Krisinin antioksidan etkileri, hücre içi antioksidan enzimlerin aktivasyonunun arttırılmasından ve oksidatif stresin neden olduğu serbest radikallerin nötralize edilmesinden kaynaklanmaktadır. Antiinflamatuvar etkileri, proinflamatuvar sitokinlerin (interlökin-6 ve tümör nekroz faktörü alfa gibi) salınımını azaltarak ve NF-kB sinyal yolunu inhibe ederek oluşmaktadır. Östrojenik etkisinin, krisinin östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen aktivitesini modüle etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Küçükler vd., 2020).

Antikanser etkisi, krisinin kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemesi ve hücre döngüsünü durdurması yoluyla ortaya çıkabilir. Bu mekanizmaların dışında krisinin sinir sistemi üzerindeki etkilerinin de GABA reseptörlerinin modülasyonu ve serotonin ve dopamin düzeylerine olan etkileriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Küçükler vd., 2020).

Hormon düzenleme mekanizması ile testosteron düzeylerini artırabileceği öne sürülmektedir. Testosteronun erkek üreme fonksiyonu üzerinde önemli bir etkisi vardır ve normal sperm üretimi için gereklidir. Krisin'in testosteron üretimini artırarak spermatogenezi teşvik ettiği gözlemlenmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile Sisplatin'in testis dokusunda oluşturduğu hasarın üzerinde Krisin antioksidanının muhtemel koruyucu etkilerinin araştırılması hedeflendi. Olumlu sonuçların geliştirilmesi sisplatin hasarı ve krisin antioksidanının kullanımı açısından klinikte yeni yaklaşımları ortaya çıkaracaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Etik Beyan

Bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2023/12) ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi tarafından 2023-TYL6.12.56-0015 proje koduyla finanse edilmiştir.

2.2 Deney Hayvanları

Çalışma kapsamındaki sıçanlar BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışma, her biri 200-250 gram Wistar albino cinsi 2-4 aylık erkek sıçanlar üzerinde deneysel olarak yapıldı.

Hayvanlar çalışma başlayıncaya kadar ve çalışma süresince BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, gruplar halinde, sabit bir sıcaklık ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) ve nemi ($\% 55 \pm 15$) bulunan bir ortamda tutuldu. Sıçanların, deneyden önce standart sıçan yemi ve suyu serbestçe erişmelerine izin verildi.



Fotoğraf 2.1. Çalışmada kullanılan Deney Hayvanları

2.3 Kimyasallar

Deney esnasında gerekli olan kimyasallar Cayman Chemical firmasından tedarik edildi. Sisplatin için Cisplatin 50 mg (13119, Cayman) ticari ürün kullanıldı. Krisin için Chyrsin 5g (17402, Cayman) ticari ürün kullanıldı.

Sisplatin her bir denek için 7 mg/kg/gün doz olacak şekilde IP olarak uygulandı. Krisin ise 50 mg/kg/gün olacak şekilde oral gavaj yoluyla gruplara göre deney hayvanlarına verildi.

2.4 DeneySEL Tasarım

Deneyde kullanılan sıçanlar, rastgele örnekleme yöntemi kullanılarak seçildi ve her grupta 8 adet erkek sıçan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Toplamda 40 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı.

2.4.1 Deney Grupları

Grup 1 (Kontrol grubu): Herhangi bir işlem uygulanmadı.

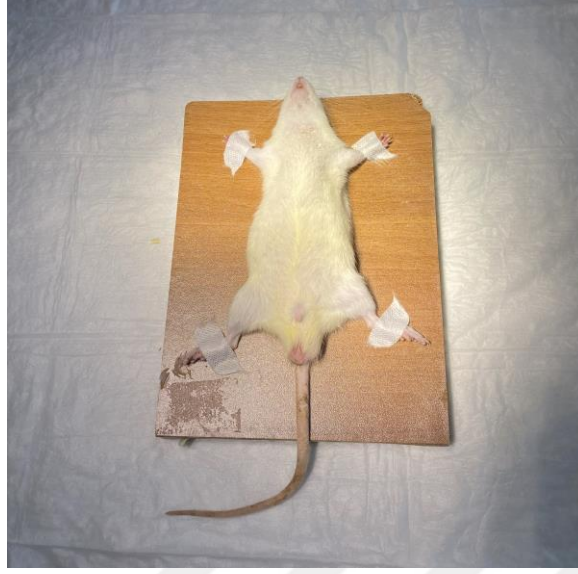
Grup 2 Mısır yağı (Çözücü): 7 günlük deney süresi boyunca her gün 1 ml dozunda mısır yağı oral olarak uygulandı.

Grup 3 (Sisplatin): Deneyin ilk günü 7 mg/kg sisplatin tek doz IP olarak uygulandı. Sisplatin dozu ve uygulama zamanları için Sherif ve ark. (Sherif vd., 2014) çalışması referans alındı.

Grup 4 (Krisin): Deneyden 2 gün önce başlamak üzere mısır yağı içinde çözülmüş 50 mg/kg dozunda Krisin toplamda 9 gün boyunca oral olarak uygulandı. Krisin dozu ve uygulama zamanları için Aksu ve ark. (Aksu vd., 2018) çalışması referans alındı.

Grup 5 (Sisplatin + Krisin): Deneyden 2 gün önce başlamak üzere mısır yağı içinde çözülmüş 50 mg/kg dozunda Krisin toplamda 9 gün boyunca oral olarak uygulandı. Deneyin ilk günü 7 mg/kg sisplatin tek doz IP olarak uygulandı.

2.5 Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması



Fotoğraf 2.2. Sakrifikasyon Öncesi Hazırlık

Sıçanların ilk ağırlıkları ve sakrifikasyon öncesi son ağırlıkları ölçüldü. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar 10 mg/kg ksilazin ve 90 mg/kg ketamin anestezisi altına alındı. Anestezi altındaki tüm hayvanların batın bölgesi açıldı. Biyokimyasal inceleme için intrakardiyak olarak 4 ml kan sakrifikasyon öncesinde alındı. Kan örnekleri sarı kapaklı biyokimya tüplerine koyuldu.

Sıçanlardaki testis ve epididimisler çıkartıldı. Fiksatif solüsyonunun dokuya daha iyi etki edebilmesi için tüm testislerin kapsüllerine enjektör ucu ile delikler açıldı. Dokular histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Epididimisler ise 2 ml serum fizyolojik solüsyonu içeren numune kaplarına koyuldu ve aynı gün tiftikleme işlemi uygulandı.



Fotoğraf 2.3. Sıçanlardan Alınan Dokular

Biyokimya tüplerindeki örnekler oda sıcaklığında 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra 1 saat içerisinde alikotlanarak -80° C’de donduruldu. Serum örneklerine tiyol-disülfid testi yapıldı.



Fotoğraf 2.4. Alınan Kan Örnekleri ve Santrifüj Cihazı

Sıçanların sakrifiye işlemleri, kan ve doku örneklerinin alınması BAİBÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi. Histopatolojik işlemler için ihtiyaç duyulan tüm cihaz ve malzemeler BAİBÜ Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarlarından temin edildi. Biyokimyasal analizler ise BAİBÜ Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.6 Histolojik Doku Takip İşlemleri ve Boyama

2.6.1 Histopatolojik İnceleme

Sıçanların anestezi altında testis dokuları alındıktan sonra; histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için %10'luk formaldehit solüsyonunda 10 gün fikse edildi. Fiksasyon sonrası; rutin histolojik takibi (alkol, ksilen ve parafin serilerinden oluşan) yapılarak parafin bloklara gömüldü.

Testislerden elde edilen parafin bloklardan Thermo Shandon Finesse ME mikrotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) kullanılarak histopatolojik ve immünohistokimyasal işlemler için 3 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitler histopatolojik olarak Hematoksilen-Eosin ve immünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 boyama metodu ile boyandı. Kesitlerden Carl Zeiss marka Axiocam ERc5 model dijital kamera ataçmanlı mikroskop kullanılarak değerlendirme yapıldı ve semikantitatif analizler sonrası resimler çekildi.

Işık Mikroskopik İşlemler: Tüm gruptaki hayvanlardan alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde 10 gün bekletildikten sonra aşağıda belirtilen biçimde doku takip işlemleri ve boyama prosedürleri uygulandı.

Tablo 2.1. Doku Takip İşlemi

Yapılan İşlem	Uygulanan Süre
Akarsuda yıkama	Gün boyu
%70'lik Alkol ile muamele	1 saat
%80'lik Alkol ile muamele	1 saat
%96'lık alkol ile muamele	1 saat
%96'lık Alkol ile muamele	1 saat
%100'lük Alkol ile muamele	1 saat
%100'lük Alkol ile muamele	1 saat
Ksilen ile muamele x2	1 saat
Boncuk parafinde 60 °C'lik etüvde bekletme x2	1 saat
Parafin bloğa gömme işlemi	-
+4 °C'de muhafaza etme	-

Tablo 2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Yapılan İşlem	Uygulanan Süre
Ksilende bekletme	20 dakika
Ksilende bekletme	10 dakika
%96'lık alkol ile muamele x2	5 dakika
% 80'lik alkol ile muamele	5 dakika
Suda yıkama	5 dakika
Hematoksilen boyasında bekletme	10 dakika
Asit-alkol'e batırıp çıkarma	1-2 saniye
Suda yıkama	5 dakika
Amonyak-su karışımına batırıp çıkarma	1-2 saniye
Suda yıkama	5 dakika
Eozin solüsyonunda bekletme	2-3 dakika
Suda yıkama	5 dakika
%96'lık alkol ile muamele x2	5 dakika
Ksilende bekletme x2	15 dakika
Entellan ile kapatma	-

2.6.2 İmmünohistokimya Boyama Metodu

İmmünohistokimyasal İnceleme:

3 µm kalınlığında alınan testise ait kesitlerdeki apoptozisi göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks tekniği, ticari kitte öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak apoptozis belirteci olarak aktif caspase-3 (Anti-Caspase-3 antibody (ab4051)), kullanıldı. Bu kapsamda kaspaz 3 proteinlerine ait immünohistokimyasal incelemelerde, immünoreaktivite gösteren hücreler kriter alınarak kesitler ışık mikroskobu altında incelendi ve tüm gruplarda elde edilen verilerin semikantitatif analizleri yapıldı.

Boyamanın özgüllüğü, aynı dokularda primer antikorun yokluğunda işlenen negatif kontrol kesitlerinin dahil edilmesiyle doğrulandı. Seçilen alanlardan kamera ataçmanlı Nikon Eclipse 80i light fotomikroskop kullanılarak dijitalleştirilmiş görüntüler elde edildi.

Gruplara ait elde edilen verilerin ortalaması alındıktan sonra semikantitatif skorlaması yapıldı. Skorlama 1'den 5'e kadar yapıldı. Veriler; 1: yok, 2: az, 3: orta, 4: yoğun, 5: çok yoğun şeklinde skorlandı.

Tablo 2.3. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Yapılan İşlem	Uygulanan Süre
Dokuları 37°C’de etüvde bekletme	1 gece
Ksilende bekletme	15’er dakika
%96’lık alkol ile muamele	5 dakika
%80’lik alkol ile muamele	5 dakika
%70’lik alkol ile muamele	5 dakika
Distile suda yıkama	5 dakika
PBS’te yıkama	5 dakika
Citrat Buffer ile mikrodalga işlemi	15 dakika
Oda sıcaklığında soğumaya bırakma	15 dakika
PBS’te yıkama	5 dakika
Peroxide Block ile muamele	10 dakika
PBS’te yıkama	5 dakika
Primer Antikor ile muamele ve +4°C bekletme	1 gece
PBS’te yıkama	5 dakika
HRP ile muamele	15 dakika
PBS’te yıkama	5 dakika
DAB kromojen ile muamele	20 dakika
PBS’te yıkama	5 dakika
Mayer Hematoksilen ile zıt boyama	8 dakika
Distile suda yıkama	5 dakika
%96’lık alkol ile muamele	5 dakika
%96’lık alkol ile muamele	5 dakika
Ksilen’de bekletme	15 dakika
Entellan ile kapama	-

2.7 Semen Analizi ve Johnsen Skorlama



Fotoğraf 2.5. Makler Sperm Sayım Kamarası

2.7.1 Sperm Motilite Analizi

Deney gruplarına ait epididimal sperm motilite analizinde sperm motilitesi istatistiksel olarak değerlendirildi. Günümüzde Neubauer hemositometre ve makler kamarası ile yapılan iki sperm analiz metodunun geçerliliği vardır. Çalışmamızdaki sayımlar Makler kamarası (Sefi-Medical Instrument) ile yapıldı.

Makler kamarası 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm analizi için üretilmiştir. Kamaranın semen analizi yapıldığı kısım sperm hücrelerinin üst üste gelmesini önlemesi ve sadece yatay yönde hareket etmesini sağlamaktadır.

Bu alan 10 µm aralığındadır. Ayrıca sayımın yapılabilmesi için her biri 0.1x0.1mm olan 10x10 şeklinde 100 kareden oluşmaktadır. Semen analizi sırasında sperm sayısı ve hareketliliği için makler kamarasına bir damla semen örneği (10 µl) damlatıldı.

Makler kamarasının kapağı kapatılarak ışık mikroskopunda 10 kare içerisinde hareketli ve hareketsiz spermier sayılıp 10^6 (milyon) ile çarpılarak gerekli değeriendirmeler yapıldı.



Fotoğraf 2.6. Makler Kamarası ile Görüntülenen Semen Örneği, X10

2.7.2 Johnsen Skorlama

Johnsen skorlamasına göre hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, tübülün içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif bir şekilde kaybolmaktadır.

Fotoğrafları çekilen seminifer tübüller için hasar değeriendirmesi yapıldı. Bu değeriendirme için Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) yöntemi uygulandı (Johnsen, 1970; Oliveira Filho vd., 2010).

Tablo 2.4. Johnsen Skoru

Skor	Histolojik Bulgular
1	Seminifer tübül içinde hiç hücre yok.
2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var.
3	Germ hücresi olarak sadece spermatogonia var.
4	Spermatozoa veya spermatid yok, birkaç spermatosit var.
5	Spermatozoa veya spermatid yok, çok sayıda spermatosit var.
6	Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az.
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var.
8	Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10'dan az spermatozoa var.
9	Germinal epitel çok sıralı ve çok sayıda spermatozoa var.
10	Tamamlanmış spermatogenezis ve düzgün açık tübül mevcut.

