

T.C.
KARADENİZ TEKNİK
ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA GENTAMİSİN İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL TESTİS HASARI ÜZERİNE
KURKUMİNİN ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Tenzile Beyza DURMUŞ

TRABZON-2024

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK
ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA GENTAMİSİN İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL TESTİS HASARI ÜZERİNE
KURKUMİNİN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Tenzile Beyza DURMUŞ

Tez Danışmanı Prof. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON-2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimde bilgisiyle ve tecrübesiyle yanımda olan, desteğini hissettiren tez danışmanım Prof. Dr. Esin YULUĞ hocama, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitim hayatım boyunca her türlü kolaylığı sağlayıp, desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Engin YENİLMEZ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Doç. Dr. Gökçen Kerimoğlu, Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik bölümünden Doç. Dr. Selim DEMİR hocalarıma, desteklerini ve yardımlarını her zaman yanımda hissettiren çok kıymetli bölüm arkadaşlarım Uzm. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Uzm. Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN, Arş. Gör. Dr. Elif KOYUN ALVUROĞLU, Arş. Gör. Dr. Semanur IŞIK, Arş. Gör. Dr. Esmâ Betül KARA, Arş. Gör. Dr. Seval KUVVET KURT, Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN, Doktora Öğrencisi Ali KULABER ve Moleküler Biyolog Ayşen Cemre AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni saygı ve sevgiyle karşılayan, üzerlerimdeki emeği çok büyük olan, varlıklarıyla beni mutlu eden annem Ayten DURMUŞ, babam Mustafa DURMUŞ ve kardeşim Alperen DURMUŞ'a teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Tenzile Beyza DURMUŞ

ÖZET

Sıçanlarda Gentamisin İle Oluşturulan Deneysel Testis Hasarı Üzerine Kurkuminin Etkileri

Bu çalışmada gentamisin testis üzerindeki oksidatif stres rolünü ve oluşturduğu histopatolojik değişiklikleri belirlemek; antioksidan olan kurkuminin ise koruyucu etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük 0,5 ml Dimetil Sülfoksit (%70) uygulandı. Gentamisin grubuna deneyin 1. gününden itibaren başlanarak 7 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal gentamisin uygulandı. Kurkumin grubuna deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük 10 mg/kg olacak şekilde 0,5 ml Dimetil Sülfoksit (%70)'da çözdürülmüş kurkumin intraperitoneal uygulandı. Gentamisin+Kurkumin grubuna deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük intraperitoneal 10 mg/kg olacak şekilde 0,5 ml Dimetil Sülfoksit (%70)'da çözdürülmüş kurkumin ve 100 mg/kg dozunda intraperitoneal gentamisin uygulandı. Denekler deneyin 1. ve 8. gününde tartıldı. Deneyin 8. gününde anestezi altındayken deneklere dekapitasyon uygulandı. Histolojik değerlendirmeler için sol testis; biyokimyasal değerlendirmeler için sağ testis kullanıldı. Sol epididimis total sperm sayısı, vitalite, motilite ve morfolojik analizler için değerlendirildi. Sağ epididimis ise histolojik değerlendirmeler için kullanıldı. Elde edilen sağ epididimis dokularına Hematoksilen&Eozin; sol testis dokularına ise Hematoksilen&Eozin, Masson Trikrom, Periyodik Asit-Schiff ve terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)- deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling assay (TUNEL) boyamaları yapıldı. Yapılan tartım sonuçlarıyla vücut ve testis kütle analizlerine ulaşıldı. Hematoksilen&Eozin incelemelerinde mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül uzunluğu, total seminifer tübül yüzey alanı, total Sertoli hücre sayısı, gram başına düşen Sertoli hücre sayısı, total Leydig hücre sayısı, birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı, total round spermatid sayısı, günlük sperm üretimi, gram başına düşen günlük sperm üretimi, seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı, Modifiye Johnsen skorlaması, germinal epitelde ayrılma parametrelerine

bakıldı. Masson Trikrom boyama incelemelerinde interstisyel alanda bağ doku artışı, interstisyel alanda ödem, tunica albuginea kalınlığı incelendi. Periyodik Asit-Schiff boyamasında bazal membran hasar skorlaması yapıldı. TUNEL boyama bulgularında gruplara ait apoptotik indeks hesaplandı. Biyokimyasal incelemelerde testiküler dokuda malondialdehit, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α), myeloperoksidaz, kaspaz-3, total oksidatif durum, total antioksidan durum ve oksidatif stres indeks seviyeleri analiz edildi.

Elde edilen sonuçlar gentamisin testiste fizyolojik, histolojik ve biyokimyasal olarak hasara neden olduğunu; antioksidan ajan olarak verilen kurkuminin bozulan parametrelerin neredeyse hepsinde, çoğu zaman kısmi bazen ise tama yakın düzeltmeler yaptığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Gentamisin, kurkumin, testis, sperm analizi, oksidatif stres

Bu çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje kodu: TTU-2023-10978.

SUMMARY

Effects of Curcumin on Gentamicin-Induced Experimental Testicular Injury in Rats

The aim of this study was to determine the role of oxidative stress and histopathologic changes caused by gentamicin on testis and to investigate whether curcumin, an antioxidant, has protective effects.

In the study, 24 male Sprague Dawley rats were divided into 4 groups. Control group was treated with 0.5 ml Dimethyl Sulfoxide (70%) daily for 7 days starting from the 1st day of the experiment. Gentamicin group was administered intraperitoneal gentamicin at a dose of 100 mg/kg daily for 7 days starting from the 1st day of the experiment. Curcumin group received curcumin dissolved in 0.5 ml Dimethyl Sulfoxide (70%) at a daily dose of 10 mg/kg for 7 days starting from the 1st day of the experiment. Gentamicin+Curcumin group received curcumin dissolved in 0.5 ml Dimethyl Sulfoxide (70%) at a dose of 10 mg/kg intraperitoneally and gentamicin at a dose of 100 mg/kg intraperitoneally for 7 days starting from day 1 of the experiment. The subjects were weighed on the 1st and 8th day of the experiment. On the 8th day of the experiment, the subjects were decapitated under anesthesia. Left testis was used for histological evaluations and right testis was used for biochemical evaluations. The left epididymis was evaluated for total sperm count, vitality, motility and morphological analysis. The right epididymis was used for histologic evaluations. The right epididymis tissues were stained with Hematoxylin & Eosin and the left testis tissues were stained with Hematoxylin & Eosin, Masson Trichrome, Periodic Acid-Schiff and terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling assay (TUNEL) stains. Body and testicular mass analyses were obtained from the weighing results. Absolute seminiferous tubule volume, total seminiferous tubule length, total seminiferous tubule surface area total Sertoli cell count, Sertoli cell count per gram, total Leydig cell count, Leydig cell count per unit volume, total round spermatid count, daily sperm production, daily sperm production per gram, seminiferous tubule diameter, germinal epithelial thickness, germinal epithelial thickness / seminiferous tubule diameter, Modified Johnsen scoring, germinal epithelial separation parameters were

examined. In Masson Trichrome staining examinations, connective tissue increase in the interstitial area, edema in the interstitial area, and tunica albuginea thickness were examined. Basement membrane damage scoring was performed in Periodic Acid-Schiff staining. Apoptotic index of the groups was calculated in TUNEL staining findings. Malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione, 8-OHdG, TNF- α , myeloperoxidase, caspase-3, total oxidative status, total antioxidant status and oxidative stress index levels were analyzed in testicular tissue.

The results showed that gentamicin caused physiologic, histologic and biochemical damage in the testis, while curcumin given as an antioxidant agent corrected almost all of the impaired parameters, often partially and sometimes almost completely.

Keywords: Gentamicin, curcumin, testis, sperm analysis, oxidative stress

This study was supported by KTU Scientific Research Projects Coordination Unit. Project code: TTU-2023-10978.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Morfolojisi	3
2.1.1. Testis Embriyolojisi	3
2.1.2. Testis Anatomisi.....	5
2.1.3. Testis Histolojisi	8
2.2. Epididimis Morfolojisi.....	14
2.3. Gentamisin	14
2.3.1. Genel Bilgiler.....	14
2.3.2. Gentamisinin Antibakteriyal Spektrumu ve Klinik Kullanım Alanları	17
2.3.3. Gentamisin Kullanılış Yolları	17
2.3.4. Gentamisinin Yan Etkileri	18
2.4. Apoptozis	19
2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	21
2.6. Kurkumin	23
3. MATERYAL-METOD	26
3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği.....	26
3.2. Deney Hayvanları ve Deneysel Çalışma Planı.....	26
3.3. Deneklerin Tartılması, Dekapitasyonu ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	28
3.4. Histolojik Prosedür	29
3.4.1. Davidson Fiksativi (DF) Solüsyonunun Hazırlanması	29
3.4.2. %10'luk Formaldehit Fiksasyon Solüsyonunun Hazırlanması.....	29
3.4.3. Dokuların Işık Mikroskopunda İncelenmesi İçin Hazırlanması	29
3.4.4. Hematoksilen & Eozin Boyama.....	30
3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama	37
3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi.....	38
3.4.7. Sperm Vitalite, Hareketlilik, Sayı ve Morfolojinin Değerlendirilmesi	39