Bu işlemler için Hematoksilen Eozin boyasıyla boyanmış olan kesitler ışık mikroskobu altında incelendi. Kesitlere Tablo 2.4'te yer alan Johnsen Skoru baz alınarak skor hesaplaması yapıldı. Her sıçan için ayrı inceleme yapıldıktan sonra istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.8 Biyokimyasal Analiz

Serum tiyol-disülfid homeostazisi parametreleri düzeyleri ölçümü:

Serum tiyol-disülfid homeostazisi; Erel ve Neşelioğlu (Erel & Neselioglu, 2014) tarafından geliştirilen yeni otomatik ölçme yöntemi ile analiz edildi. Bu yöntem iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta örnek içerisinde bulunan nativ(native) tiyol düzeyleri DTNB [5,5' – dithiobis- (2- nitrobenzoic) acid] ile tespit edilmektedir. İkinci basamakta dinamik ve indirgenebilir disülfid bağları (-S-S) sodyum borohidrit (NaBH_4) varlığında serbest fonksiyonel (reaktif) tiyol gruplarına (-SH) indirgenmektedir. Kullanılmadan kalmış olan indirgeyici NaBH_4 formaldehit ile tüketilerek temizlenmektedir.

Daha sonra hem NaBH_4 ile indirgenmiş hem de nativ tiyol içeren toplam tiyol grupları DTNB [5,5' – dithiobis- (2- nitrobenzoic) acid] ile reaksiyon sonrası tespit edilmektedir. Nativ tiyol (-SH) ve toplam tiyol (-SH+S-S) konsantrasyonları belirlendikten sonra ve bu iki değerin arasındaki farkın yarısı dinamik disülfid miktarını vermektedir. Ek olarak disülfid (-S-S) / nativ tiyol grupları (-SH), disülfid (-S-S) / toplam (total) tiyol (-SH+S-S) ve nativ tiyol grupları (-SH) / toplam tiyol (-SH+S-S) yüzde oranları hesaplanmaktadır (Erel & Neselioglu, 2014).

2.9 İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın istatistiksel analizleri SPSS version 21.0 analiz programı ile yapıldı. Deneklere ait verilerin normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Ölçümle belirtilen sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılıma uyan veriler One-Way ANOVA ve Post-hoc test olarak Bonferroni testleri ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen çoklu grupların karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis analizi ve Post-hoc test olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ olduğunda aradaki farkın istatistikî olarak anlamlı olduğu sonucuna varıldı.

3. BULGULAR

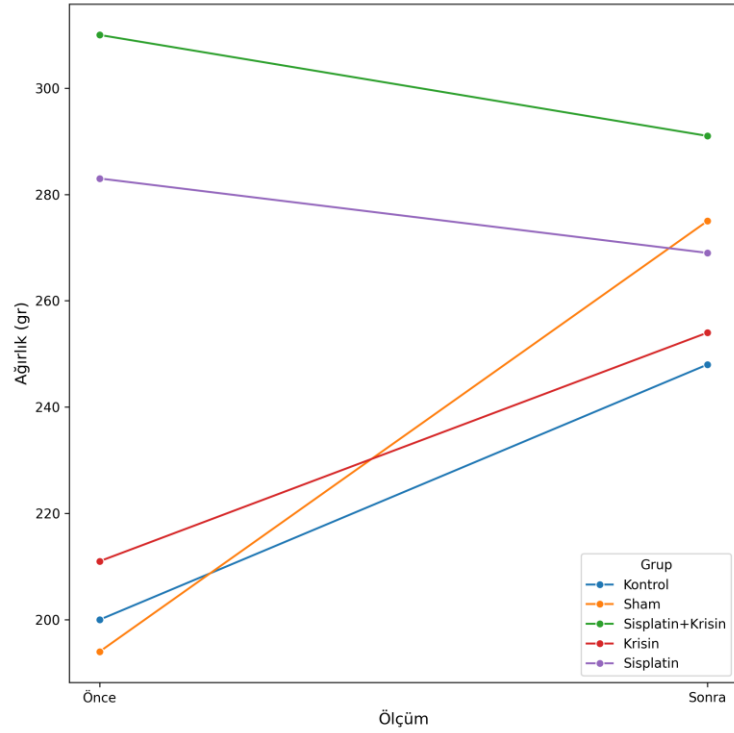
3.1 Ağırlık Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Deney süresi boyunca hayvanlarda kilo artışı ve düşüşü gözlemlendi. Deney gruplarına ait hayvanların ilk ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlılık bulundu. Karşılaştırmalar Tablo 3.1 ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deney Gruplarında Ağırlık Değişimlerinin Karşılaştırmaları

Gruplar	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	53.5	33.755	10.0	115.0
Sham	65.625	47.638	2.0	132.0
Krisin	41.714	17.085	17.0	66.0
Sisplatin	-13.125	14.545	-33.0	10.0
Sp+Kr	-16.714	48.558	-105.0	42.0

Deney gruplarının son ağırlık ölçümünden sonra deney süresi boyunca Kontrol, Sham ve Krisin gruplarında ağırlık artışı görülürken Sisplatin ve Sisplatin+Krisin gruplarında ağırlık düşüşü bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.1. Ağırlık Değişimlerinin Dağılımı

Son ağırlıklar incelendiğinde, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir.

Sisplatin grubunda, Kontrol ve Sham grubuna göre ağırlık bakımından düşüş gözlemlendi. Bu bulgu, sisplatinin hücrel toksisitesi ile metabolizmayı olumsuz etkileyerek ağırlık kaybına yol açtığını göstermektedir. Ağırlık kaybı Sham grubunda istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.001$) Kontrol grubunda anlamlılık göstermedi.

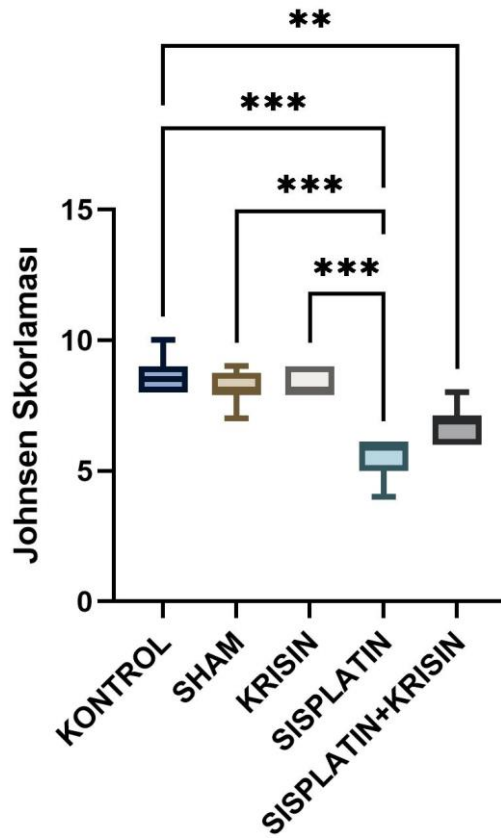
Sisplatin+Krisin grubunun, Sisplatin grubuna göre anlamlı bir fark göstermediği bulundu ($p > 0.005$). Bu durum, krisin antioksidanının, sisplatinin neden olduğu ağırlık kaybını tamamen engellemediğini gösterdi.

3.2 Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması

Testis dokusunun histolojik analizleri, Johnsen testiküler biyopsi skorumasına göre yapılmıştır.

Tablo 3.2. Johnsen Skoruması Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Kontrol	8,000	10,00	8,625	0,7440
Sham	7,000	9,000	8,125	0,6409
Krisin	8,000	9,000	8,429	0,5345
Sisplatin	4,000	6,000	5,500	0,7559
Sisplatin+Krisin	6,000	8,000	6,857	0,6901



Şekil 3.2. Johnsen Skoruması Dağılımı

Analizler sonucu, bazı gruplar arasında anlamlı farklar bulundu.

Kontrol grubunun, Sisplatin grubuna göre anlamlı bir fark gösterdiği bulundu. ($p<0,001$). Bu sonuç Sisplatin'in biyolojik değişimlere yol açtığını göstermektedir.

Sisplatin ve Sisplatin+Krisin grubu karşılaştırıldığında, Sisplatin+Krisin grubunun Sisplatin grubuna göre yüksek çıkmasına ($p<0.004$) rağmen anlamlılık gözlenmemesi Sisplatin'in toksik etkilerine karşı Krisinin kısmi koruyucu bir rol üstlenebileceğini göstermektedir.

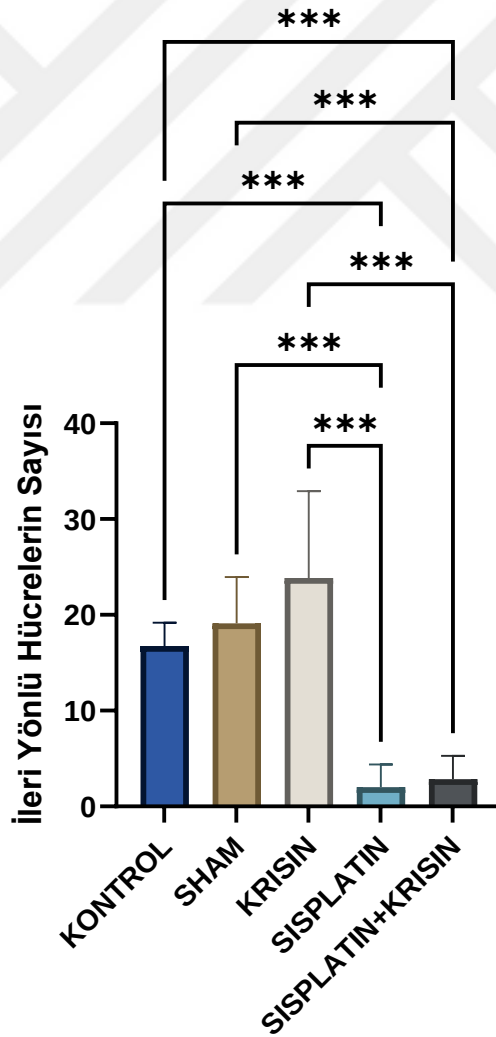


3.3 Motilite Analizi

3.3.1 İleri Hareketli Hücrelerin Motilite Analizi

Tablo 3.3. İleri Hareketli Hücre Sayısının Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	16,75	2,43	13,00	20,00
Sham	19,13	4,82	11,00	27,00
Krisin	23,86	9,06	14,00	42,00
Sisplatin	2,00	2,39	0,00	6,00
Sisplatin+Krisin	2,85	2,41	0,00	7,00



Şekil 3.3. İleri Hareketli Hücrelerin Dağılımı

Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

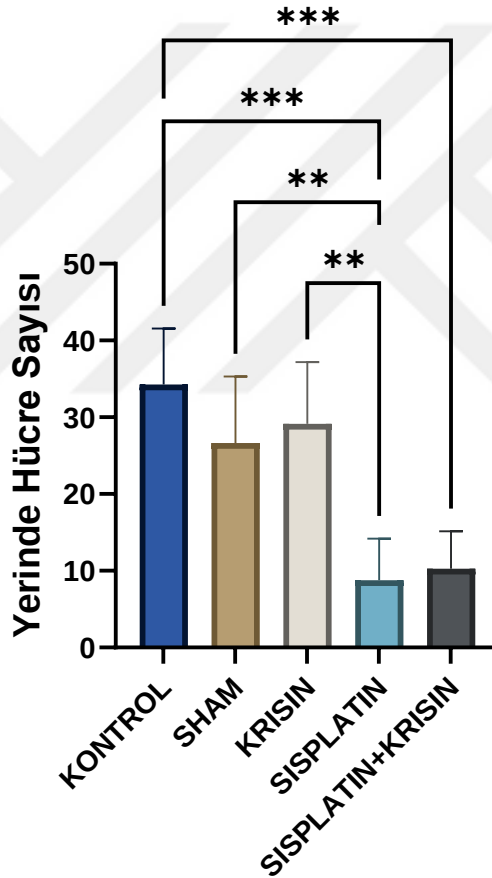
İleri hareketli hücre motilite analizi sonuçlarına baktığımızda, sisplatin hasarının hücre hareketliliğini azalttığı gözlenmiştir. Kontrol grubu, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı bir fark göstermiştir ($p<0,001$), bu da sisplatin hasarının hücrelerin ileri yönlü hareketini kısıtladığını ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, Kontrol grubunun, Sisplatin+Krisin grubuna kıyasla da anlamlı bir fark gösterdiği ($p<0,001$) bulunmuş, Krisin grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemiştir ancak Krisin grubunun yüksek çıkması antioksidan etkisi sebebiyle kısmi olarak motiliteyi arttırmıştır ve etkilerini kısmi olarak iyileştirdiği görülmüştür.

Krisin grubunun, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı fark göstermesi ($p<0,001$), Krisin grubunun hücre hareketliliğini artırıcı etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca, Krisin grubunun, Sisplatin+Krisin grubuna kıyasla anlamlı fark göstermesi ($p<0,001$) bu kombinasyonun daha etkili olabileceğini ancak sisplatin hasarının tüm etkilerini ortadan kaldıramadığını göstermekte. Sisplatin+Krisin grubu, sisplatin grubuna göre yüksek çıkmasına rağmen anlamlılık gözlenmemiştir. Bunun sebebinin süre ve doz yetersizliğine bağlı olduğu düşünülmektedir.

3.3.2 Yerinde Hareketli Hücrelerin Motilite Analizi

Tablo 3.4. Yerinde Hareketli Hücre Sayısının Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	34,25	7,30	27,00	46,00
Sham	26,63	8,66	15,00	40,00
Krisin	29,14	8,03	21,00	46,00
Sisplatin	8,75	5,41	3,00	17,00
Sisplatin+Krisin	10,29	4,85	5,00	17,00



Şekil 3.4. Yerinde Hareketli Hücrelerin Dağılımı

Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

Yerinde hareketli hücre sayısı analizinde, Kontrol grubunun, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı fark gösterdiği ($p<0,001$) bulunmuştur, bu da sisplatinin hücre sayısını azalttığını göstermektedir.

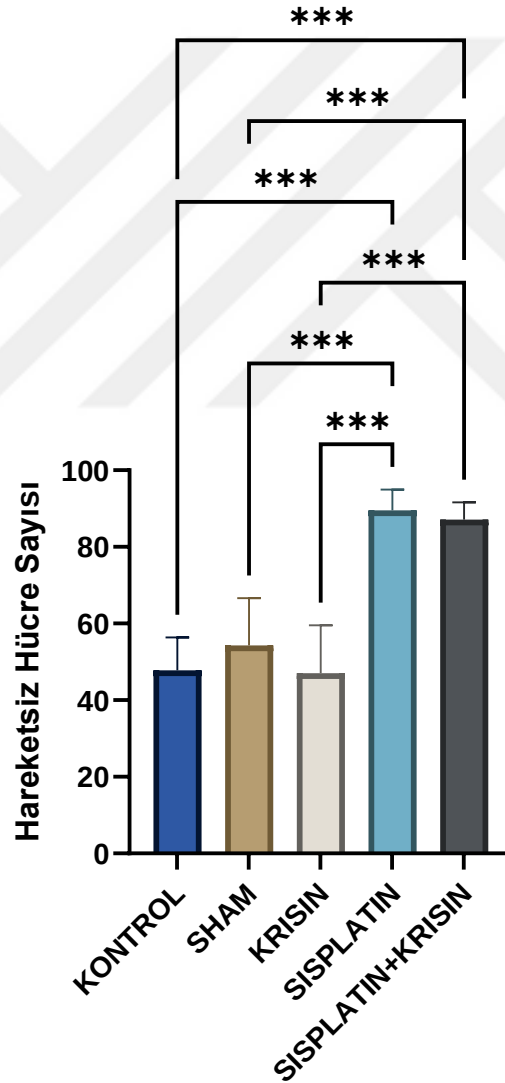
Sisplatin+Krisin grubu sisplatin grubuna göre yüksek çıkmıştır. İstatiksel olarak anlamlılık göstermemekle birlikte Krisinin+Sisplatinin verdiği hasarı azaltmada kısmi rol oynadığı gözlemlenmektedir.



3.3.3 Hareketsiz Hücrelerin Motilite Analizi

Tablo 3.5. Hareketsiz Hücre Sayılarının Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	47,75	8,61	35,00	57,00
Sham	54,25	12,41	37,00	72,00
Krisin	47,00	12,52	30,00	59,00
Sisplatin	89,50	5,47	82,00	96,00
Sisplatin+Krisin	87,14	4,45	82,00	93,00



Şekil 3.5. Hareketsiz Hücrelerin Dağılımı

Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

Hareketsiz hücre analizi sonuçlarına göre; Kontrol grubunun, Sisplatin grubuna ($p<0,001$) ve Sisplatin+Krisin grubuna ($p<0,001$) kıyasla anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur, bu da sisplatin hasarının hücre hareketsizliğini artırdığını göstermektedir. Sonuç olarak, sisplatin hasarı hücre hareketliliğini azaltırken, Krisin antioksidanı bu kaybı kısmi olarak engellemiştir.

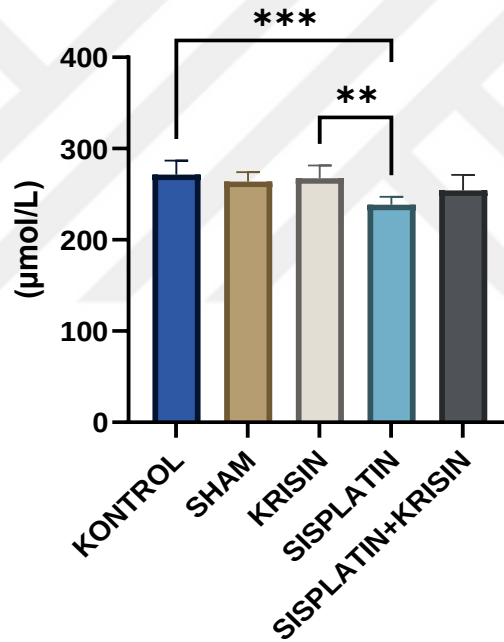


3.4 Biyokimyasal Bulgular

A) Native-Tiyol Grubu

Tablo 3.6. Native Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	271,60	15,29	254,20	297,70
Sham	263,70	10,49	247,90	280,40
Krisin	267,30	14,21	250,30	295,60
Sisplatin	238,50	8,84	227,50	252,90
Sisplatin+Krisin	254,10	17,13	225,20	278,60



Şekil 3.6. Native Veri Düzeyleri

Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

Kontrol ve Sisplatin grupları arasında anlamlı bir fark ($p < 0,001$) bulundu. Bu sonuç, sisplatin hasarının, kontrol grubuna kıyasla native tiyol seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğünü göstermektedir. Sisplatin, hücresel oksidatif stres yaratabilen bir kemoterapötik ajandır ve bu hasar, hücrelerdeki serbest tiyol gruplarının oksidatif hasara uğramasına ve seviyelerinin azalmasına yol açabilir. Native tiyol

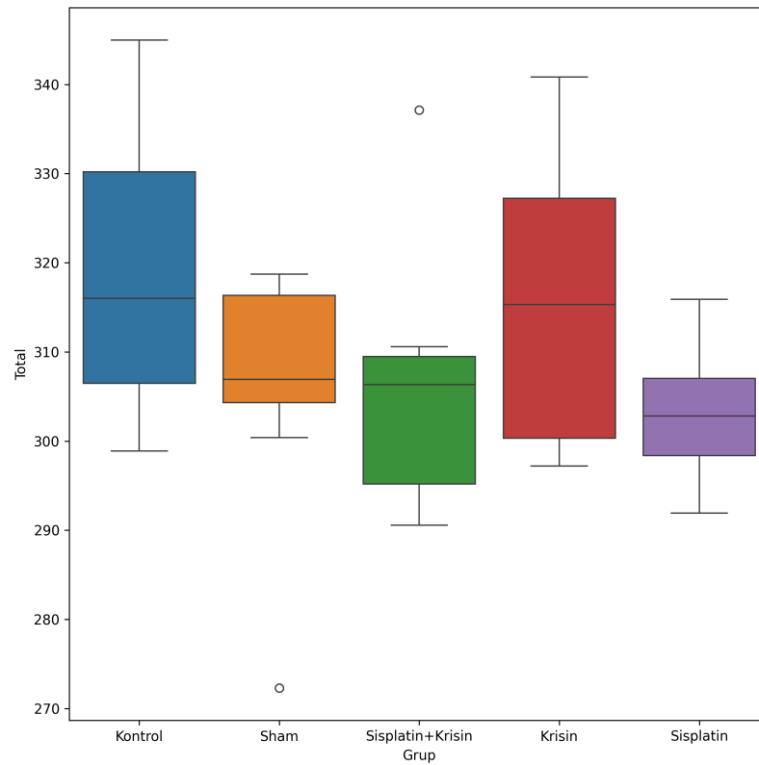
grupları, hücrel savunma mekanizmalarının işlevsel kapasitesine işaret eder ve bu veriye göre, sisplatin hasarı hücrel redoks dengesini bozarak oksidatif stresi artırmıştır. Bu bulgu, sisplatin hasarının zararlı etkilerinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Sisplatin grubunun, Krisin grubuna kıyasla anlamlı bir fark gösterdiği ($p<0.002$) bulundu. Sisplatin grubu, sisplatin+krisin grubuna kıyasla düşük çıkmasına rağmen anlamlılık gözlenmedi. Bu bulguda sisplatin grubunun native tiyol seviyelerinin sisplatin+krisin grubuna kıyasla daha düşük çıkması krisin gibi antioksidanların hücrelerde oksidatif hasara karşı koruma potansiyeline sahip olduğunu ancak krisin doz ve süresinin yetersiz gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Sisplatin, hücrel oksidatif stresi artırırken, krisin antioksidanı bu stresin etkilerini kısmi olarak dengelemiştir.

B) Total-Tiyol Grubu

Tablo 3.7. Total Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	319,10	17,19	298,90	345,00
Sham	305,60	15,02	272,30	318,70
Krisin	306,20	15,71	290,60	337,10
Sisplatin	303,20	8,27	291,90	315,90
Sisplatin+Krisin	306,20	15,71	290,60	337,10



Şekil 3.7. Total Veri Düzeyleri

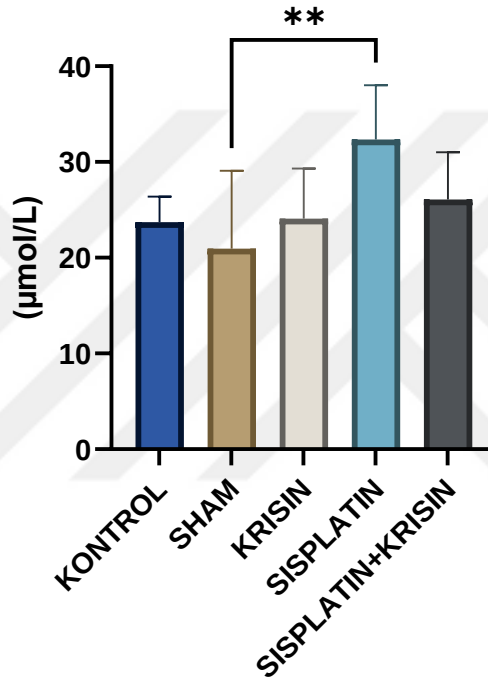
Yapılan analizler sonucunda Total grubunda gruplar arasında fark bulunmadı. ($p>0.005$)

Total tiyol düzeylerinde herhangi bir anlamlı fark bulunmaması, gruplar arasında serbest tiyol ve disülfid bağları arasındaki dengeyi etkileyen faktörlerin birbirini dengelemiş olabileceğini düşündürmektedir. Oksidatif stres, hem serbest tiyol gruplarının azalmasına hem de disülfid bağlarının artmasına yol açabileceğinden, bu iki bileşiğin toplam düzeylerinin gruplar arasında birbirini dengelemesi olasıdır.

C) Disülfid Bağı Grubu

Tablo 3.8. Disülfid Bağı Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	23,71	2,66	19,64	28,22
Sham	20,94	8,13	6,99	30,02
Krisin	24,07	5,24	17,62	34,46
Sisplatin	32,36	5,66	22,93	41,92
Sisplatin+Krisin	26,07	4,94	19,46	33,70



Şekil 3.8. Disülfid Veri Düzeyleri

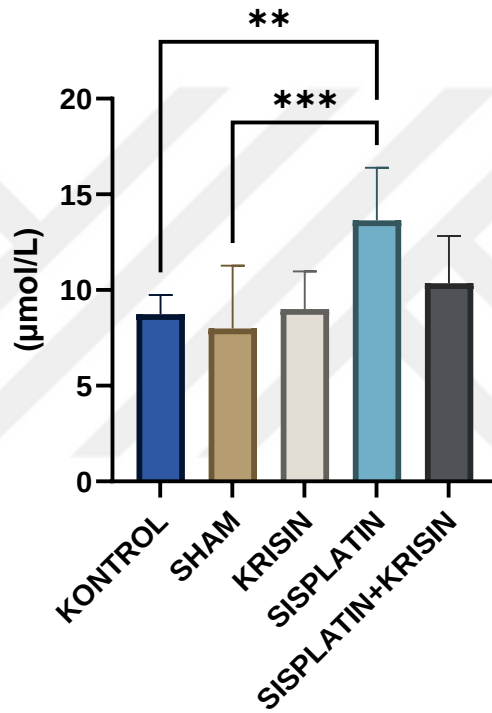
Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

Sham grubunun, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı bir fark gösterdiği ($p < 0.003$) bulundu. Sham grubundaki daha düşük disülfid düzeyleri, oksidatif strese maruz kalmayan hücrelerin daha dengeli bir redoks durumunda olduğunu göstermektedir ayrıca kontrol grubunda da yüksek değer çıkmasına rağmen anlamlılık gözlemlenmemiştir.

D) İndeks-Tiyol (Index) Grubu

Tablo 3.9. İndeks-Tiyol Grubu Tanımlayıcı İstatistikleri

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	8,743	1,002	7,505	10,08
Sham	7,996	3,276	2,707	12,11
Krisin	9,016	1,958	6,726	12,67
Sisplatin	13,64	2,754	9,317	18,06
Sisplatin+Krisin	10,36	2,472	7,654	14,96



Şekil 3.9. Index Veri Düzeyleri

Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

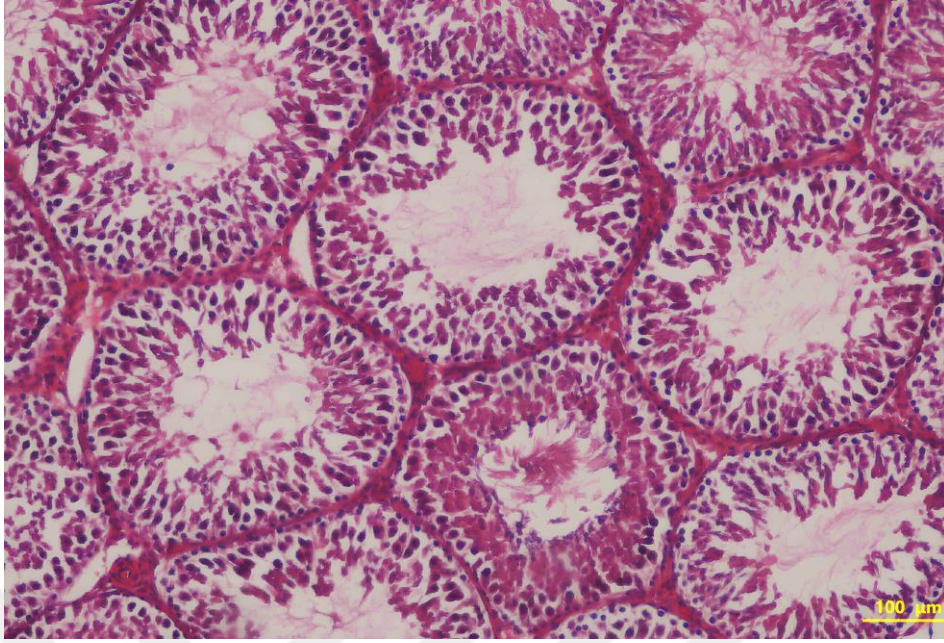
Kontrol ve Sisplatin grupları arasında anlamlı bir fark ($p < 0,003$) bulundu. Sisplatin grubunda index tiyol seviyelerindeki değişiklik, sisplatin hasarının hücresel fonksiyonları bozduğunu ve oksidatif stres yarattığını göstermektedir. Bu bulgu, sisplatin hasarının biyokimyasal bakımından önemli değişikliklere yol açtığını, özellikle oksidatif stresle ilişkili biyomarkerlerde farklılıklar yarattığını ortaya koymaktadır. Sisplatin, serbest radikal üretimini artırarak ve oksidatif stres

oluşturarak serbest tiyol gruplarını oksitler ve bunun sonucunda disülfid bağlarının artmasına yol açar. Bu oksidatif stres, hücrelerdeki total tiyol ve index tiyol seviyelerini etkileyebilir.

Index tiyol seviyeleri sisplatin+krisin grubunda sisplatin grubuna göre yüksek çıkmasına rağmen anlamlılık gözlenmedi.