3.4.8. Tris Tamponun Hazırlanması	40
3.4.9. İmmünohistokimyasal Boyama İşlemleri	40
3.5. Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri.....	42
3.5.1. Doku Numunelerin Hazırlanışı	42
3.5.2. Doku Numunelerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi	43
3.5.3. Doku Malondialdehit (MDA) Seviyelerinin Belirlenmesi	43
3.5.4. Doku MDA Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	43
3.5.5. Doku MDA Ölçümü	44
3.5.6. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi	45
3.5.7. Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi	45
3.5.8. Doku Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi	46
3.5.9. Doku 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) Seviyelerinin Belirlenmesi	47
3.5.10. Doku Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi	47
3.5.11. Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi	48
3.5.12. Doku Kaspaz-3 (CASP3) Seviyelerinin Belirlenmesi	49
3.5.13. Doku Örneklerinde Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi	50
3.5.14. Doku Örneklerinde Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi	50
3.5.15. Doku Örneklerinde Oksidatif Stres İndekslerinin (OSI) Hesaplanması	50
3.6. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Dair Bulgular	52
4.2. Histopatolojik Bulgular	55
4.2.1. Hemotoksilen & Eozin Boyama Bulguları	55
4.2.2. Masson Trikrom Boyama Bulguları	74
4.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyama Bulguları	84
4.2.4. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	90
4.2.5. Epididim Dokusuna ait Hematoksilen & Eozin Boyama Bulguları	93
4.3. Sperm Analiz Bulguları	96
4.3.1. Toplam Sperm Sayısı, Motilite ve Vitalite Bulguları	96
4.3.2. Teratozoospermik İndeks	98
4.3.3. Baş, Boyun, Sitoplazmik Droplet ve Kuyruk Değerlendirmeleri	100
4.4. Biyokimyasal Bulgular	102
4.4.1. Doku MDA Seviyeleri	102
4.4.2. Doku SOD Seviyeleri	104
4.4.3. Doku GPX Seviyeleri	105

4.4.4. Doku GSH Seviyeleri.....	107
4.4.5. Doku 8-OHdG seviyeleri	108
4.4.6. Doku TNF- α seviyeleri	110
4.4.7. Doku MPO seviyeleri.....	111
4.4.8. Doku Kaspaz-3 seviyeleri	113
4.4.9. Doku TOS seviyeleri.....	114
4.4.10. Doku TAS seviyeleri.....	116
4.4.11. Doku OSI seviyeleri.....	117
5. TARTIŞMA.....	119
6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	130
7.KAYNAKLAR.....	132



KISALTMALAR DİZİNİ

A:Arteria

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive eden faktör

AUG: tRNA nın başlama kodonu

BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

°C: Santigrat derece

CASP3: Kaspaz-3

COX: Siklooksijenaz

CRM: Kurkumin

cm: Santimetre

Cu: Bakır

CV: Varyasyon katsayısı

D: Sertoli hücre çekirdek çapı

Dazl: Deleted in Azoospermia

DF: Davidson Fiksatif

Dutp: Deoxyuridinetriphosphate

DMSO: Dimetil-Sulfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FADD: Fasla ilişkili ölüm proteini

FSH: Folikül uyarıcı hormon

g: Gram

GEN: Gentamisin

GPx: Glutasyon Peroksidaz

GSH: Glutasyon

H&E: Hematoksilen & Eozin

HCl: Hidrojen klorür

HDL: High density lipoprotein

H₂O₂: Hidrojen peroksit

H₃PO₄: Fosforik asit

kg: Kilogram

Ig: İmmünglobulin

IL: İnterlökin

i.m.: İntramüscüler

i.p.: İnteraperitoneal

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

i.v.: İntravenöz

KTÜ: Karadeniz Teknik Üniversitesi

K: Kontrol

L:total seminifer tübül uzunluğu

LDL: Low density lipoprotein

M: Molar

mg: Miligram

MDA: Malondialdehit

ml: Mililitre

µm:Mikrometre

µmol:Mikromol

Mn: Mangan

MPO: Miyeloperoksidaz

N: Nervus

NAIP: Nöronal apoptoz inhibitör protein

n: düzeltilmiş Sertoli hücre sayısı

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

ng: Nanogram

nmol: nanomole

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

PAS: Periyodik Asit-Schiff

PBS: Fosfat tamponu

pg: Pikogram

r: Ortalama yarıçap

ROS: Reaktif oksijen türleri

S: total seminifer tübül yüzey alanı

SOD: Süperoksit Dismutaz

SRY: Sex determining region on chromosome Y

TAS: Toplam Antioksidan Durum

TBA: Tiyoarbitürik asit

TDF: Testis Belirleyici Faktör

TDI: deoxynucleotidyl transferase

TKİ: Testis Kütle İndeksi

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör-Alfa

TOS: Toplam Oksidan Durum

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick endlabeling assay

V: Mutlak seminifer tübül hacmi

V: Vena

Zn: Çinko

8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

WHO: World Health Organization

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Standart doku takip prosedürü	30
Tablo 2: Hematoksilen & Eozin boyama protokolü.....	31
Tablo 3: Deparafinizasyon protokolü.....	37
Tablo 4: Periyodik Asit-Schiff boyama protokolü	38
Tablo 5: Masson Trikrom boyama protokolü	39
Tablo 6: TUNEL boyama protokolü	42
Tablo 7: Deneyin 1. günü ve 8. günü grupların vücut ağırlığı.....	52
Tablo 8: Deney sonu grupların testis ağırlıkları.....	53
Tablo 9: Deney sonu grupların testis/kütle indeksleri.....	54
Tablo 10: Deney sonu grupların mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül uzunluğu, total seminifer tübül yüzey alanı değerleri.....	56
Tablo 11: Deney sonu grupların total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı	58
Tablo 12: Deney sonu grupların total Leydig hücre sayısı ve birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı	60
Tablo 13: Deney sonu grupların Total Round Spermatid Sayısı, Günlük Sperm Üretimi ve Gram Başına Düşen Günlük Sperm Üretimi	61
Tablo 14: Deney sonu grupların germinal epitelde ayrılma yüzdeleri.....	63
Tablo 15: Deney sonu grupların Modifiye Johnsen Skorları.....	65
Tablo 16: Deney sonu grupların seminifer tübül çap değerleri	66
Tablo 17: Deney sonu grupların germinal epitel kalınlık değerleri	68
Tablo 18: Deney sonu grupların Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı oranları	69
Tablo 19: Deney sonu grupların interstisyel alanda bağ doku artış skorlaması.....	75
Tablo 20: Deney sonu grupların interstisyel alanda ödem skorlaması.....	76
Tablo 21: Deney sonu grupların tunica albuginea kalınlıkları.....	81
Tablo 22: Deney sonu grupların bazal membran hasar skorları	85
Tablo 23: Deney sonu grupların apoptotik indeksleri	90
Tablo 24: Deney sonu grupların toplam sperm sayısı, motilite ve vitalite bulguları	96
Tablo 25: Deney sonu grupların teratozoospermik indeksleri.....	99
Tablo 26: Deney sonu grupların baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk anomali yüzdeleri.....	100

Tablo 27: Deney sonu grupların doku MDA seviyeleri	103
Tablo 28: Deney sonu grupların doku SOD seviyeleri	104
Tablo 29: Deney sonu grupların doku GPX seviyeleri	106
Tablo 30: Deney sonu grupların doku GSH seviyeleri	107
Tablo 31: Deney sonu grupların doku 8-OHdG seviyeleri	109
Tablo 32: Deney sonu grupların doku TNF- α seviyeleri	110
Tablo 33: Deney sonu grupların doku MPO seviyeleri	112
Tablo 34: Deney sonu grupların doku Kaspaz-3 seviyeleri	113
Tablo 35: Deney sonu grupların doku TOS seviyeleri.....	115
Tablo 36: Deney sonu grupların doku TAS seviyeleri.....	116
Tablo 37: Deney sonu grupların doku OSI seviyeleri.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kurkuminin moleküler yapısı.....	24
Şekil 2: Abercrombie'nin düzeltme faktörü	34
Şekil 3: Total Sertoli hücre sayısını veren formül	34
Şekil 4: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği	44
Şekil 5: Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği	45
Şekil 6: Doku GPx ölçümünde kullanılan standart grafiği	46
Şekil 7: Doku GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği	46
Şekil 8: Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği	47
Şekil 9: Doku TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği	48
Şekil 10: Doku MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	49
Şekil 11: CASP3 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	50
Şekil 12: Deneyin 1. günü ve 8. günü deneklerin vücut ağırlığı.....	52
Şekil 13: Deney sonu grupların testis ağırlıkları.....	54
Şekil 14: Deney sonu grupların testis/kütle indeksleri	55
Şekil 15: Deney sonu grupların mutlak seminifer tübül hacmi.....	56
Şekil 16: Deney sonu grupların total seminifer tübül uzunluğu.....	57
Şekil 17: Deney sonu grupların total seminifer tübül yüzey alanı	57
Şekil 18: Deney sonu grupların total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı.....	59
Şekil 19: Deney sonu grupların total Leydig hücre sayısı ve birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı	60
Şekil 20: Deney sonu grupların Total Round Spermatid Sayısı.....	62
Şekil 21: Deney sonu grupların Günlük Sperm Üretimi ve Gram Başına Düşen Günlük Sperm Üretimi	62
Şekil 22: Deney sonu grupların germinal epitelde ayrılma yüzdeleri	64
Şekil 23: Deney sonu grupların Modifiye Johnsen Skorları.....	65
Şekil 24: Deney sonu grupların Seminifer tübül çap değerleri	67
Şekil 25: Deney sonu grupların germinal epitel kalınlık değerleri	68
Şekil 26: Deney sonu grupların Germinal Epitel Kalınlığı / Seminifer Tübül Çapı oranları	70
Şekil 27: Deney sonu grupların interstisyel alanda bağ doku artış skorlaması.....	75
Şekil 28: Deney sonu grupların interstisyel alanda ödem skorlaması	76