3.5 Histopatolojik Bulgular



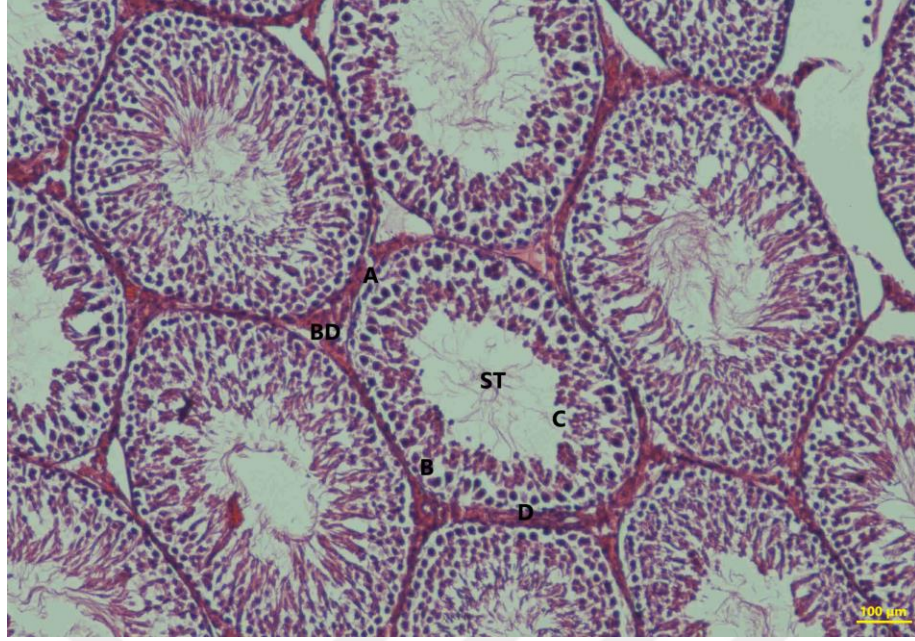
Şekil 3.10. Kontrol grubu genel görünüm, H&E: X10

Seminifer tübüller, morfolojik açıdan normal yapıdadır ve dokuda homojen bir dağılım sergilemektedir.



Şekil 3.11. Kontrol grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X20

BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül, A: Spermatogonyum, B: Spermatosit, C: Spermatid



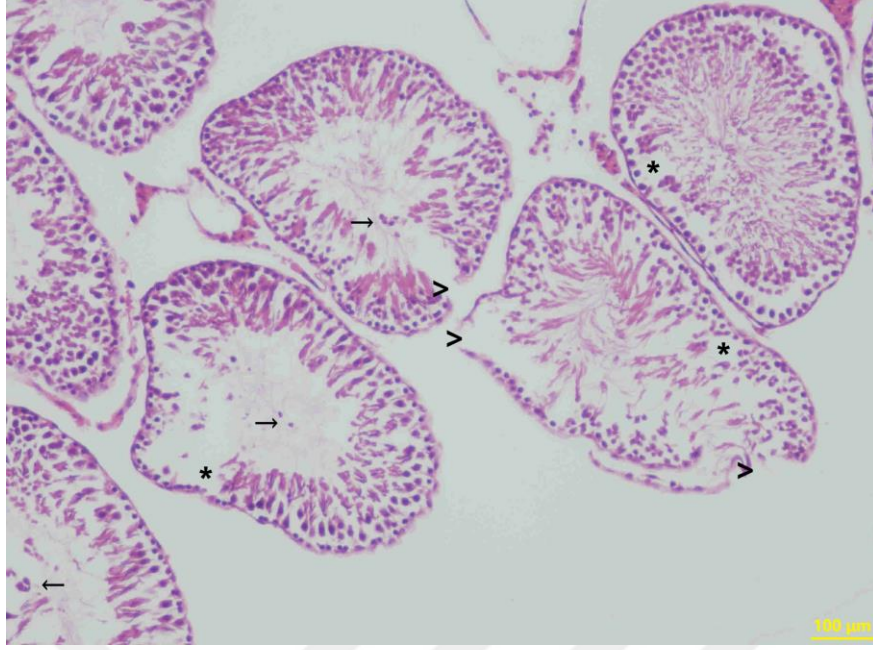
Şekil 3.12. Sham grubu genel görünüm, H&E: X10

Sham grubu, morfolojik açıdan normal yapıya ve dağılıma yakın bir özellik göstermektedir. BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül, A: Spermatogoniyum, B: Spermatozoid, C: Spermatozoid, D: Sertoli.



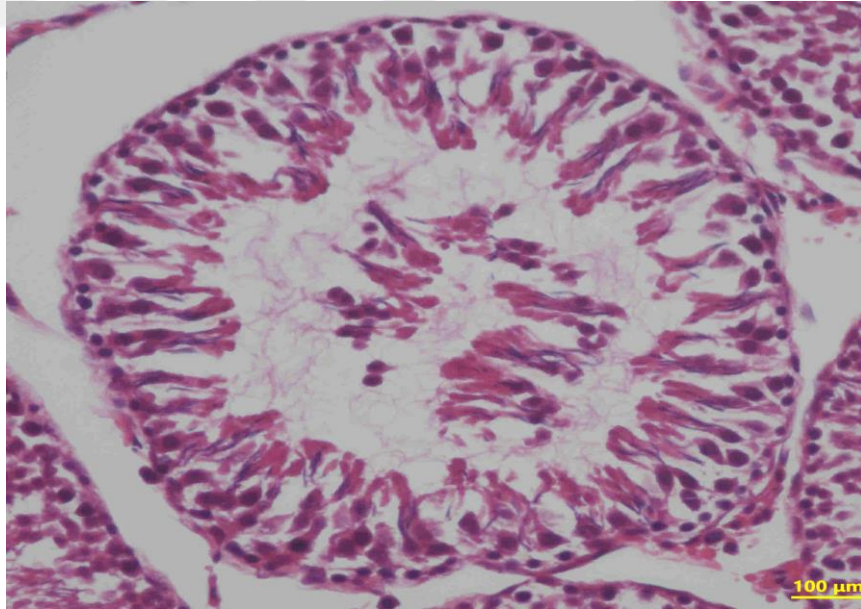
Şekil 3.13. Sham grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X20

BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül, A: Spermatogoniyum, B: Spermatozoid, C: Sertoli, D: Spermatozoid.



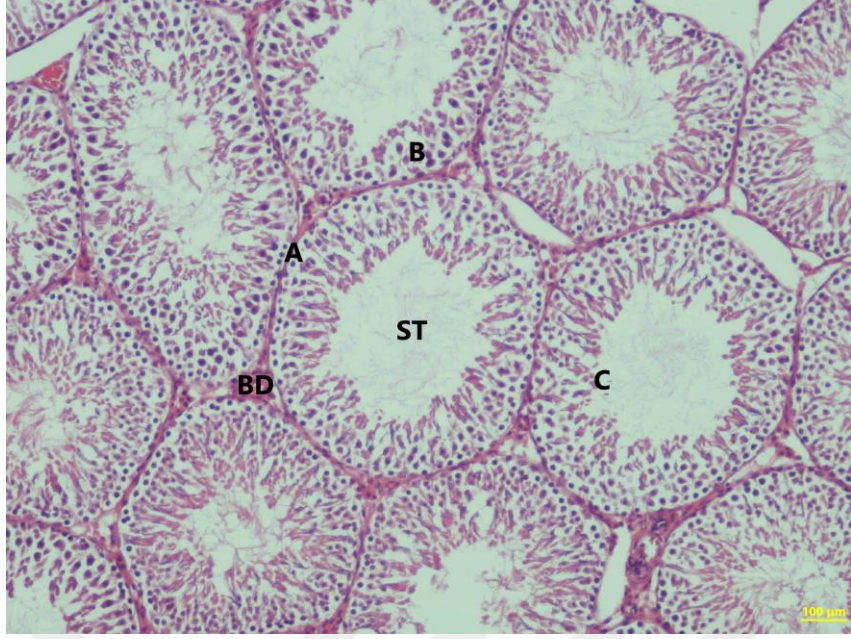
Şekil 3.14. Sisplatin grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X10

Epitelde kopma ve düzensizlik (>), spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma ve vakuolizasyon (*), Lümeninde immatür hücrelerin görülmesi (→).



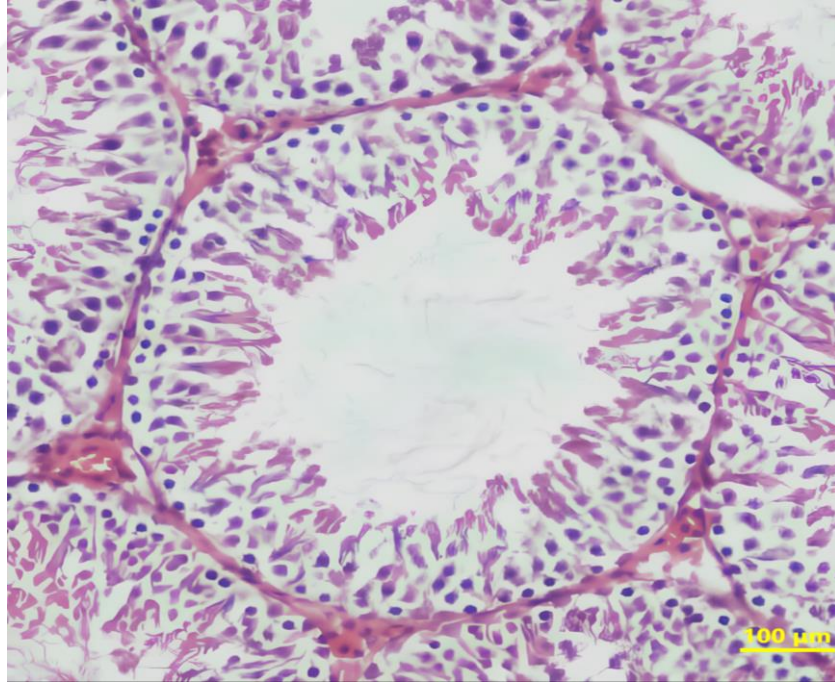
Şekil 3.15. Sisplatin grubu genel görünüm, H&E: X20

Grupta seminifer tübüllerde dejenerasyon, lümeninde immatür hücreler ve hücresel bozulmalar gözlemlendi. Spermatositlerin yanı sıra germ hücreleri ve sperm hücrelerinin sayısında anlamlı bir azalma tespit edildi.



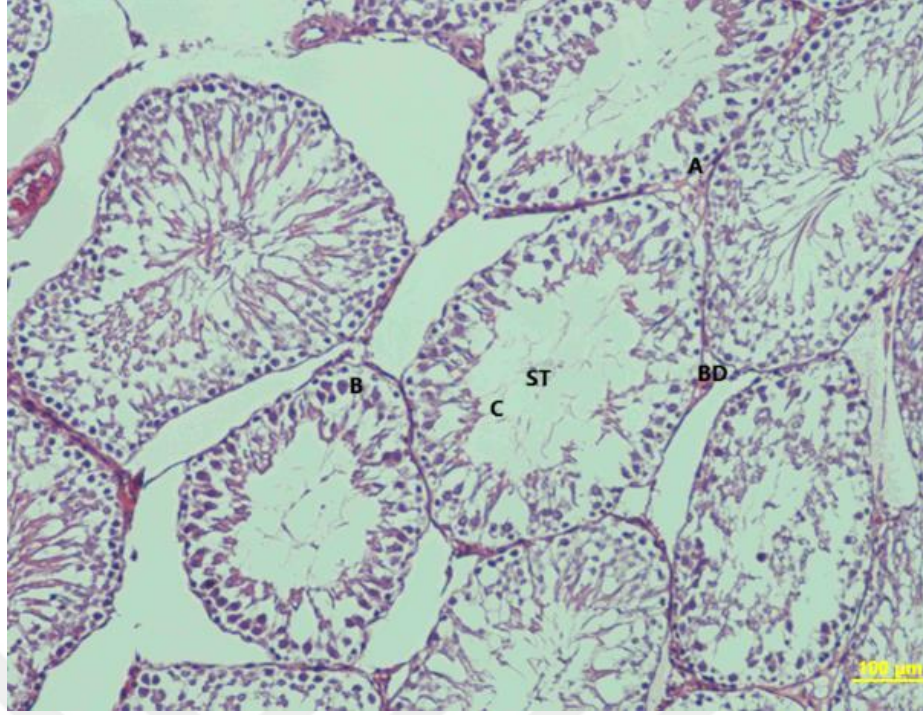
Şekil 3.16. Krisin grubu genel görünüm, H&E: X10

BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül, A: Spermatogoniyum, B: Spermatozoid, C: Spermatid.

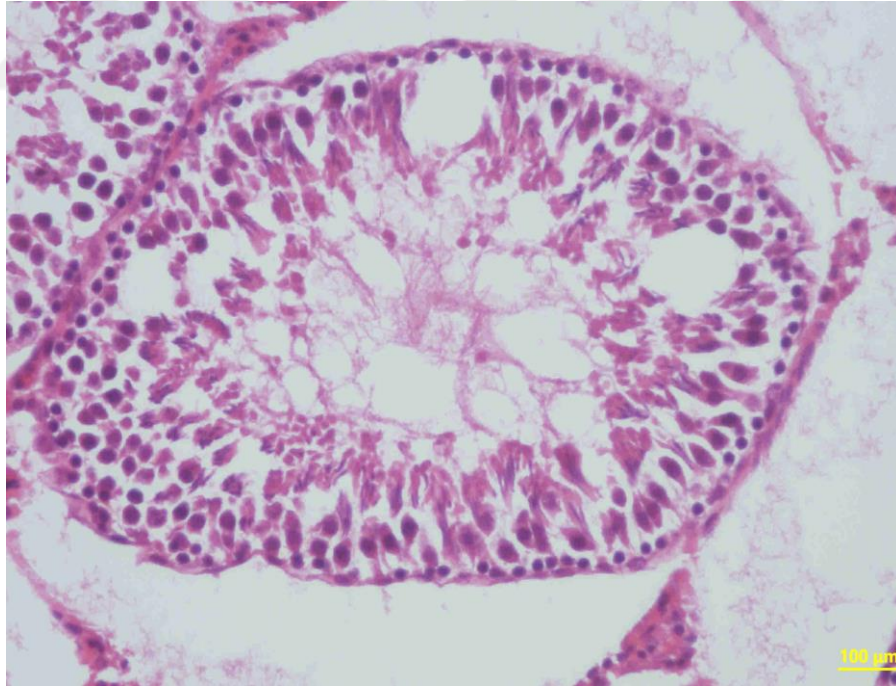


Şekil 3.17. Krisin grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E: X20

Krisin grubu genel görünüm anlamında Kontrol ve Sham gruplarına yakın bir durum sergiledi.



Şekil 3.18. Sisplatin+Krisin grubu genel görünüm, H&E: X10



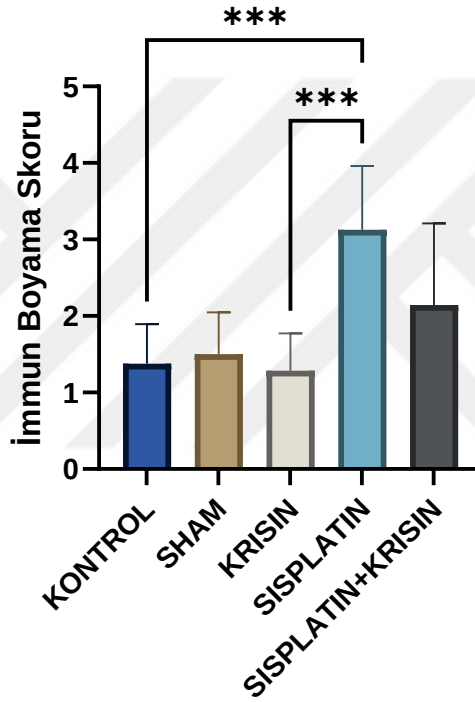
Şekil 3.19. Sisplatin+Krisin grubu seminifer tübül genel görünüm, H&E:X20

Hasar grubuna oranla bu grupta seminifer tübüllerin konturlarındaki düzensizliklerin azaldığı ve spermatogenik seri hücrelerinin diziliminin hasar grubuna oranla daha düzgün olduğu gözlemlendi.

3.6 İmmunohistokimyasal Bulgular

Tablo 3.10. İmmun Boyama Skorlamasının Tanımlayıcı İstatistikleri

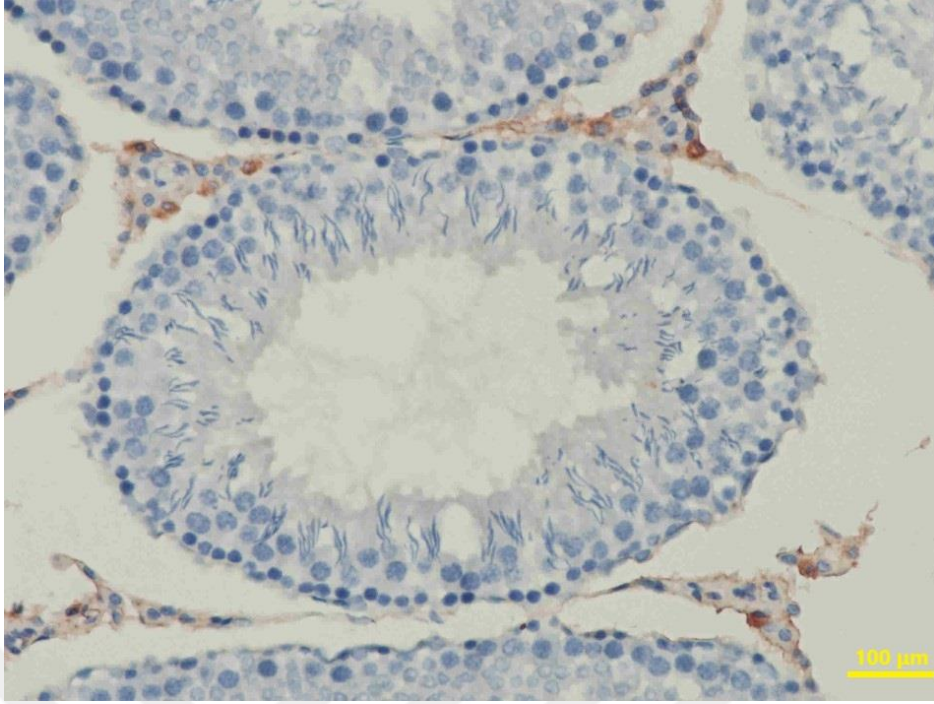
Gruplar	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	1,375	0,5175	1,000	2,000
Sham	1,500	0,5477	1,000	2,000
Krisin	1,286	0,4880	1,000	2,000
Sisplatin	3,125	0,8345	2,000	4,000
Sisplatin+Krisin	2,143	1,069	1,000	4,000



Şekil 3.20. İmmun Boyama Skorlaması Veri Düzeyleri

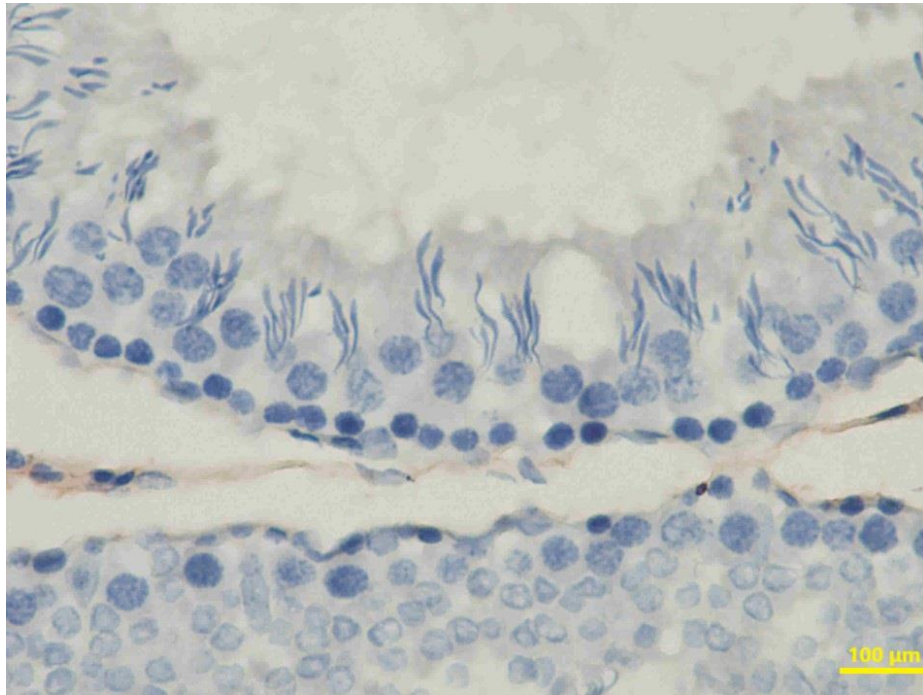
Yapılan analizler sonucunda, bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.

Kontrol grubunun, Sisplatin grubuna göre anlamlı bir fark gösterdiği ($p<0,001$) bulundu. Krisin grubunun, Sisplatin grubuna göre anlamlı bir fark gösterdiği ($p<0,001$) bulundu. Diğer gruplar arasında fark bulunmadı. ($p>0,005$)

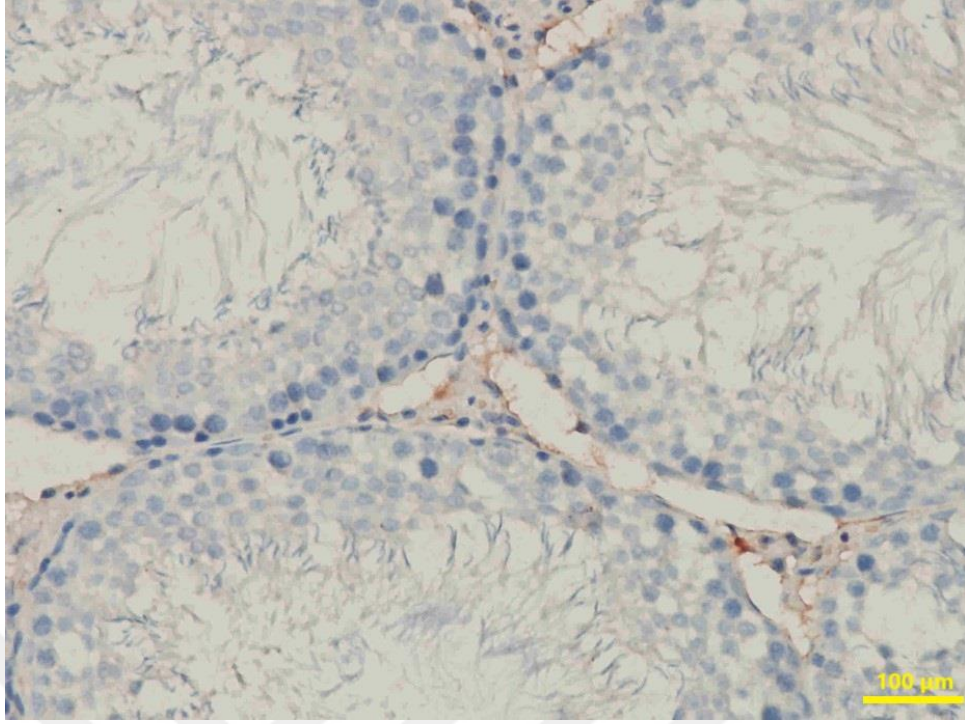


Şekil 3.21. Kontrol grubu, Kaspaz-3: x20

Seminifer tübüller, morfolojik açıdan normal yapıdadır ve kaspase-3 boyaması ile yapılan immünohistokimyasal (IHC) incelemede dokuda homojen bir dağılım sergilemektedir. Kaspase-3, hücre apoptozisi ile ilişkilidir ve bu boyama sonucu seminifer tübüller içerisinde apoptotik hücrelerin yer almadığı gözlemlenmiştir.

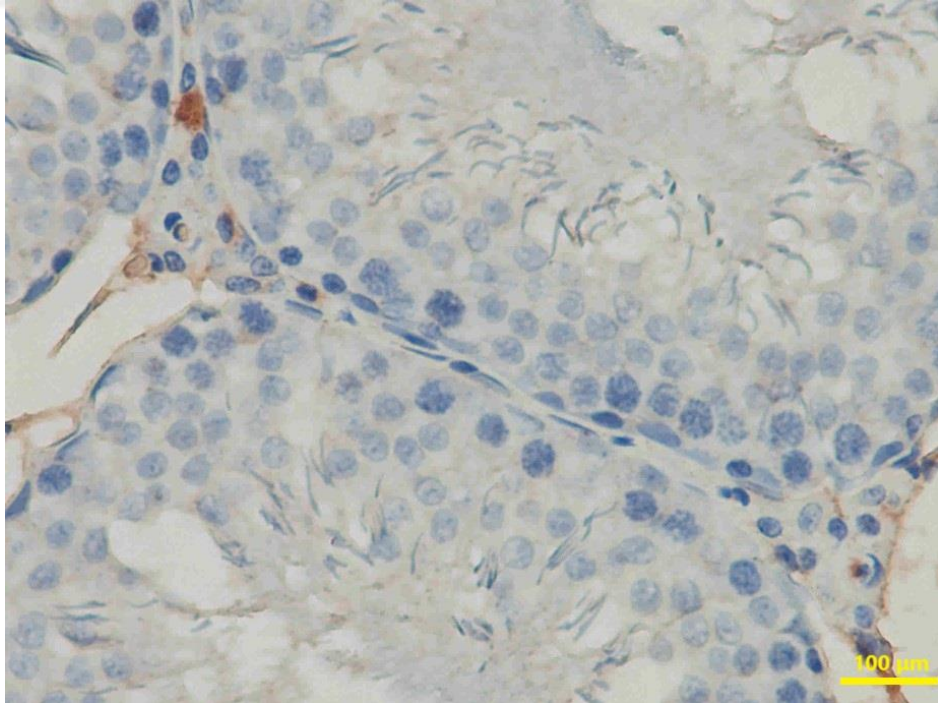


Şekil 3.22. Kontrol grubu, Kaspaz-3: x40

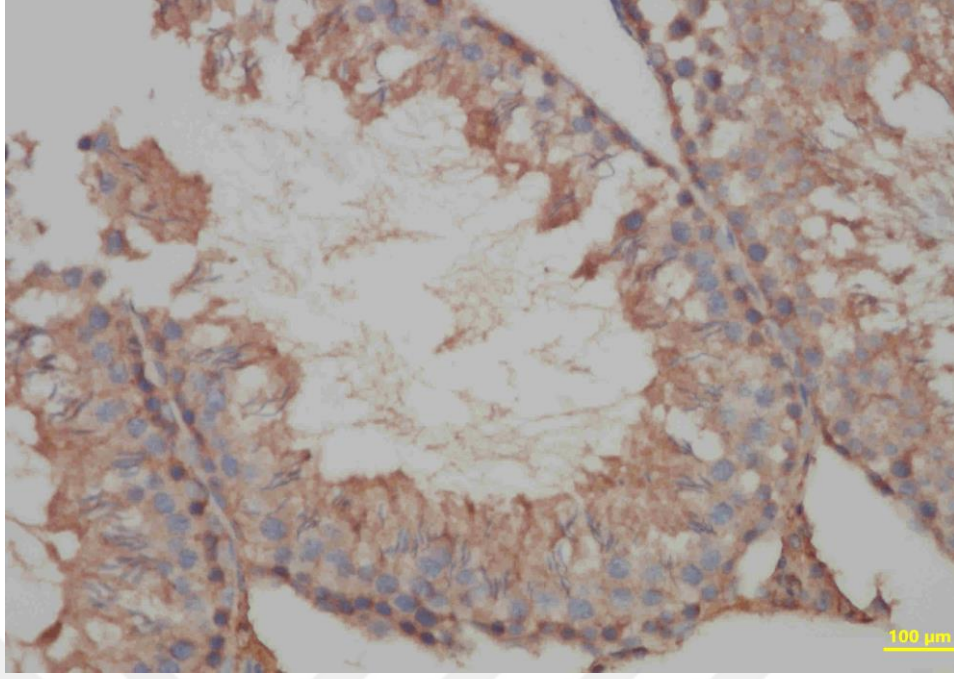


Şekil 3.23. Sham grubu, Kaspaz-3: x20

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Sham grubunun homojen bir dağılım sergilediği ve kontrol grubuna yakın özellikler gösterdiği tespit edilmiştir.