Şekil 29: Deney sonu grupların tunica albuginea kalınlıkları.....	82
Şekil 30: Deney sonu grupların bazal membran hasar skorları	85
Şekil 31: Deney sonu grupların apoptotik indeksleri	91
Şekil 32: Deney sonu grupların toplam sperm sayısı değerleri.....	97
Şekil 33: Deney sonu grupların hareketli sperm sayısı değerleri.....	97
Şekil 34: Deney sonu grupların canlı sperm yüzdeleri.....	98
Şekil 35: Deney sonu grupların teratozoospermik indeksleri	99
Şekil 36: Deney sonu grupların baş ve sitoplazmik droplet anomali yüzdeleri.....	101
Şekil 37: Deney sonu grupların boyun ve kuyruk anomali yüzdeleri	101
Şekil 38: Deney sonu grupların doku MDA seviyeleri.....	103
Şekil 39: Deney sonu grupların doku SOD seviyeleri.....	105
Şekil 40: Deney sonu grupların doku GPX seviyeleri.....	106
Şekil 41: Deney sonu grupların doku GSH seviyeleri.....	108
Şekil 42: Deney sonu grupların doku 8-OHdG seviyeleri.....	109
Şekil 43: Deney sonu grupların doku TNF- α seviyeleri.....	111
Şekil 44: Deney sonu grupların doku MPO seviyeleri.....	112
Şekil 45: Deney sonu grupların doku Kaspaz3 seviyeleri	114
Şekil 46: Deney sonu grupların doku TOS seviyeleri	115
Şekil 47: Deney sonu grupların doku TAS seviyeleri	117
Şekil 48: Deney sonu grupların doku OSI seviyeleri	118

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Testis dokusuna ait histolojik görüntü	11
Resim 2: Deney boyunca deney hayvanlarının barındığı kafesler	26
Resim 3: Deney hayvanlarına uygulanan intraperitoneal enjeksiyon	27
Resim 4: Deney hayvanlarından testis ve epididimis dokularının çıkarılması	28
Resim 5: İmageJ programı ile tübüllerin kapladığı alanın hesaplanması	32
Resim 6: İmageJ programı ile tübüllerden ortalama yarıçap (r) elde edilmesi	33
Resim 7: İmageJ programı ile tübüllerdeki Sertoli hücresi ve round spermatidlerin sayımı	34
Resim 8: ImageJ programıyla Leydig hücre sayısının hesaplanması	35
Resim 9: Kontrol grubu genel görünüm	70
Resim 10: Kontrol grubu normal görünümde germinal epitel, normal görünümde spermatozoalar	71
Resim 11: Kurkumin grubu genel görünüm	71
Resim 12: Kurkumin grubu normal görünümde germinal epitel, normal görünümde spermatozoalar	72
Resim 13: Gentamisin grubu genel görünüm germinal epitelde azalma, azalmış spermatozoa, spermatogenezde bozulma	72
Resim 14: Gentamisin grubu germinal epitelde azalma, azalmış spermatozoa, spermatogenezde bozulma, germinal epitelde ayrılma	73
Resim 15: Gentamisin + Kurkumin grubu genel görünüm	73
Resim 16: Gentamisin + Kurkumin grubu normal görünümde germinal epitel, tübül içi spermatozoa miktarında kısmi iyileşme	74
Resim 17: Kontrol grubu genel görünüm	77
Resim 18: Kontrol grubu normal görünümde interstisyel alan	77
Resim 19: Kurkumin grubu genel görünüm	78
Resim 20: Kurkumin grubu normal görünümde interstisyel alan	78
Resim 21: Gentamisin grubu genel görünüm interstisyel alanda ödem	79
Resim 22: Gentamisin grubu interstisyel alanda ödem, interstisyel alanda düzensizlikler	79
Resim 23: Gentamisin + Kurkumin grubu genel görünüm	80
Resim 24: Gentamisin + Kurkumin grubu interstisyel alanda ödem	80
Resim 25: Kontrol grubu normal görünümde tunica albuginea	82
Resim 26: Kurkumin normal görünümde tunica albuginea	83
Resim 27: Gentamisin grubu nispeten daha kalın gözlenen tunica albuginea yapısı	83
Resim 28: Gentamisin + Kurkumin grubu nispeten kalın gözlenen tunica albuginea yapısı	84
Resim 29: Kontrol grubu genel görünüm	86
Resim 30: Kontrol grubu normal görünümde bazal membran yapısı	86
Resim 31: Kurkumin grubu genel görünüm	87
Resim 32: Kurkumin grubu normal görünümde bazal membran yapısı	87

Resim 33: Gentamisin grubu genel görünüm	88
Resim 34: Gentamisin grubu bazal membranda ayrılmalar, hasarlı bazal membran yapısı	88
Resim 35: Gentamisin + Kurkumin grubu genel görünüm	89
Resim 36: Gentamisin + Kurkumin grubu normal görünümde bazal membran yapısı	89
Resim 37: Kontrol grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler ve TUNEL (+) hücreler.....	91
Resim 38: Kurkumin grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler ve TUNEL (+) hücreler.....	92
Resim 39: Gentamisin grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler ve TUNEL (+) hücreler.....	92
Resim 40: Gentamisin + Kurkumin grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler ve TUNEL (+) hücreler.....	93
Resim 41: Kontrol grubuna ait epididimis dokusunda normal tübül yapısı	94
Resim 42: Kurkumin grubuna ait epididimis dokusunda normal tübül yapısı	94
Resim 43: Gentamisin grubuna ait epididimis dokusunda tübüllerde azalmış spermatozoa görüntüsü	95
Resim 44: Gentamisin + Kurkumin grubuna ait epididimis dokusunda tübüllerde artmış spermatozoa görüntüsü	95
Resim 45: Kıvrık boyun	102
Resim 46: Başanomalisi	102
Resim 47: Başanomalisi	102
Resim 48: Kuyruk anomalileri.....	102

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite; korunmasız ilişkiye rağmen 35 yaş altı kadınlarda 12 ay içerisinde, 35 yaş üstü kadınlarda ise 6 ay içerisinde gebelik oluşmaması durumudur (1). İnfertilite, dünya genelinde yaklaşık 70 milyon insanın etkilendiği yaygın bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya genelindeki çiftlerin %9'unun doğurganlık problemleriyle mücadele ettiğini ve erkek faktörünün bu problemlerde %50 oranında payı olduğunu tahmin etmektedir (2). Erkek infertilitesinin; tıbbi hastalıklara, ilaçlara, genetik mutasyonlardan yaşam alışkanlıklarına kadar farklı sebepleri bulunmaktadır (3). Yaygın olarak reçete edilen ilaçlardan olan antibiyotikler, insan doğurganlığını olumsuz olarak etkileyebilir (4). Gentamisin içeren aminoglikozitlerin, gram negatif bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yıllardır süregelen bir kullanımları bulunmaktadır (5). Gentamisinin erkek üreme sistemi üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Kan testis bariyeri boyunca zayıf taşınması nedeniyle gentamisinin testiste birikmeyeceği bildirilmiş olsa da daha sonra yapılan bir çalışmada tersine testiste protein sentezini ve germ hücrelerinin bölünmesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yakın zamanda yapılan birçok çalışma, gentamisinin, serbest radikal üretimini ve lipid peroksidasyonunu artırarak testiste oksidatif stresi artırdığını ortaya koymuştur (6). Gentamisinin sperm motilitesini bozabileceği, üreme organı ağırlıklarını düşürebileceği ve testislerde apoptoza giden hücre sayısını artırarak en sonunda testis yetmezliğine yol açabileceği bildirilmiştir (7).

Kurkumin, zerdeçal tozunun ana bileşenlerinden biridir, *Curcuma longa* adı verilen bir bitkiden ekstrakte edilir (8). Yapısı hidrofobiktir ve bundan dolayı suda ya da hidrofilik çözeltilerde çözünürlüğü zayıftır. Etanol, aseton, metanol ve dimetil-sulfoksit (DMSO) (9) gibi organik çözücülerde daha yüksek oranda çözünür. Başta kurkumin olmak üzere kurkuminoidler, zerdeçalın farmakolojik aktif bileşenleridir (10). Kurkumin; hücresel seviyede, serbest radikalleri nötralize ederek ve içsel antioksidan sistemleri güçlendirerek oksidatif stresi dengeler, bu sayede oksidatif stresten dolayı oluşan apoptozu azaltır (11). Son birkaç yılda, yayınlanan çalışmalar, kurkuminin çeşitli patolojik durumlarda antioksidan, antineoplastik, antiinflamatuvar aktivitesi olduğunu ortaya koymuştur (12). Ayrıca kurkuminin üreme toksisitesini azaltma ve sperm hareketi, sayısı, morfolojisi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (13).