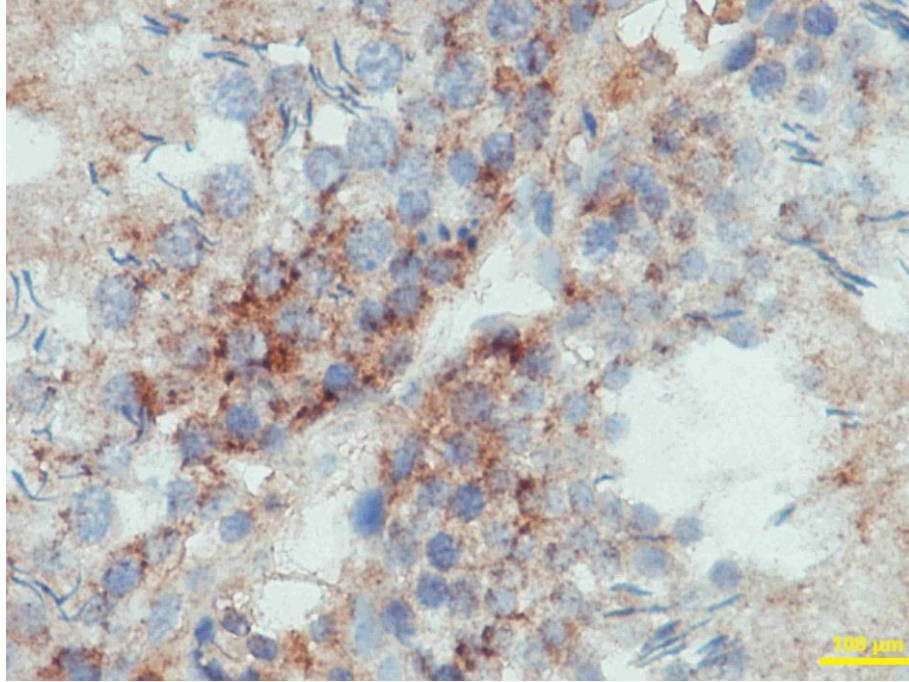


Şekil 3.24. Sham grubu, Kaspaz-3: x40

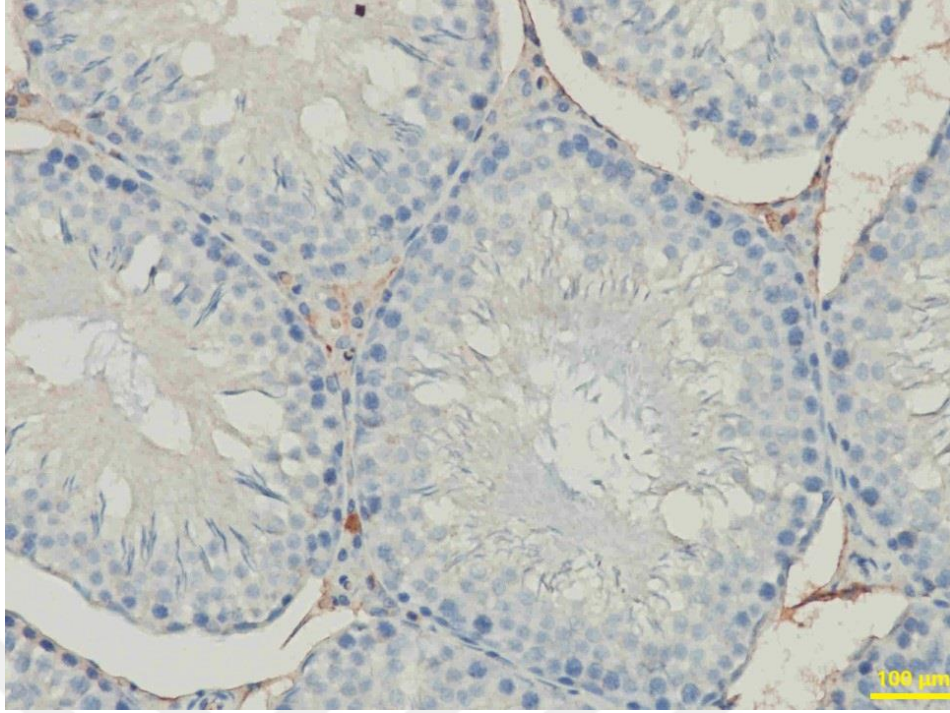


Şekil 3.25. Sisplatin grubu, Kaspaz-3: x20

Sisplatin grubunda, Kaspaz-3 aktivitesinin diğer gruplara göre belirgin şekilde arttığı ve özellikle hücresel hasarın yoğun olduğu bölgelerde daha belirgin hale geldiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Sisplatin uygulamasının yol açtığı hasar sonucu apoptozun arttığını açıkça ortaya koymaktadır.

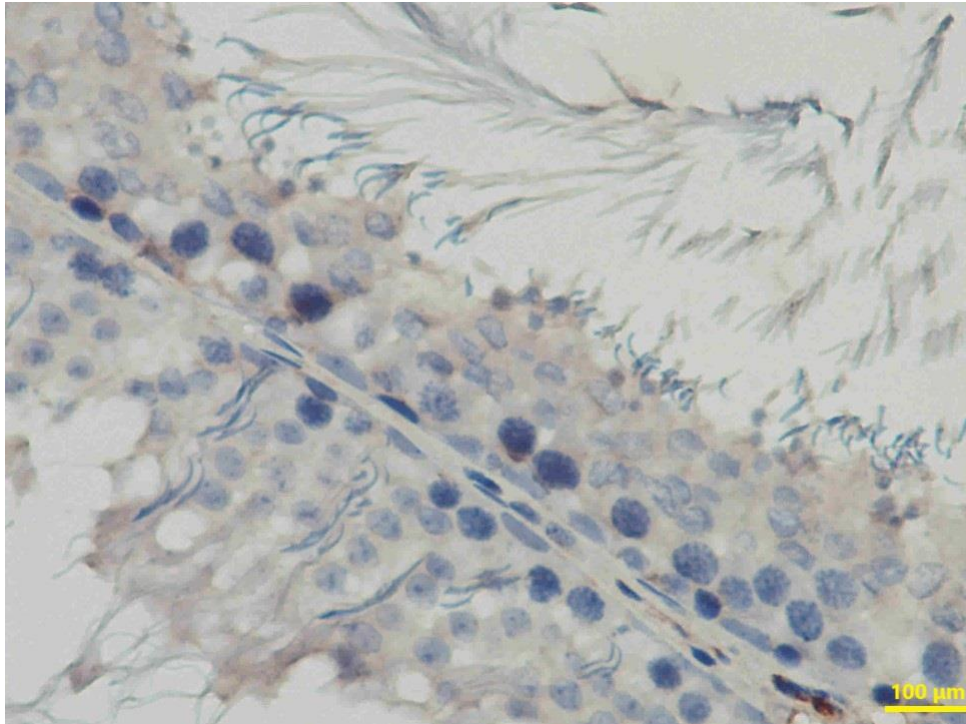


Şekil 3.26. Sisplatin grubu, Kaspaz-3: x40

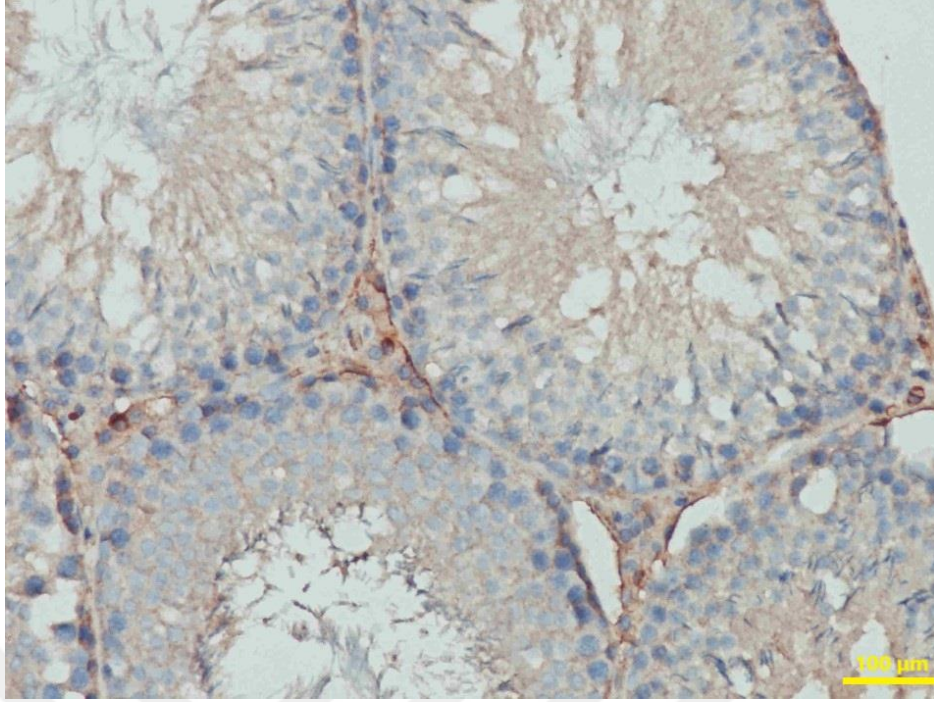


Şekil 3.27. Kresin grubu, Kaspaz-3: x20

Kresin grubunda, Kaspaz-3 boyamaya bağlı apoptotik hücre varlığına rastlanmamıştır. Grubun genel yapısının ise Kontrol ve Sham grubuna yakın seviyelerde olduğu gözlenmiştir.

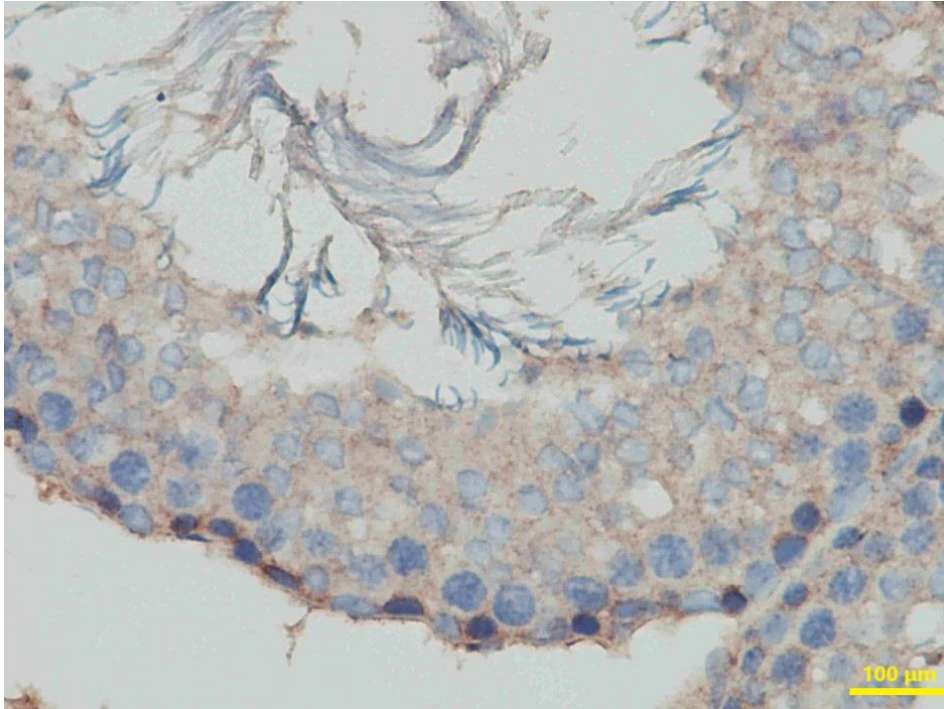


Şekil 3.28. Kresin grubu, Kaspaz-3: x40



Şekil 3.29. Sisplatin+Krisin grubu, Kaspaz-3: x20

Sisplatin+Krisin grubunda, hasar grubuna kıyasla apoptoz düzeyindeki artış daha sınırlı olmuştur. Bu grup, daha düşük yoğunlukta Kaspaz-3 pozitif hücreler sergilemiştir. Bu bulgular, koruyucu etkinin apoptoz sürecini modüle etmeye yönelik etkili bir yaklaşım sunduğunu göstermektedir.



Şekil 3.30. Sisplatin+Krisin grubu, Kaspaz-3: x40

4. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkan, dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bir hastalıktır (C. Kim & Kim, 2018).

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla başlar ve pek çok farklı türü bulunur. Her kanser türü, temelde hücrelerin aşırı ve kontrolsüz büyümesinden kaynaklanmaktadır. Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hormon tedavileri gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Sudhakar, 2009b).

Araştırmalar dünyada kanser sayısının 2040 yılına kadar yaklaşık 29 milyon kişiye ulaşacağını ve bu sayının gün geçtikçe artacağı yönündedir (Sung vd., 2021).

Platin bazlı kemoterapi ajanı olan sisplatin; testis kanseri, yumurtalık kanseri ve solid tümörler gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde uzun yıllardır önemli bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır (Ismail vd., 2023). Ancak, yüksek etkinliğine rağmen, sisplatin hasarı sıklıkla doz bağımlı yan etkilerle ilişkilidir ve bu yan etkiler arasında nefrotoksisite ve üreme toksisitesi öne çıkmaktadır.

Özellikle üreme çağındaki erkek kanser hastalarında sisplatin kaynaklı testis hasarı, önemli bir sağlık sorunu ve endişe kaynağıdır. Şimşek vd. yaptığı (Simsek vd., 2016) çalışmada sisplatin toksisitesinin temelinde; oksidatif stres, inflamasyon ve hücrel apoptoz gibi mekanizmalarının olduğunu bildirmiştir.

Bir başka çalışmada ise sisplatinin; spermatogenez yapısında bozulma, hormonal düzensizlik ve potansiyel kısırlık gibi ciddi problemlere yol açtığı belirtilmiştir (Casares vd., 2012).

Testis, yüksek hücre bölünme oranı ve metabolik aktivitesi nedeniyle sisplatin gibi kemoterapötik ajanlara karşı oldukça hassastır. Sisplatin uygulandığında, bu ajan testis dokusuna girer ve burada sitotoksik etkilerini, öncelikle platin-DNA adüktlerinin oluşumu yoluyla gösterir.

Bu adüktler, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe ederek hücreşel işlev bozukluğuna ve apoptoza neden olur. Bununla birlikte, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve bunlara bağılı olarak ortaya çıkan oksidatif stres de testis toksisitesine önemli ölçüde katkı sağladığı belirtilmiştir (Henkel, 2005).

Oksidatif stres, sisplatin kaynaklı testis hasarında belirleyici bir rol oynar. Yapılan çalışmalar, sisplatin uygulamasının testis hücrelerinde ROS üretimini artırdığını ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA parçalanması gibi zararlı etkilerin meydana geldiğini göstermiştir (Aly & Eid, 2020).

Çalışmamızda, sisplatin kaynaklı testis hasarının Krisin antioksidanı ile koruyucu etkileri incelenmiştir. Sisplatin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajan olup, özellikle testisler gibi hızlı bölünen hücrelerde oksidatif stres ve DNA hasarına yol açarak apoptoz (programlanmış hücre ölümü) mekanizmalarını tetikler. Öte yandan, Krisin gibi antioksidan bileşikler, hücrelerdeki oksidatif stresi nötralize ederek apoptoz sürecini inhibe edebilir ve hücreşel iyileşmeyi destekleyebilir.

Apoptozis, enerji bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşen ve doğal olarak meydana gelen bir hücre ölüm biçimi olup, nekroza kıyasla belirgin şekilde farklılık gösterir. Normal testis dokusunda, hücre ölümü ve hücre proliferasyonu arasında dinamik bir denge bulunur (Mogilner vd., 2006; Payabvash vd., 2008).

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, hücreşel homeostazın korunmasında kritik bir fizyolojik süreçtir (Tsung vd., 2005).

Histolojik çalışmalar, sisplatin hasarının ardından testis mimarisinde önemli yapısal değişiklikler gözlemlendiğini tutarlı bir şekilde ortaya koymuştur. En yaygın gözlemler bizim de incelediğimiz gibi germinal epitel dejenerasyonu, seminifer tübül atrofi ve germ hücrelerinin bozulmasıyla ortaya çıkmış durumlardır (Ateşşahin vd., 2006).

Yang ve arkadaşları, sisplatin uygulamasının deney hayvanlarında olumsuz etkilere yol açarak zamanla kilo kaybına neden olduğunu ve enerji metabolizmalarını bozduğunu bildirmiştir (Y. T. Kim vd., 2023).