Çalışmamızda gentamisin kullanımı ile oluşabilecek testis hasarına karşı antioksidan özelliği olan kurkuminin etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızın ileride konu ile ilgili yapılabilecek klinik çalışmalar için bir ön çalışma olması nedeniyle elde edilecek sonuçların literatürdeki konu ile ilgili boşluğu doldurması, elde edilebilecek muhtemel olumlu sonuçlardan yola çıkılarak kurkuminin klinikte kullanılabilecek, gentamisinin yan etkilerini azaltan bir destek tedavi adayı olması ve klinikte kullanımı ile tedavi maliyetinin düşürülmesi gibi katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Morfolojisi

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Dişi bireyler iki X kromozomu barındırırken erkek bireyler bir X bir Y kromozomu barındırır (14). Cinsiyetin belirlenmesi, birçok genin yer aldığı bir durumdur (15). Bu hususta en önemli noktalardan biri, testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan ve Y kromozomunda bulunan Sex determining region on chromosome Y (SRY) genidir (15,16). SRY'nin sentez ürünü olan protein yapısındaki TDF, cinsiyetin erkeklik yönündeki gelişimini harekete geçirir (15,17). TDF, içinde 220 aminoasit barındıran bir transkripsiyon faktörüdür (15,18). Cinsiyet kromozomları embriyonun cinsiyet tayini konusunda bir seçim oluştursa da bu süreç yalnızca cinsiyet kromozomları aracılığıyla değil otozomal kromozomlar ve diğer faktörler tarafından da denetlenir (14).

Gelişimin 7. haftasından önce gonadlar henüz farklılaşmamıştır (18). Gelişimin 5. haftasında mezonefrozun medial yönünde, mezodermal epitel ve beraberindeki mezenkimin bölünerek çoğalması sonucu gonadal veya genital sırt oluşur (16,15). Gonadların cinsiyetlere özgü gelişim göstermesi, 6. haftada primordiyal germ hücrelerinin ara mezoderme hareket etmesiyle başlar (14,16). Epiblasttan türev alan primordiyal germ hücreleri, primitif çizgiden hareket ederek yolk kesesinin endodermal ve mezodermal tabakaları arasına taşınırlar (15,18). Embriyonun katlanmaları esnasında yolk kesesinin dorsal kısmı embriyonun içinde kalırken, primordiyal germ hücreleri de sonbağırsağın dorsal mezenteriy boyunca hareket ederler (15,16). Gelişimin 5. haftasında germ hücreleri primitif gonadlara gelerek 6. haftada gonadal sırtı işgal ederler (15,17). Eş zamanlı olarak mezodermin üstündeki mezotel çoğalmaya başlar ve mezenşimin içine doğru girer böylece cinsiyet kordonları oluşur (15,17). Eğer primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaşamazsa mezotel ile etkileşimi gerçekleşemeyeceğinden gonadlar oluşamaz (17). Primordiyal germ hücrelerinin hareketi Stella, fragilis genleri ve Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) tarafından denetlenir (16). XY kromozomuna sahip erkek genotipli embriyolarda, Y kromozomunda bulunan SRY geninin şifrelediği testis belirleyici faktör, gonadlarda medullar kordonların oluşmasını sağlar

(15). Testiste korteks rudimente kalırken medulla gelişimini sürdürür (17). Medullanın derinlerine doğru inen kordonlar anastomoz oluşturarak rete testisi meydana getirirler (16). Yüzey epitelinden köken alan fibröz bağ dokusundaki tunica albugineanın oluşmasıyla kordonlar yüzey epiteliyle irtibatlarını kaybederler (16,17). Gelişimin 4. ayında kordonlarda iki hücre çeşidi oluşur: primordial germ hücreleri ve spermatogenezdeki hücrelere destek görevi olan Sertoli hücreleri (17). İnterstisyel hücreler diğer adıyla Leydig hücreleri kordonlar arasındaki mezodermden köken alırlar (18). Bu hücrelerden embriyonun genital kanal ve dış cinsel organının fenotipini etkileyecek olan testosteron salgılanır (15). Destek hücreleri olarak da bilinen Sertoli hücreleri ise testisin yüzey epitelinden köken alır (16). Paramezonefrik kanalların gerilemesinden sorumlu olan glikoprotein yapısındaki antimüllerian hormon (müllerian inhibe edici faktör) yapımında görev alırlar. Testis kordonları puberte döneminde kanalize olurlar ve seminifer tübüllere dönüşürler (14). Kanalize olan seminifer tübüller rete testisle birlikte ductus efferenteslere bağlanırlar (15). Ductus efferenteslerde ductus epididimise bağlanırlar (16).

Fetüsün boyutlarının artması ve pelvik bölgenin genişlemesiyle testis skrotuma doğru yönlendirilir (17). Testislerin skrotuma hareket etmelerinde; fetüsün testislerinde üretilen testosteron, antimüllerian hormonun paramezonefrik kanalların gelişimini engellemesi, mezonefrik böbreğin dejenere olması, processus vaginalisin boyutlarının artması, vücutta karın içi organların büyümesinden kaynaklı artan basınç gibi faktörler etkili olur (16,17). Başlangıçta retroperitoneal alanda bulunan testisler karın ön duvarında yerleşim gösteren inguinal ligamentin biraz yukarısında bulunan inguinal kanaldan geçerler (15). Gelişimin yaklaşık 26. haftasında testisler inguinal kanalın derin kısmından içeri girerek ilerler ve yüzeysel bölümünden çıkarak kanalı terk ederler (15,16). Gelişimin yaklaşık 33. haftasında testisler skrotuma gelmiş olurlar ve doğumdan hemen önce tamamen skrotumun içinde bulunurlar (14,15). İnmemiş testislerin büyük bir kısmı da doğumdan sonraki devam eden üç ayda skrotuma inerler (21). Gubernakulum testisin kaudal ucundan skrotuma kadar devam eden fibröz bir bağ dokudur (18). Testisin inguinal halkadan inişi esnasında gubernakulumun abdomen dışında bulunan kısmı skrotuma doğru uzanır ve en sonunda skrotumun tabanına değer (15). Gonadlar başlangıçta onuncu torasik seviyede olduklarından vasküler olarak direkt abdominal aortadan beslenirler

(14,17). İniş esnasında bu damarsal yapılarda testisle beraber skrotuma doğru uzanırlar (15). Aynı durum lenfatik sistem için de geçerlidir (17).

Periton, processus vaginalis denilen yapıyı oluşturmak üzere gubernakulum ile birlikte aşağıya doğru iner (18). Doğumun ardından gelen ilk yıl içinde processus vaginalisin kranial bölümü dejenere olur, geriye tunica vaginalis denen bir kese kalır (14). Tunica vaginalisin testisi örten kısmı tunica vaginalisin visseral tabakası, kesenin diğer kısımları ise tunica vaginalisin paryetal tabakası olarak adlandırılır (15). Testisler processus vaginalis dışında aynı zamanda karın duvarındaki transvers fasyanın uzantısı olan iç (internal) spermatik fasya, internal oblik kas uzantısı olan kremasterik kas ve eksternal oblik kasın uzantısı olan eksternal spermatik fasya ile de örtülüdür (16). Bu kas ve fasia uzantıları ile processus vaginalis birlikte inguinal kanalı oluşturmuş olurlar (15).

2.1.2. Testis Anatomisi

Erkek genital organları kendi içinde dış genital organlar ve iç genital organlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (19). Testis ve epididimis konum olarak başlangıçta dışarda bulunsa da daha sonra skrotuma indikleri için iç genital organ olarak isimlendirilirler (20). Testisler spermatogenetik hücreleri ve öncelikle testosteron olmak üzere androjenik hormonları üreten bez yapısındaki bir organdır (21). Erişkinlerde organ 4-5 cm boyunda, eni 2-3 cm, çapı 3-4 cm'dir. Ağırlığı yaklaşık 12-20 g, hacmi ise 15-20 ml'dir (22). Testisler spermatik kord aracılığıyla skrotumda asılı halde bulunurlar ve hareket edebilen organlardır (22,23). Sol testis sağa göre daha aşağı yerleşimlidir (21). Ekstremitas superior ve ekstremitas inferior olarak adlandırılan iki kutbu vardır (20). Üst kutup anterolateral, alt kutup ise anteromedial yerleşim gösterir (22). Facies medialis ve facies lateralis organın iki yüzünü; margo anterior ve margo posterior ise iki kenarını meydana getirir (19). Testisin facies medialis ve facies lateralis yani her iki yüzü, epididim ve spermatik kord dışındaki bölgeler haricinde epiorchium olarak adlandırılan tunica vaginalisin visseral tabakasıyla örtülüdür (19,21). Aynı zamanda organın her iki ucu, ön kenarı ve arka kenarında lateral bölümü de visseral tabakayla örtülüdür (19).

Testisler; tunica vasculosa, tunica albuginea ve en dışta tunica vaginalis olmak üzere üç tabakadan meydana gelir (22).

Tunica vaginalis; processus vaginalisin doğum esnasında kapanmasıyla birlikte geriye kalan distal bölümüdür (20). Lamina visseralis ve lamina parietalis olarak iki yaprağa ayrılır ve bu iki yaprak arasındaki boşluk cavitas scroti olarak adlandırılır (19). Tunica vaginalisin iki yaprağı arasında sıvı bulunur ve bu sıvı testisin skrotum içinde kolayca hareket etmesine olanak sağlar (21).

Lamina visseralis diğer adıyla epiorchium, epididimisin çoğunluğu ve yine epididimisin testise tutunduğu arka kenarın medial kısmı haricinde organı tümüyle örtmüştür (19). Epididimis; testise üstten tunica vaginalisin bir bölümü olan ligamentum epididymis superior, alttan ise ligamentum epididymis inferior ile bağlıdır (19,20).