Çalışmamızda son ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde sisplatin hasarının vücut ağırlığı üzerinde belirgin bir düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, sisplatin hasarının hücrel toksisite ve oksidatif stres yoluyla metabolik süreçleri olumsuz etkileyerek ağırlık kaybına yol açtığını ortaya koymaktadır.

Sisplatinin testis ağırlığını, seminifer tübül çapını ve alanını, spermatogenik seriye ait hücreleri azalttığı ve bu hücrelerin proliferasyonunu engellediği, aynı zamanda apoptoz oranını artırdığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Anand vd., 2015; Ateşşahin vd., 2006).

Deney hayvanları üzerinde yapılan başka bir çalışmada SP'nin sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

Çalışmamızda, sisplatin uygulamasının testis üzerindeki etkisiyle seminifer tübüllerde yapısal bozukluklar, vakuolizasyon, germinal epitellerde düzensizlikler ve tübül lümenlerinde hücre döküntüleri gözlemlenmiştir. Motilite üzerinde de olumsuz etkiler bulunmuştur.

Histopatolojik analizlerimize göre, testis dokusunda kontrol grubunda normal morfoloji gözlemlenmiştir. Normal histolojiye sahip Sertoli ve Leydig hücrelerinin yanı sıra, bol miktarda spermatogenik hücrelere rastlanmıştır. Sisplatin ile hasar verilen grubumuzda ise anormal histolojik yapılar ve bozulmalar görülmüştür. Primer ve sekonder spermatositlerin yanı sıra germ ve sperm hücrelerinin sayısında belirgin bir azalma ve tübül içerisinde dejenerasyon gözlemlenmiştir.

Kontrol grubunda tübül duvarındaki hücre yapıları düzgün şekilde sıralı haldedir. Sisplatin grubunda ise lümende immatür hücreler tespit edilmiş ve hücreler arası çokça vakuolizasyon görülmüştür.

Antioksidan ve sham gruplarımız, kontrol grubuna yakın özellikte genel görünüm sergilemiştir. Histolojik olarak düzensizlik görülmemiş ve ileri derece konjesyon ve yapısal bozukluklara rastlanmamıştır.

Krisin antioksidanı, sisplatin hasarının olumsuz etkilerini kısmi olarak düzeltmiş, Krisin ve Sisplatin+Krisin gruplarında, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p<0,001$). Krisin antioksidanının, serbest radikal hasarını engelleyerek hücre motilitesini artırıcı etkisi olduğu ve bunun sonucunda dokuların iyileşme süreçlerini hızlandırabileceği saptanmıştır.

Sisplatin tedavisi gören kanser hastalarında testis fonksiyonlarını korumak amacıyla yapılan klinik çalışmalar sınırlıdır, ancak bazı erken veriler, antioksidanların testiküler fonksiyonları iyileştirebileceğini göstermektedir. Birçok araştırma, özellikle Vitamin E, Vitamin C, N-Asetil Sistein (NAC), Beta Karoten ve Curcumin gibi bileşiklerin, sisplatin hasarını testisler üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Ceyhan vd., 2023; Tarladaçalışır vd., 2005; Zavala-Valencia vd., 2024) .

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini nötralize ederek oksidatif stresi azaltan maddelerdir. Ayrıca diğer görevleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev almalarıdır (Karabulut & Gülay, 2016a).

Zhou ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, doğal antioksidanların sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkileri incelenmiştir (Zhou vd., 2022). Çalışmada, hesperidin, kardamonin, naringenin ve likopen gibi birçok doğal antioksidanın nefrotoksisiteyi azaltmadaki etkinlikleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bu antioksidanların sisplatin hasarına karşı başarılı bir koruma sağladığını göstermiştir.

Bizim çalışmamızda ise, başka bir flavonoid grubu bileşiği olan Krisin'in antioksidan etkinliğini incelenmiştir. Ortaya konulan sonuçlar ile Krisin'in sisplatin kaynaklı toksik etkilere karşı kısmi koruyucu etkiye sahip olduğu kanısına varılmıştır.

Başka çalışmalarda krisinin karmaşık biyolojik etkileşimler yoluyla çeşitli sağlık yararları sağlayabileceğine dair önemli bilgilerde bulunmaktadır (Ciftci vd., 2012). Örneğin, bir çalışmada Krisin'in antikanser etkileri araştırılmıştır. Çalışmada Krisin'in kanser hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptoza (programlanmış hücre ölümü) neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bu etkiler, Krisin'in hücre döngüsünü durdurması ve apoptotik sinyal yollarını etkilemesi nedeniyle ortaya çıkmıştır (Salari vd., 2022).

Benzer şekilde, Krisin'in anti inflamatuvar etkileri araştırılmış, Krisin'in proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığı ve inflamasyonla ilişkili enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (Salehi vd., 2019).

Bulgularımızda Sisplatin+Krisin uygulanan gruplarda, yapısal bozuklukların Krisin ile kısmen düzeldiği gözlemlenmiştir. Sisplatin kaynaklı ortaya çıkması muhtemel olan hasarın kısmen azaldığı, sağlıklı hücre sayılarının korunduğu ve seminifer tübüller içerisindeki hücrelerde dejenerasyon düzeyinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, vakuolizasyonun hasar grubuna kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, Krisin'in sisplatin kaynaklı testis hasarını iyileştirmedeki potansiyel koruyucu etkisini desteklemektedir.

Çalışmamıza benzer olarak, Silici ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı deneyde, sisplatinin neden olduğu testis hasarına karşı arı sütünün antioksidan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada arı sütü; epididimal sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinde düzelme sağlamıştır (Silici vd., 2009).

Birçok çalışmada, sisplatin hasarının ERK yolu aracılığıyla kaspaz-3'ü aktive ettiği bildirilmiştir. Kaspaz kaskadı (biyokimyasal süreci), apoptozun indüklenmesinde kritik bir rol oynar; özellikle kaspaz-3 aktivasyonu, apoptoz sürecini başlatan geri dönüşümsüz bir aşama olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda, apoptozun değerlendirilmesinde Kaspaz-3 ekspresyonu sıklıkla bir biyomarker (belirteç) olarak kullanılmaktadır (Mercantepe vd., 2018).

Çalışmamızda, sisplatin hasarı uygulanan grupta kaspaz-3 pozitif hücre sayısının, kontrol grubundaki hücrelere kıyasla anlamlı derecede arttığını

gözlemledik ve immünohistokimyasal olarak inceledik. Tablo 3.10'da ve Şekil 3.20 görüldüğü üzere Sisplatin grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,001$) gösterilmiştir. Bu bulgu, sisplatinin apoptoz yolaklarını aktive ettiğini desteklemektedir. Bununla birlikte, diğer gruplarda, yani kontrol, sham ve antioksidan (krisin) uygulanan gruplarda bu etkinin minimize edildiği ortaya çıkmıştır.

Özellikle kontrol grubunda, kaspaz-3 pozitif hücre sayısının doğal bir seviyede olması, hücrelerin normal homeostatik süreçlerinin işlediğini göstermektedir. Sham grubunda ise, kontrole benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Krisin gibi antioksidanların, oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynadığı ve hücrelerin apoptozdan korunmasına yardımcı olabileceği literatürde yer alan bir bulgudur. Bu nedenle Krisin'in, Sisplatin tarafından tetiklenen Kaspaz-3 aktivasyonunu azaltması bizler için olumlu sonuçtur. Bu sonuç, Krisin gibi antioksidanların kemoterapötik tedavi sırasında hücreleri koruma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Sisplatin+Krisin grubunda ise kaspaz-3 pozitif hücre sayısında gözle görülen bir azalma meydana geldiği saptanmıştır. Bu bulgunun, Krisin antioksidanının, oksidatif stresin azaltılmasına ve dolayısıyla apoptozun engellenmesiyle ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

Sisplatin hasarının hasar görmüş dokularda apoptotik hücrelerin yoğun bir şekilde bulunduğu, özellikle kaspaz-3 pozitif hücrelerin sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Oluşan hasarın, testislerdeki etkinin oldukça geniş olduğunu söylemek mümkündür. Hem hücresel hem de organ düzeyinde belirgin bir hasar ortaya çıkmıştır. Görülen doku hasarları, morfolojik ve motilite anlamındaki düşüş, bu süreçlerin birleşimi, erkek üreme sağlığında kalıcı ve uzun vadeli bozulmalara yol açabilecek ciddi etkiler yaratmaktadır.

Krisin uygulanmasıyla birlikte; histolojik incelemelerde, hücrelerin daha az apoptotik işaretler gösterdiği, daha düzenli bir hücresel yapı sergilediği gözlemlenmiştir. Bu durum, Krisin'in oksidatif stresi düşürerek hücre ölümünü

azalttığını ve testis dokusunun yapısını koruyarak fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğunu göstermektedir. Krisin antioksidanının, testislerdeki doku hasarını onarıcı etkilerinin yanı sıra, sperm motilitesini koruma ile de erkek üreme sağlığını desteklediği düşüncesindeyiz.

Motilite analizlerimizin sonuçları, sisplatin uygulamasının hücre hareketliliğini belirgin şekilde azalttığını göstermektedir. Kontrol ve Sham gruplarına kıyasla Sisplatin grubunda hücrelerin ileri yönlü hareketliliği önemli ölçüde düşmüştür ($p<0,001$). Bu bulgu, sisplatin hasarının hücre motiliteyi bozduğunu ve oksidatif stresin etkileriyle hücre hareketliliğini kısıtladığını göstermektedir.

Ek olarak yapmış olduğumuz Johnsen skorlaması genel olarak testis fonksiyonunun durumunu ve antioksidan etkinliğini göstermiştir. Kontrol ve Sham grupları, sırasıyla 8-10 arasında değişen Johnsen skorları ile sağlıklı testis fonksiyonlarını korurken, Krisin grubu, oksidatif stresin azalması ve spermatogenezdeki iyileşme ile daha yüksek Johnsen skorları (7-9) gösterdi.

Bu bulgular, Krisin'in antioksidan özelliklerinin testis dokusunda olumlu bir etki yarattığını ve spermatogenez sürecini desteklediğini ortaya koymaktadır. Ancak, sisplatin hasarı alan grup, 4-6 arasında değişen düşük skorlar ile spermatogenetik aktivitenin bozulduğunu ve testislerde ciddi hasar oluştuğunu net bir şekilde göstermiştir. Bu grup, sperm motilitesi açısından belirgin düşüşler sergileyerek, sisplatinin toksik etkilerinin sperm fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediğini doğrulamaktadır.

Sisplatin + Krisin grubunda ise, Krisin'in antioksidan etkilerinin sisplatin kaynaklı hasarı kısmi olarak iyileştirdiği ve testis fonksiyonlarını koruduğu gözlemlenmiştir. Bu grup, 6-8 arasında değişen skorlar ile kontrol ve Sham gruplarına daha yakın değerler göstermiştir. Sonuç olarak, bu bulgular, Krisin antioksidanının testis fonksiyonlarının korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini bizlere göstermiştir.

Çalışmamızı biyokimyasal olarak incelediğimizde, gerçekleştirdiğimiz tiyol-disülfid testinin bulgularının, elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olduğunu gördük.

Native tiyol düzeyleri bakıldığında sisplatin grubunda, native tiyol seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düştüğü gözlemlenmiştir ($p<0,001$). Native tiyoller, hücrel savunma mekanizmalarının temel bileşenlerinden biridir ve oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilir. Sisplatin hasarının oksidatif stres yaratarak serbest tiyol gruplarının oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu durum, sisplatin hasarının redoks dengesini bozarak hücrel savunma kapasitesini azalttığını ve hücrelerin oksidatif hasara karşı savunmasız hale geldiğini göstermektedir.

Krisin grubunda ise native tiyol seviyelerinin daha yüksek olduğu, krisin antioksidanının oksidatif strese karşı koruyucu bir etkisi olduğunu ve bu antioksidanın, sisplatin hasarının yol açtığı zararları kısmen dengelediğini ortaya koymaktadır. Krisin, hücrelerdeki serbest tiyol gruplarını koruyarak hücrel savunmayı güçlendirmiştir.

Disülfid düzeyleri bakımından incelendiğinde, özellikle sisplatin grubunun, kontrol ve sham gruplarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, sisplatin hasarının, serbest tiyol gruplarını oksitleyerek disülfid bağlarını artırdığı ve oksidatif stresin bir sonucu olarak hücrelerdeki redoks dengesini bozduğu anlamına gelmektedir. Disülfid bağları, oksidatif stresin ve hücrel hasarın bir göstergesi olarak kabul edilir, bu yüzden sisplatin hasarının hücrel oksidatif hasara yol açtığı ve bu süreçte disülfid bağlarının arttığı istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Bunun aksine, Krisin antioksidanı, disülfid düzeylerini kontrol altına alarak oksidatif hasarı azaltmış ve hücrel savunmayı artırmıştır.

Index tiyol seviyelerine bakıldığında ise hücrel oksidatif stresin ve redoks dengesinin genel bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Sisplatin grubunda, index tiyol seviyeleri hem kontrol hem de Sham gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde düşmüştür ($p<0,003$). Bu bulgu, sisplatin hasarının oksidatif stres yaratmada etkili olduğunu ve hücrel redoks dengesini bozduğunu ortaya koymaktadır.