Lamina parietalis lamina visseralise göre daha geniştir ve iç kısmı düz ve nemlidir (21,22). Peritonun fascia spermatica internayı döşeyen bölümüdür (19).

Tunica albuginea, testisleri dış yüzeylerinden saran sert ve fibröz bir örtüdür (21). Bu yapıdan organın içine doğru birçok fibröz septa girer (23). Tunica albuginea bu septaları testise, mediastinum testis denilen kalın bir bölme üzerinden gönderir (19). Septalar, içinde sperm üretiminin yapıldığı seminifer tübülerden oluşan loblara doğru uzanırlar (21). Tunica albugineadan içeriye doğru giren bu septalar septula testis olarak isimlendirilir ve organı lobuli testis denen lobçuklara ayırır (20). Her lobülün içinde yaklaşık bir ila üç sarmal olarak değişen tubuli seminiferi contorti isimli tübüller bulunur (20,23). Tubuli seminiferi contortiler, tubuli seminiferi rectiyi oluşturarak mediastinum testise girerler (20). Tubuli seminiferi rectiyi oluşturan kanallar anastomoz oluşturarak rete testis denilen ağsı yapıyı meydana getirirler (19).

Tunica vasculosa gevşek bağ dokusu yapısında bulunan en içteki tabakadır ve içinde kan damarlarını barındıran bir plexus içerir (22).

Testis ve epididimis aortanın dallarından biri olan arteria testicularis başta olmak üzere ductus deferense giden vasal arter ve arteria epigastrica inferiorun dalı olan kremasterik arter ile beslenirler (19,22). A. testicularis abdominal aortadan çıkar ve psoas majör kası boyunca pelvise girerek spermatik kord ile birlikte ilerleyerek skrotuma ulaşır (22). Testisi ve epididimisi besleyen venler plexus pampiniformis denilen bir venöz ağ şeklinde çıkarlar (23). Plexus pampiniformis funiculus spermaticus içerisinde bulunan ağsı bir yapıdır ve vas deferensin önünde yükselir

(22,23). Bu yapı aynı zamanda testisin ısı düzenleyici sistemidir ve organı sabit bir sıcaklıkta tutmaya yardım eder (21). Plexus pampiniformisteki damarlar birleşerek V. testicularisi meydana getirirler (19). Sağ testiküler ven, inferior vena kavaya; sol testiküler ven, sol renal vene drene olur (23). Lenfatik sistemi yüzeyde tunica vaginalisin yüzeyinde, derinde ise epididimis ve testisin içinde olmak üzere iki gruptan oluşur (19). Canalis inguinalis aracılığıyla karın boşluğuna gelen lenf damarları, böbreklerin hizasında ve retroperitoneal yerleşim gösteren nodi lymphoidei lumbalese açılırlar. Testisi ve epididimisi uyaran sinir lifleri A. testicularis ile birlikte seyreden plexus testicularis ile gelirler (20). Sempatik sinir lifleri medulla spinalisteki T10-T11 seviyesinden; parasempatik sinir lifleri ise N. vagustan gelir (19).

Epididim testisin posterioruna doğru yerleşen ve baş, gövde, kuyruk kısımlarından oluşan bir yapıdır (23). Organın baş bölgesi caput epididymis, gövdesi corpus epididymis, kuyruğu ise cauda epididymis olarak isimlendirilir (20). Testisi örten tunica vaginalis aynı şekilde epididimisin de üzerinde bulunur (22). Epididimis sıkıştırılmış kanallardan oluşmuş bir organdır ve kanalların lümeni baş kısmından kuyruk kısmına giderken daralır (21). Ductus efferentes, caput epididimise dökülür, distalde ise cauda epididimis ductus deferensle devam eder (22). Epididimis testise bir periton plikasıyla tutunduğundan dolayı corpus epididymis ile testis arasında sinüs epididymis denilen bir çıkmaz oluşur (19). Sinüs epididymis, testis ile epididymis arasındaki sınırı belirler ve üstünde ligamentum epididymis superior, altında ligamentum epididymis inferior bulunur (19,22).

Skrotum; içinde testis, epididimis ve spermatik kordların alt kısımlarını barındıran bir torbadır (19,23). Cutis, tunica dartos, fascia spermatica externa, fascia cremasterica ile örtülü musculus cremaster, fascia spermatica interna ve en içte peritoniumun lamina parietalisi skrotumun tabakalarını oluşturur (19). Organın cutis tabakası yani derisi ince, buruşuk ve pigmentli bir yapıya sahiptir (23). Skrotumun bu buruşuk görünümünden tunica dartostaki kas lifleri sorumludur (21).

Embriyolojik gelişimde başta ayrı duran iki skrotum daha sonra orta hatta birleşerek raphe scroti denilen bir kaynaşma yeri oluştururlar (19). Septum scroti, skrotal boşluğu ikiye bölen yapının adıdır ve deride tutunduğu yer raphe scroti

hizasındadır (20). Tunica dartosta bulunan m. dartosa ait düz kas lifleri septum scrotiden geçerek penisin altındaki raphe penise tutunur (19). Skrotumun anterolateral bölgesini n. genitofemoralis (L1-L2), ön yüzeyini n. ilioinguinalis (L1), posterior bölgesini pudental sinirin perineal dalları (S2-S4) ve n. cutaneus femoris posteriorun perineal dalları (S2-S3) uyarır (19,21). Arteriyel beslenmesi a.pudenda externanın bir dalı olan a.a. scrotales anteriores, A. pudenda internanın bir dalı olan a.a. scrotales posterior ve a.cremasterica ile sağlanır. Skrotal venler de arterlere eşlik eder (16). Lenfatik drenajı ise nodi lymphoidei inguinales superficiales olur (19).

2.1.3. Testis Histolojisi

Erişkinde testisler, karın boşluğu dışında bulunan skrotum denilen yapılarda bulunan bir çift organdır (24). Testislerin karın boşluğu dışına yerleşmeleri vücut ısısından 2-3 °C derece daha düşük bir ortamda olmalarına olanak verir. Böylece normal bir spermatogenezin olması gereken 34 - 35 °C sıcaklık sağlanmış olur (25).

Testisler embriyonik dönemde retroperitoneal olarak yerleşmişlerdir. Embriyonik gelişim esnasında yer değiştirerek skrotumdaki spermatik kordonların uçlarında asılı hale gelirler. Karın boşluğundan skrotuma inerken her testis tunica vaginalis adı verilen iki katlı peritondan oluşan bir seröz kese taşır. Skrotumu içten döşeyen tabaka tunica vaginalisin dış paryetal tabakasını, testisi ön ve yan taraflardan saran kısım da tunica vaginalisin iç visseral tabakasını oluşturur (26). Testisler kalın sıkı bir bağ dokusu olan tunica albuginea ile sarılmıştır (24). Tunica albugineanın iç kısmında tunica vaskuloza adı verilen kan damarından zengin bir tabaka bulunur (24). Mediastinum testis, tunica albugineanın testisin arka yüzünde kalınlaşmasıyla oluşur (26). Lenf, kan damarları ve genital boşaltım kanalları bu bölgeden organın içine girer (24). Bu bölgeden testisin içine doğru giren ince bağ doku uzantıları organı lobüllere ayırır (26). Lobüllerde seminifer tübüller, gevşek bağ dokusu ve testosteron üreten intertisyel hücreler (Leydig hücreleri) bulunur (24).

İntertisyel Doku

İntertisyel doku, lenf damarı ve kapillerler içeren gevşek bir bağ dokusudur ve seminifer tübüller arasında bulunur (26). Fibroblast, makrofaj, mast hücreleri gibi hücrelerin yanında bağ doku içinde tek tek veya gruplar halinde bulunan testosteron salgısından sorumlu Leydig hücrelerini de barındırır (27). Leydig

hücreleri yuvarlak, çekirdekleri merkezde bulunan asidofilik sitoplazmalı hücrelerdir (26). Steroid sentezleyen bu hücrelerin sitoplazmalarında lipit damlacıkları bulunur (27). Ayrıca sitoplazmalarında çubuk şeklinde kristaller olan Reinke kristalleri bulunur (24). Leydig hücrelerinden salınan testosteron embriyoda erkek fetüsta gonad gelişimini sağlarken pubertede spermatogenezin başlatılmasından ikincil cinsiyet özelliklerin gelişmesinden sorumludur (27). İntertisyel hücreler gebeliğin 3. ve 4. aylarında çok aktifirler ama sonra ergenlik dönemine kadar fibroblast benzeri hücreler olarak kalırlar. Ergenlikle beraber tekrar testosteron üretimine devam ederler (24).

Seminifer Tübüller

Testislerin her birinde tahmini olarak 250-1000 civarında seminifer tübül bulunur. Bu tübüller düz, kısa ve dar tübüller vasıtasıyla testisin içindeki kanallar ağı olan rete testise açılırlar (26). Rete testis, ductuli efferentes ve ductus epididimise açılır. Tübüllerdeki epitel seminifer epitel bir diğer ismiyle germinal epitel olarak adlandırılır (27). Özel hücre tipleri tübüllerde birarada toplanmışlardır (24). Seminifer epitel, Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere iki çeşit hücreden oluşur (26). Seminifer epiteli döşeyen bazal membranın en içteki tabakasında miyoid hücreler bulunur (27). Myoid hücreler yassı şekillidir ve tübüllerin kasılmasından sorumludur (26).

Spermatogenez

Spermatogonyumların spermatidlere dönüşüm süreci spermatogenez olarak adlandırılır (27). Spermatogonyum hücrelerinin bölünmesiyle birincisi kök hücre, ikincisi ileride spermatositleri oluşturacak olan bölünmeye odaklanmış hücre olmak üzere iki çeşit hücre oluşur (26). Spermatogonyal kök hücreler, bölünmeye odaklanmış hücrelere göre radyoterapi ve kemoterapiye daha dayanıklıdır ve erkek fertilitesinde önemleri büyüktür (25).

Spermatogonyumlar hücre çekirdeği niteliklerine göre üçe ayrılırlar (27).

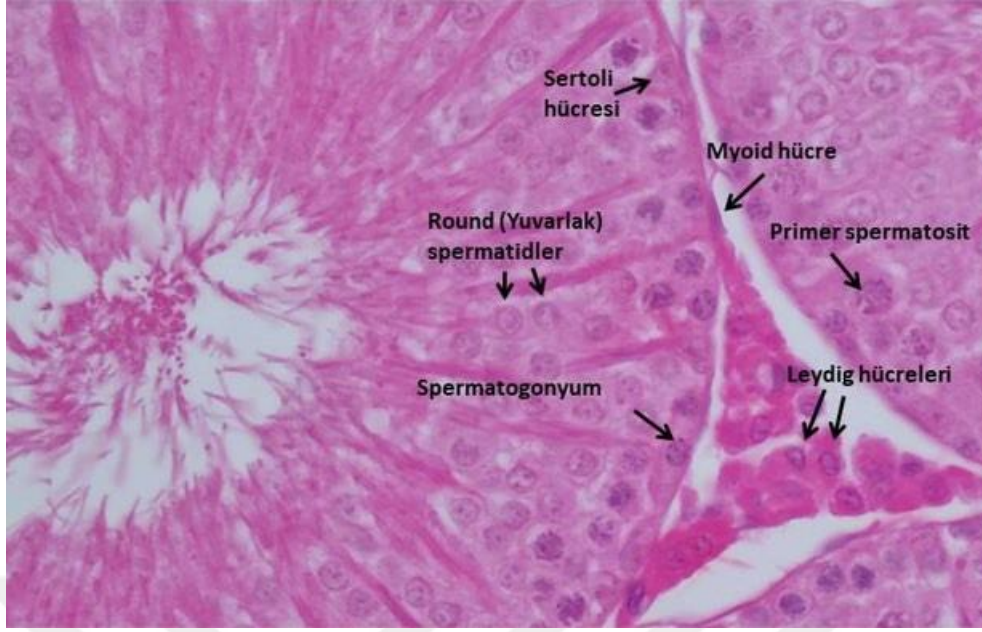
Tip A koyu spermatogonyumların çekirdekleri yoğun bazofiliktir ve kök hücre görevi üstlendikleri varsayılmaktadır (24). Bölünerek tekrardan Tip A koyu spermatogonyumlara ya da Tip A açık spermatogonyumlara dönüşürler (27).

Tip A açık spermatogonyumlar daha açık renkte yuvarlak çekirdekler içerirler (24). Bölünme hızları Tip A koyu spermatogonyumlara göre daha fazladır (26). Bu spermatogonyumlar, spermiyumu oluşturabilmek için başkalaşıma uğrayarak tip B spermatogonyumları oluştururlar (24).

Tip B spermatogonyumların çekirdekleri daha yuvarlak ve daha soluktur (26). Bu spermatogonyumların gözlenmesi spermatogonyal safhanın sonuna gelindiğini işaret eder (27). Bir tane Tip B spermatogonyum, mitoz bölünmeyle iki tane primer spermatosit meydana getirir.

Primer spermatositlerin kromozom sayısı 46'dır yani $2n$ 'dir, DNA miktarı ise $4n$ 'dir (26). DNA miktarının $4n$ olması bir kromozomun iki tane kromatid içermesinden kaynaklanır (24). Primer spermatositler birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde 22 gün beklerler (27). Bu evrede 22 otozom, 1 gonozom olan homolog kromozom çiftleri arasında genetik materyal değişimi olarak bilinen crossing over gerçekleşir (24). Daha sonra homolog kromozom çiftlerinin zıt kutuplara gitmesiyle tetrad halindeki yapı diad haline dönmüş olur (27). Crossing over sayesinde ileride oluşacak olan spermatidlerin genetiği birbirinden farklı olur (24). Bir tane primer spermatositin birinci mayoz bölünmeye girmesiyle iki tane sekonder spermatosit meydana gelir (27).

Sekonder spermatositlerin her birindeki kromozom sayısı 23'tür ve DNA sayısı da $4n$ 'den $2n$ 'e inmiştir. Boyut olarak primer spermatositlerden daha küçüktürler (26). Sekonder spermatositler hızlıca ikinci mayoz bölünmeyi geçirirler (24). İkinci mayoz bölünmeye çok çabuk girdiklerinden dolayı kesitlerde çok görülmezler (27). İkinci mayoz bölünmede kromozomları meydana getiren kardeş kromatidler zıt kutuplara gider ve böylece bölünmenin sonunda bir sekonder spermatositten iki tane yine 23 kromozomlu ve n miktarında DNA içeren spermatidler oluşur (24).



Resim 1: Testis dokusuna ait histolojik görüntü

Spermiyogenez

Spermiyogenez; spermatidlerin, spermiyuma başkalaşmasına verilen isimdir (27). Spermatidler oluştuktan sonra artık bölünme gerçekleşmez ve n kromozomlu spermatidler farklılaşarak matür spermleri meydana getirirler (24). Bu aşamada spermatidlerin çekirdekleri daha da küçülür, konsantre olur ve kuyruk gelişimi gözlenir.

Spermiyogenezde; golgi safhası, kep safhası, akrozom safhası, olgunlaşma safhası olmak üzere dört ana olay gerçekleşir (27).

Golgi safhasında Golgi kompleksindeki glikoproteinden zengin proakrozomal granüller belirgindir (24). Golgi kompleksinden köken alan bu proakrozomal granüller akrozomal vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler (26). Böylece hidrolizle ilgili enzimler Golgi kompleksinden akrozomal veziküle transfer edilmiş olur (25). Akrozomal vezikül hücre çekirdeğine yakın membranla çevrilmiş bir yapıdır ve bulunduğu alan spermiyumun ön kısmını oluşturur (27). Sentriyoller akrozomal vezikülün zıt tarafına hareket ederler ve bir tanesi bazal cisimcik olarak hücrenin kuyruk aksonemini meydana getirmeye başlar (26).

Kep safhasında akrozomal vezikül basık bir hal alarak çekirdek membranı üstünde bir kep şeklini oluşturur (25). Akrozomal vezikülün altında bulunan çekirdek membranı porlarını kaybeder ve kalınlığı artar.

Akrozom safhasında spermatid, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının içine doğru girer. Kuyruk bölümü ise seminifer tübül boşluğuna doğru gelişir (24). Hücre çekirdeği giderek konsantre olur ve basıklaşır (26). Akrozom, çekirdeği sarmaya devam eder ve sitoplazmadaki mikrotübüllerle birlikte manşet oluşur (25). Sentriyollerden köken alan dokuz tane kalın lif, kuyruğun yapısında bulunan mikrotübül çiftlerini çevreler ve dış kalın lifleri oluşturur (27). Bu dış kalın lifler hücrenin çekirdeği ile kuyruğunu birbirine bağlar bu yüzden bu bölge boyun veya bağlantı parçası olarak adlandırılır (24). Bu bölgede ve daha distalinde bulunan dış kalın lifler, mitokondriyonlar tarafından bir kılıfla çevrelenir (27). Çevrelenen bu kısım kuyruğun orta parçasını oluşturur (24). Orta parçanın distalinde bulunan dış kalın lifler, fibröz kılıfla birlikte çevrelendiğinde esas parça adını alır (27). Son parça ise kısa bir bölümdür (24). Sadece aksonemi oluşturan mikrotübülleri içerir (27).

Olgunlaşma safhasında spermiyumun sitoplazmasındaki artık cisim bırakılır (26). Artık cisim, Sertoli hücreleri tarafından temizlenir (25). Spermatidler arasındaki bağlantılar kaybolur ve ayrılırlar (24). Tübül boşluğuna bırakılan spermiyumlar olgundur fakat hareket etme kabiliyetleri henüz yoktur (26).

Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül boşluğuna kadar seyreden hücrelerdir (25). Kesitlerde, spermatogenik hücreleri sararlar ve hücre hatları çok seçilemez (26). Sitoplazmaları granülsüz endoplazmik retikulum, granüllü endoplazmik retikulum, mitokondri ve Golgi kompleksinden zengindir (24). Ayrıca sitoplazmalarının bazale yakın kısmında Charcott-Böttcher denilen özel cisimcikler bulunur. Çekirdekleri ökromatiktir ve çekirdekçikleri rahatlıkla gözlenir (27). Bu nitelikleri onu diğer spermatogenik hücrelerden farklı kılar (26). Sertoli hücreleri puberteye gelinceye dek seminifer epitelin en baskın hücreleridirler, puberteden sonra epiteldeki hücrelerin %10 civarını oluştururlar, daha sonraki yaşlarda ise tekrardan epitelde baskın hale geçerler (25). Yeterince olgunlaşamayan spermatogenik hücreleri fagosite ederler (27). Aynı zamanda spermiyumun sonunda

spermatidlerin bıraktığı artık cisimleri de temizlerler (25). Androjen bağlayıcı protein ile gelişmekte olan spermatogenik hücreler için yüksek miktardaki testosteron ve dihidrotestosteronun ortamdaki varlığını sağlarlar (24). Olgun spermatidlerin, seminifer tübül boşluğuna geçişini kolaylaştırır (25). Spermatogenik hücrelerin beslenmesinden ve desteklenmesinden sorumludurlar (27). Folikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörleri barındırdığından inhibin gibi maddelerle negatif feed back yoluyla FSH miktarının düzenlenmesinden sorumludurlar (24). Fetüste salgıladıkları Anti Müllörian hormonla dişi genital kanalların dejenere olmasını sağlarlar (26). Plazminojen aktivatör, transferrin ve seruloplazmin üretiminden sorumludurlar (24). Aynı zamanda kan testis bariyerini yaparlar (27).

Kan Testis Bariyeri

İki Sertoli hücresi bazolateral bölgede birbirlerine okludens bağlantılarıyla bağlanırlar (25). Sertoli hücrelerini birbirine bağlayan bağlantı birimleri kan testis bariyerini oluşturur (27). Kan testis bariyeriyle seminifer epitel, bazal ve adluminal bölümlerine ayrılır (25). Spermatogonyumlar, bazal bölgede kalırlar ve kan testis bariyerinin dışında kalırlar (26). Spermatositler ve spermatidler, adluminal bölgede yer alırlar (25). Bu bariyerle birlikte spermatogenik hücreler, organizmanın otobağışıklık sisteminden korunurlar (26). Böylece protein, antikor gibi yapıların spermatogenik hücrelerle olan teması engellenmiş olur (25). Kan testis bariyerinden dolayı seminifer tübül ve boşaltım kanallarının içerdiği iyon, aminoasit, protein, karbonhidrat konsantrasyonları lenfoid sıvı ve plazmadan değişiktir (24). İzole olan germ hücreleri Sertoli hücreleri vasıtasıyla beslenir ve korunurlar (26). Bu bariyer sayesinde germ hücreleri, dolaşımla birlikte gelen zararlı maddelerden muhafaza edilmiş olurlar (27).

Testis İçi Kanallar

Düz tübüllerden oluşan tubuli recti, rete testis ve ductuli efferentes intratestiküler kanalları oluşturur (26). Tubuli recti epitelinde yalnızca Sertoli hücrelerini barındırır ve son kısmına doğru epiteli tek katlı kübik epitele farklılaşır (27). Daha sonra zengin bir damar dokusu içinde rete testise bağlanır (24). Rete testis, anastomozlardan zengin kanallar örgüsüdür (26). Epiteli tek katlı kübik ya da alçak prizmatiktir ve her hücre mikrovillus ve apikal bölgesinde silyum barındırır

(27). Sayı olarak yirmi civarındaki ductuli efferentes, rete testis ile epididimisi birbirine bağlar. Ductuli efferentesin epiteli yalancı çok katlı prizmatik epiteldir (24). Ductuli efferentes, silya içeren ve içermeyen çeşitli hücre gruplarından oluşur (26). Prizmatik hücreler silyum içerirken, kübik hücreler silyum içermeyip mikrovillus barındırırlar (27). Seminifer epitelde üretilen sıvının emilmesinden mikrovillus içeren kübik hücreler sorumludur (24). Ayrıca bazal hücre olarak da adlandırılan bu hücreler başka hücrelere farklılaşabildiğinden kök hücre görevleri de vardır (27).

2.2. Epididimis Morfolojisi

Epididim, skrotumda yer alan ve testisin süperior ve posteriorunu döşeyen bir oluşumdur (26). Ductuli efferentes ve ductus epididimisten oluşan bu yapının baş kısmını ductuli efferentes, gövde ve kuyruk kısmını ductus epididimis oluşturur (27). Epididimise gelen spermler, ductus epididimiste ilerlerken hareket ve dölleme kabiliyetlerini kazanarak olgunlaşırlar (24). Epididimiste çözünür halde bulunan glikolipid dekapasitasyon faktörleri spermdaki akrozom tepkimesini bloke ederler (26). Bu dekapasitasyon faktörleri, kadın genital kanallarında kapasitasyon tepkimesiyle ortadan kaldırılır böylece spermler dölleme kabiliyetini edinirler (27).

Epididim yalancı çok katlı prizmatik epitelde döşenmiştir ve sterosilyum barındıran prizmatik hücreler esas hücre; küçük, küresel hücreler de kök hücre olarak adlandırılır (26). Esas hücrelerin ve stereosilyumların boyutları epididimiste proksimalden distale doğru gidildiğinde azalır (24). Sitoplazmaları granüllü endoplazmik retikulum, granülsüz endoplazmik retikulum, golgi kompleksinden zengindir ve dekapasitasyon faktörünü bu hücreler meydana getirir (27). İçten ve dıştan epididimisi çevreleyen düz kas katmanları, ritmik kontraksiyonlarla spermin kanal içindeki motilitesini sağlarlar (26).

2.3. Gentamisin

2.3.1. Genel Bilgiler

Gentamisinin de içinde bulunduğu aminoglikozidler heksoz halkası barındırırlar ve bu halkada birbirlerine glikozid bağıyla bağlanmış aminoşekerler ile streptidin veya 2-deoksistreptamin bulunur (28). Yapılarındaki polikasyonik gruplardan ötürü lipit ortamında çözünürlükleri düşüktür (29). Bazik ortamda

iyonizasyonları az olduğundan alkalen pH'da asit pH'ya göre daha etkilidirler (28,29). Suda çözünürlükleri fazladır (29).

Etki mekanizması olarak protein sentezini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler ve grup içindeki ilaçların etki mekanizmaları birbirleriyle aynıdır (28,29). İlk olarak dış zardan porin kanalları aracılığıyla pasif difüzyonla geçen ilaç, daha sonra hücre zarından, enerjisinin zar boyunca elektrokimyasal gradient ile temin edildiği oksijene tabi aktif bir süreçle sitoplazmaya gelir (28). Aminoglikozidler, bakterilerdeki ribozomların 30S alt ünitesine bağlanarak protein yapımını bloke ederler (29). 30S-50S ribozomal birimini tRNA'nın başlama kodonunda (AUG) sabitleyerek protein sentezinin başlangıcını önleme, translasyonun ilerlemesini önleyerek eksik proteinlerin üretimine neden olma, yanlış aminoasidin eklenmesine sebep olma gibi en az üç yolla protein yapımını bloke edebilirler (28,30). Bahsedilen etkiler geri dönüşümsüz olduğundan bakterisidal etkinlik gösterir (28). Böylece normalde protein sentezini inhibe eden diğer antibiyotikler bakteriyostatik iken aminoglikozidler bakterisidal etkinlik göstermiş olur (29).

Aminoglikozidler polar katyon yapısında olduklarından gastrointestinal sistemden absorpsiyonları zayıftır bu yüzden oral yolla verilen ilacın tamamına yakını feçesle birlikte dışarı atılır (28,30). İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, ülserler, karaciğer yetmezliği gibi durumlar absorpsiyonu artırarak uzun vadede ilaç alımında vücutta birikime sebep olabilir (28,29). Kas içi enjeksiyon bölgelerinden emilimi yüksektir bundan dolayı sistemik enfeksiyon durumlarında parenteral kullanımı tercih edilir (29,30). Periton veya plevra gibi seröz membranla döşeli vücut boşluklarından emilimleri hızlıdır (29,30). Polar bir yapıya sahip olduklarından hücrelerin içine rahatça giremezler daha çok ekstraselüler sıvıda dağılım gösterirler (28,29). Plazmadaki en yüksek konsantrasyona yarım saat ile bir buçuk saat sonrasında varırlar (30). Gentamisin, kanamisin, tobramisin gibi alt grupları plazmadaki proteinlere bağlanmaz iken streptomisin %30 civarında bağlanım gösterir (29). Merkezi sinir sistemi, göz gibi yapılara dağılımı zayıftır (30). Menenjit gibi aktif enfeksiyon durumlarında beyin omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonu artış gösterir (28). İç kulakta kohleada bulunan endolenf ve perilenf sıvılarında yüksek oranda birikim gösterirler (29). Yine benzer şekilde uzun süren kullanımlarda plevral ve sinovyal sıvılarda yüksek birikim gösterirler (28). Fötal dolaşım ve yağ

dokusuna ise geçişleri azdır (29). Böbrek korteksinde diğeri birçok dokuya göre fazla miktarda birikim gösterir ve bu birikim derecesiyle nefrotoksik etkileri arasında bir ilişki vardır (28,29).