Krisin ise index tiyol seviyelerini artırarak, oksidatif stresin etkilerini kısmi olarak dengelemiş ve hücrel savunma mekanizmalarını desteklemiştir. Bu sonuçlar, krisin antioksidanının oksidatif stresin engellenmesinde ve sisplatin hasarının yol açtığı biyokimyasal değışikliklerin azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, sisplatin hasarının neden olduğu testis hasarına karşı Krisin'in antioksidan etkisi, histolojik ve biyokimyasal analizlerle bir iyileşme sağlamıştır. Histolojik incelemelerde, Krisin antioksidanının, sisplatinin neden olduğu testis doku bozulmalarını, hücresel düzeyde kısmi olarak koruduğu ve morfolojik düzelme sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, immünohistokimyasal analizler, Krisin'in oksidatif stresin azalmasına katkı sağladığını ve bu sayede testis dokusunda apoptotik hücrelerin sayısının azaldığını ortaya koymuştur. Biyokimyasal olarak ise, Krisin'in tiyol-disülfid dengesi üzerindeki olumlu etkileri, antioksidan kapasitenin artışı ve serbest radikal hasarının azaldığını göstermektedir. Bu bulgular, Krisin'in sisplatin kaynaklı testis hasarını hafifletmede ve spermatogenez sürecini desteklemede potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

Krisin'in etkilerinin daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi için uzun vadeli ve daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, farklı dozajlar ve tedavi süreleri ile Krisin'in etkinliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için klinik ve preklinik araştırmalar yapılmalıdır. Bu tür çalışmalar, gelecekteki tedavi stratejileri için önemli bir temel oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- Aksu, E. H., Kandemir, F. M., Küçükler, S., & Mahamadu, A. (2018). Improvement in colistin-induced reproductive damage, apoptosis, and autophagy in testes via reducing oxidative stress by chrysin. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(11). <https://doi.org/10.1002/JBT.22201>
- Aly, H. A. A., & Eid, B. G. (2020). Cisplatin induced testicular damage through mitochondria mediated apoptosis, inflammation and oxidative stress in rats: impact of resveratrol. *Endocrine journal*, 67(9), 969-980. <https://doi.org/10.1507/ENDOCRJ.EJ20-0149>
- Anand, H., Misro, M. M., Sharma, S. B., & Prakash, S. (2015). Protective effects of Eugenia jambolana extract versus N-acetyl cysteine against cisplatin-induced damage in rat testis. *Andrologia*, 47(2), 194-208. <https://doi.org/10.1111/AND.12247>
- Arıncı, K., & Elhan, A. (2020). *Anatomi 1-2 (7.)*. Güneş Tıp Kitabevi.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. Ş., & Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369. <https://doi.org/10.17343/sdutfd.566969>
- Astolfi, L., Ghiselli, S., Guaran, V., Chicca, M., Simoni, E., Olivetto, E., Lelli, G., & Martini, A. (2013). Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation. *Oncology reports*, 29(4), 1285-1292. <https://doi.org/10.3892/OR.2013.2279>
- Ateşşahin, A., Şanna, E., Türk, G., Çeribaşı, A. O., Yılmaz, S., Yüce, A., & Bulmuş, Ö. (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of pineal research*, 41(1), 21-27. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2006.00327.X>
- Batıslam, E., & M. Murad, B. (2004). Erkek Üreme Sisteminin Anatomisi. Türk Androloji Derneği Yayınları.
- Bulduk, O., & Cengiz, N. (2015). İnfertiliteye Morfolojik Bakış: Sperm Baş Defektleri Ve Fertilizasyon. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi*, 2(2), 78-87. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/muskutd/issue/34649/382833>
- Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Russo, G. I., & Vignera, S. La. (2017). Conservative Nonhormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *BioMed Research International*, 2017, 4650182. <https://doi.org/10.1155/2017/4650182>
- Caroppo, E. (2011). Male reproductive medicine: anatomy and physiology. *An Introduction to Male Reproductive Medicine*, 1-28. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511736254.002>
- Carter, S. K., & Goldsmith, M. (1974). The Development and Clinical Testing of New Anticancer Drugs at the National Cancer Institute — Example cis-Platinum (II) Diamminedichloride (NSC 119 875). *Recent Results in Cancer Research*, No. 48, 137-144. https://doi.org/10.1007/978-3-642-49306-5_9
- Casares, C., Ramírez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldán, A., Jorge, E., & García-Berrocal, J. (2012). Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: Review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(12), 2455-2459. <https://doi.org/10.1007/S00405-012-2029-0>

- Ceyhan, A., Baran, M., Suna, P. A., Mat, Ö. C., & Yay, A. (2023). Comparison of effects of curcumin and beta-carotene on ovarian damage caused by cisplatin. *Cukurova Medical Journal*, 48(4), 1248-1257. <https://doi.org/10.17826/CUMJ.1345688>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1459. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0024>
- Cırık, R. H. (2022). Sıçanlarda sisplatinin meydana getirdiği testis hasarı üzerine D vitamini etkisinin araştırılması.
- Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., & Beytur, A. (2012). Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia*, 44(3), 181-186. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2010.01127.X>
- Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T. (1997). Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/ Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma Reactive Oxygen Particles And Antioxidant Defence. İçinde *Office Journal of the Turkish Nephrology, Association* (C. 3, Sayı 4).
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.07.025>
- Del Fabbro, L., Jesse, C. R., de Gomes, M. G., Borges Filho, C., Donato, F., Souza, L. C., Goes, A. R., Furian, A. F., & Boeira, S. P. (2019). The flavonoid chrysin protects against zearalenone induced reproductive toxicity in male mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 165, 13-21. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2019.04.004>
- Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430-1435. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.10.031>
- Dilek, İ. (2010). *Kemoterapide Toksisite Değerlendirmesi*. 63, 3-7.
- Drake, R. L., Vogl, Wayne, A., & Mitchell, A. W. M. (2009). Gray's Anatomy for Students, 2nd Edition. *Elsevier Health Sciences*, 2, 1136. https://books.google.com/books/about/Gray_s_Anatomy_for_Students_E_Book.html?hl=tr&id=_ozrqnzzhFwC
- Eldutar, E., Kandemir, F. M., Kucukler, S., & Caglayan, C. (2017). Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant-antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(11). <https://doi.org/10.1002/JBT.21960>
- Erel, O., & Neselioglu, S. (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical biochemistry*, 47(18), 326-332. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2014.09.026>
- Fouad, A. A., Qutub, H. O., Fouad, A. E. A., Audeh, A. M., & Al-Melhim, W. N. (2017). Epigallocatechin-3-gallate counters cisplatin toxicity of rat testes. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1710-1714. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1322618>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, 96, 1-17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015.-Mam>
- Henkel, R. (2005). The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia*, 37(6), 205-206. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2005.00699.X>

- Ismail, H. Y., Shaker, N. A., Hussein, S., Tohamy, A., Fathi, M., Rizk, H., & Wally, Y. R. (2023). Cisplatin-induced azoospermia and testicular damage ameliorated by adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biological Research*, 56(1), 2. <https://doi.org/10.1186/S40659-022-00410-5>
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1(1), 2-25. <https://doi.org/10.1159/000178170>
- Jones, O. (2023, Ekim 15). *The Testes and Epididymis - Structure - Vasculature - TeachMeAnatomy*. <https://teachmeanatomy.info/pelvis/the-male-reproductive-system/testes-epididymis/>
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016a). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 2-3. <https://doi.org/10.24880/MAEUVFD.260790>
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016b). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1). <https://dergipark.org.tr/tr/pub/maeusabed/issue/24655/260783>
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 7(8), 307-320. <https://doi.org/10.1038/NRC2167>
- Kızılay, F., & Altay, B. (2019). Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları Spermatogenesis, spermiogenesis and clinical reflections. *Androl Bul*, 21, 177-184. <https://doi.org/10.24898/tandro.2019.27443>
- Kierszenbaum, A. L. (2020). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* (R. Demir, Ed.; 4.). Palme Yayınevi.
- Kim, C., & Kim, B. (2018). Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/NU10081021>
- Kim, Y. T., Park, B. S., Yang, H. R., Yi, S., Nam-Goong, I. S., & Kim, J. G. (2023). Exploring the potential hypothalamic role in mediating cisplatin-induced negative energy balance. *Chemico-Biological Interactions*, 385, 110733. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2023.110733>
- King, D. (2023). *Histology at SIU, Testis*. <https://histology.siu.edu/erg/testis.htm>
- Kucukler, S., Benzer, F., Yildirim, S., Gur, C., Kandemir, F. M., Bengu, A. S., Ayna, A., Caglayan, C., & Dortbudak, M. B. (2021). Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Lead Acetate in Rat Kidneys: a Biochemical and Histopathological Approach. *Biological trace element research*, 199(4), 1501-1514. <https://doi.org/10.1007/S12011-020-02268-8>
- Küçükler, S., Özdemir, S., Çomaklı, S., Kandemir, F. M., İzoniazid, R., Akciğer, K., Karşı, H., & Etkileri, K. (2020). Effects of Chrysin Against Isoniazid-Induced Lung Injury in Rats. *Kocatepe Veterinary Journal Kocatepe Vet J*, 13(2), 161-171. <https://doi.org/10.30607/kvj.709842>
- Mani, R., & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145, 187-196. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2017.09.016>
- Mercantepe, T., Unal, D., Tümkaya, L., & Yazici, Z. A. (2018). Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3404. <https://doi.org/10.3892/ETM.2018.5819>
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas* (15. bs).

- Milikowski, C., & Berman, I. (1997). *Color Atlas of Basic Histopathology* (First Edition). McGraw-Hill/Appleton & Lange.
- Mogilner, J. G., Elenberg, Y., Lurie, M., Shiloni, E., Coran, A. G., & Sukhotnik, I. (2006). Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia-reperfusion injury in the rat. *Fertility and sterility*, 85 Suppl 1(SUPPL. 1), 1111-1117. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2005.10.021>
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2016). *Moore - Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi* (H. DALÇIK, Ed.; 10.). Nobel Tıp Kitabevi.
- Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., Iahtisham-Ul-Haq, IqraYasmin, Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Shah, Z. A., Plygun, S., & Heydari, M. (2019). Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sciences*, 235, 116797. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.116797>
- Oliveira Filho, A. B., Souza, R. S., Azeredo-Oliveira, M. T., Peruquetti, R. L., & Cedenho, A. P. (2010). Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genetics and molecular research : GMR*, 9(3), 1405-1413. <https://doi.org/10.4238/VOL9-3GMR860>
- Öğüt, S. (2014). Doğal Antioksidanların Önemi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 25-30. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/aduziraat/issue/26419/278140>
- Payabvash, S., Kiumehr, S., Tavangar, S. M., & Dehpour, A. R. (2008). Ethyl pyruvate reduces germ cell-specific apoptosis and oxidative stress in rat model of testicular torsion/detorsion. *Journal of pediatric surgery*, 43(4), 705-712. <https://doi.org/10.1016/J.JPESURG.2007.12.063>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2014). *Histology: A Text and Atlas* (B. Baykal, Ed.; 6.). Palme Yayıncılık.
- Sadler, T. W. (2005). *TW Sadler: Langman's Medikal Embriyoloji* (A. C. Başaklar, Ed.; 9.). Palme Yayıncılık.
- Salari, N., Faraji, F., Jafarpour, S., Faraji, F., Rasoulpoor, S., Dokaneheifard, S., & Mohammadi, M. (2022). Anti-cancer Activity of Chrysin in Cancer Therapy: a Systematic Review. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 13(4), 681. <https://doi.org/10.1007/S13193-022-01550-6>
- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/PH12010011>
- Satar, D. A., & Gençdal, S. (2013). Sperm Değerlendirmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 532-542. <https://doi.org/10.17827/AKTD.29343>
- Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R., & Francis-West, P. H. (2015). *Larsen's Human Embryology* (5th Edition).
- Sherif, I. O., Abdel-Aziz, A., & Sarhan, O. M. (2014). Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28(11), 515-521. <https://doi.org/10.1002/JBT.21593>
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G., & Demirtas, A. (2009). Antioxidative Effect of Royal Jelly in Cisplatin-induced Testes Damage. *Urology*, 74(3), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.05.024>
- Simsek, N., Koc, A., Karadeniz, A., Yildirim, M. E., Celik, H. T., Sari, E., & Kara, A. (2016). Ameliorative effect of selenium in cisplatin-induced testicular damage in rats. *Acta histochemica*, 118(3), 263-270. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2016.02.002>

- Sudhakar, A. (2009a). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), i-iv. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000E2>
- Sudhakar, A. (2009b). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 01(02), i-iv. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Şener, G., & Yeğen, B. Ç. (2009). *İskemi Reperfüzyon*. https://klinikgelisim.org.tr/kg22_3/2.pdf
- Tarladaçalışır, Y. T., Uygun, M., Akpolat, M., & Uz, Y. H. (2005). E ve C Vitaminlerinin Cisplatin Hepatotoksitesini Önlemedeki Etkilerinin Histolojik Olarak İncelenmesi. *Balkan Medical Journal*, 2005(3), 124-131. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bmj/issue/3749/49839>
- Tharmalingam, M. D., Matilionyte, G., Wallace, W. H. B., Stukenborg, J. B., Jahnukainen, K., Oliver, E., Goriely, A., Lane, S., Guo, J., Cairns, B., Jorgensen, A., Allen, C. M., Lopes, F., Anderson, R. A., Spears, N., & Mitchell, R. T. (2020). Cisplatin and carboplatin result in similar gonadotoxicity in immature human testis with implications for fertility preservation in childhood cancer. *BMC medicine*, 18(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/S12916-020-01844-Y>
- Titi-Lartey, O. A., & Khan, Y. S. (2023). Embryology, Testicle. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557763/>
- Tsung, A., Kaizu, T., Nakao, A., Shao, L., Bucher, B., Fink, M. P., Murase, N., & Geller, D. A. (2005). Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation*, 79(2), 196-204. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000151681.07474.2E>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2005.12.009>
- Young, B., Woodford, P., & O'Dowd, G. (2014). Wheater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas (6.).
- Yucel, C., Arslan, F. D., Ekmekci, S., Ulker, V., Kisa, E., Yucel, E. E., Ucar, M., Ilbey, Y. O., Celik, O., Basok, B. I., & Kozacioglu, Z. (2019). Protective Effect of All-Trans Retinoic Acid in Cisplatin-Induced Testicular Damage in Rats. *The World Journal of Men's Health*, 37(2), 249. <https://doi.org/10.5534/WJMH.180105>
- Zavala-Valencia, A. C., Velasco-Hidalgo, L., Martínez-Avalos, A., Castillejos-López, M., & Torres-Espindola, L. M. (2024). Effect of N-Acetylcysteine on Cisplatin Toxicity: A Review of the Literature. *Biologics: Targets & Therapy*, 18, 7. <https://doi.org/10.2147/BTT.S438150>
- Zhou, J., Nie, R. C., Yin, Y. X., Cai, X. X., Xie, D., & Cai, M. Y. (2022). Protective Effect of Natural Antioxidants on Reducing Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Disease Markers*, 2022, 1612348. <https://doi.org/10.1155/2022/1612348>

EKLER

EK 1 Deney Hayvanları Etik Kurulu İzni



T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 14
Konu: Kararlar

26.5/2023

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Sıçanlarda cisplatinle indüklenen testiküler hasara karşı krisin'in etkisi.
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	The effect of chrysin on testicular injury induced by cisplatin in rats.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Dr.Öğr.Üyesi Aslıhan ŞAYLAN
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Yük.Lis.Öğr.Atınc KALAYCI, Doç.Dr.Ayhan Çetinkaya, Doç.Dr.Murat ALIŞIK
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi.

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2023/12	Tarih (Date): 17.05.2023
	Dr.Öğr.Üyesi Aslıhan ŞAYLAN'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 40 adet sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof.Dr. İdris TÜREL (Başkan)	Farmakoloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Seyit Ali KAYIŞ (Başkan Yardımcısı)	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cerrahi AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Uğur ÜYETÜRK (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Mustafa DİLEK (Üye)	Çocuk Hastahkları AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Ayhan ÇETINKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Özgür Mehmet YİS (Üye)	Biyokimya AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTURK (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr Öğr. Üyesi Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr Öğr. Üyesi Canan AKÜNAL TÜREL (Üye)	Nöroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr Öğr.Üyesi Ömer Faruk BOYLU (Üye)	Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi	
Veteriner Hekim Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Veteriner Hekim Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİÇ AŞ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC.Üyesi)	Avukat	Aşağı Soku Mah. Şair Şinasi Sok. Ayşe Hanım Apt.24/6 BOLU	