Eliminasyonları böbreklerden glomerular filtrasyon yoluyla olur (29). Normal şartlarda aminoglikozidlerin dolaşımdaki yarılanma ömrü 2-3 saat iken böbrek hasarı olan kişilerde bu durum 24-48 saat olabilir (28). Bu gibi durumlar ilacın plazmada toksik seviyelere ulaşmasına neden olur (29). Hemodiyaliz, periton diyalizine göre daha etkili olup aminoglikozidlerin eliminasyonlarına yardımcı olurlar (28). İlacın toksik doz/terapötik doz oranı düşük olduğundan yaş, cinsiyet, kreatinin klerensi ve vücut ağırlığı gibi etkenlere dikkat edilerek doz miktarı belirlenmelidir (29). Birçok klinik vakada ilacın günlük doz miktarının bölünmüş değıl tek doz ve enjeksiyon içinde verilmesi tercih edilir (28). Bu şekilde tek doz kullanımı, bölünmüş doza göre daha efektif, toksisitesi daha az ve maliyet olarak daha uygundur (29). Tek seferde yüksek doz kullanımı sayesinde ilaç, vücutta antibiyotik sonrası etki oluşturmuş olur (28). Antibiyotik sonrası etkiyle beraber ilacın plazmadaki konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyon değıerinin altına inse bile etkisini sürdürmeye devam eder (29). Bu postantibiyotik etki birkaç saat sürebilir (28). Aminoglikozidlerin bakterisidal etkileri yüksek konsantrasyonlarda daha çabuk oluştuğundan tek seferde yüksek doz kullanımı bu açıdan da avantaj sağılar (29).

Bakterilerin, aminoglikozidlere direnç geliştirme biçimi üç başlıkta incelenebilir (28).

1. Direnç taşıyan bir plazmidin bakteriye girmesiyle aminoglikozidi inhibe eden enzimler yapılmaya başlanır (29). Bu enzimler aminoglikozidleri asetilasyon, fosforilasyon, adenilasyon yoluyla inhibe ederler (28).

2. Bakterinin sitoplazmik membranında, aminoglikozidin hücreye transportunu sağılayan transport mekanizması bozulur (29).

3. Mutasyon nedeniyle aminoglikozidin bağılandığı ribozomun 30S alt birimindeki reseptör farklılaşabilir veya oluşmaz (28).

Gentamisin de aminoglikozid grubunda bulunan ve amikasinden sonra eşitliliğı en fazla, antibakteriyal etkisi en güçlü olandır (29).

2.3.2. Gentamisinin Antibakteriyal Spektrumu ve Klinik Kullanım Alanları

Gentamisin, Mikromonospora purpureadan elde edilen aminoglikozid türevi bir ilaçtır (29). Daha çok aerobik gram negatif basillere etkilidirler, anaerobik ya da fakültatif anaerob bakterilere tesiri zayıftır (30). Karın ya da pelvis içi organlarda gram negatif bakteriler tarafından gelişen enfeksiyonlarda, akciğer, kemik, yumuşak dokuda meydana gelen enfeksiyonlarda, komplikasyon barındıran idrar yolu enfeksiyonlarında ve bu durumlara bağlı olarak oluşabilecek bakteriyemilerin tedavisinde i.v. yada i.m. yoluyla kullanılabilir (29). P. aureginosa, Enterobacter, Klebsiella gibi gram negatif mikroorganizmaların meydana getirdiği hastane kaynaklı pnömoni ve sepsis enfeksiyonlarında glikopeptit yapısında bulunan vankomisin ya da beta laktam grubundaki penisilin ile birlikte kullanımı mevcuttur (30). Böylece hücre duvar yapımı engellenerek ilacın hücreye geçişi kolaylaşır (28). Bu kombinasyon kullanımı gram pozitif etkenli endokarditlerin tedavisinde de fayda sağlamaktadır (30).

2.3.3. Gentamisin Kullanılış Yolları

A. Lokal ve Oküler Uygulama

Enfeksiyon içeren yanıklar ve deri bulguları, ven içi kateter enfeksiyonu durumlarında etkindirler (28). %0.3'lük oftalmik yani göz solüsyonu veya merhemi, kulak damlası, %0.1'lik cilt merhemi veya kremi gibi lokal kullanıma elverişli formları bulunmaktadır (29).

B. İntratekal Uygulama

Gram negatif bakterilerden kaynaklanan menenjitlerde günde en fazla 5 mg olmak üzere günlük 1 mg gentamisin sülfat intratekal yolla verilir (29,28). Ancak 3. kuşak sefalosporinlerin keşfiyle bu şekildeki kullanımı tercih edilmemeye başlanmıştır (28).

C. İntramüsküler veya İntravenöz Uygulama

Gentamisin için tavsiye edilen tedavi veriliş şekli 30-60 dakika içinde günlük 5-7 mg/kg olacak şekilde intramüsküler veya intravenöz olarak verilir (30). Günlük çoklu kullanımda toplam doz üçe bölünerek, idrar yolu enfeksiyonlarında daha küçük

miktarlarda (0.3-1 mg/kg) olmak üzere 8 saat aralıklarla 1-2 mg/kg dozunda tedavi süresi 7 günü aşmayacak şekilde kullanılabilir (29). Ancak ilacın günde tek seferde verildiği durumlarda daha az bir toksik etkiyle aynı etki sağlanabilir (28).

2.3.4. Gentamisin Yan Etkileri

Gentamisin ve diğer aminoglikozidlerin yan etkileri nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite olmak üzere üç başlıkta toplanabilir (29). Nefrotoksisite, 3-5 günü aşan gentamisin kullanımında ortaya çıkabilecek olan geri dönüşümlü, hafif seyreden bir durumdur (28). İlacın proksimal tübül hücrelerinde toplanmasıyla hücrelerin tübül boşluğuna bakan kısmındaki sitoplazma membranı ve lizozomları zarar görür. İdrarda hafif miktarda proteinüri, hyalin ve granüler silendirler görülür ve proksimal tübüldeki hücrelerin hasarı sonucu akut tübüler nekroz benzeri bir durum oluşur (29,30). Ototoksisite geri dönüşümlü değildir ve kohlear hasardan ziyade vestibüler hasar daha ön plandadır (28, 29). İlacın endolenf ve perilenf sıvısındaki yarılanma zamanı plazmaya göre 5-6 kat daha fazladır (30). Kana tekrardan geri difüzyonu yavaş olduğundan ilacın yüksek dozdaki kullanımlarında endolenf ve perilenf sıvılarında biriken ilaç, işitme ve dengeden sorumlu reseptör hücrelerin membranlarında bulunan fosfolipid yapısını bozar (29,30). İşitmede azalma, kulakta çınlama, dolgunluk, denge kaybına bağlı olarak bulantı, kusma, baş dönmesi gibi bulgular görülebilir (29). Nörotoksisite; nöromusküler blokaja bağlı olarak hızlı gelişen sinir-kas inhibisyonu, apne şeklinde kendini gösterebilir (30). Yüksek miktardaki kullanımlarında baş ağrısı, ensefalopati, konvülsiyon gibi ender görülen durumlar görülebilir (29).

Yakın zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda gentamisinin serbest radikalleri ve lipit peroksidasyonunu tetikleyerek testislerde oksidatif stres oluşturduğu görülmüştür (6). Oksidatif stres, sperm fonksiyonunda hasara yol açacağından erkek infertilitesinde önemli bir payı vardır (31). Yapılan hayvan deneylerinde gentamisin; testis ağırlığını azaltmış, spermatogenik hücrelerde yapısal anormalliklere neden olmuştur (32). Deleted in Azoospermia (Dazl) gen ekspresyonunu baskı altında tutarak spermatogenetik hücreleri olumsuz yönde etkilemiştir (33). Seminifer tübül hücrelerinde ayrılma ve atrofi, vakuolizasyon, nükleer piknozis, interstisyel alanda genişlemeler, vazokonjesyon görülen

etkilerdendir (34,35). Apoptoza uğramış hücre sayısında artış, tübül çapında değişiklikler, epididim ağırlığında kayıp gözlenmiştir (7). Ayrıca hipofiz-gonadal düzeyde hormon farklılıklarına yol açarak FSH, LH, testosteron miktarlarında azalmaya yol açmıştır (36).

2.4. Apoptozis

Apoptozis, hücrenin yıkıcı enzimlerinin harekete geçmesiyle hücrenin genetik materyali ve proteinlerinin sindirilmesiyle gerçekleşen bir hücre ölüm çeşididir (37). Hem tek hücreli hem çok hücreli organizmalarda meydana gelebilir ve herhangi bir inflamasyona yol açmaz (38,39). Apoptozla birlikte yanlış veya ihtiyaç duyulmayan hücreler ortadan kaldırılmış olur ve fizyolojik bir durumdur (26,24). En önemli özelliklerinden biri hücreler apoptoza giderken membran yapıları korunmuş olur böylece hücre içeriği dış ortama geçmemiş olur (24).

Apoptotik hücre ölümünün vücudumuzda görüldüğü çeşitli durumlar vardır örneğin yetişkin bir insanda kemik iliği, bağırsak gibi dokularda bir saatte milyonlarca hücre apoptoza gitmektedir (40). Yine ovaryumdaki oositleri çevreleyen foliküller ve luteal hücreler de her ay apoptoza gitmektedir (26). Timusta, vücuttaki hücreleri yabancı olarak gören T hücrelerinin seçilimi apoptozla olmaktadır (25). Embriyodaki el ve ayak parmaklarındaki boşlukların gelişimi de örnek olarak verilebilir (26). Alzheimer, felçte görülen sinir hücresi kaybı gibi durumlarda apoptoza giden hücre sayısı artarken; kanser, otoimmün hastalıklarda azalır (18).

Apoptoz, hücre içi ve dışından olmak üzere gelen uyarılarla olmaktadır (25). Transforming growth faktör, serbest radikaller, oksidanlar apoptozun hücre dışından gelen yolla oluşmasına neden olurlar (24). Hücre dışından gelen ekstrensek yol olarak da tanımlanan yolda apoptoz, reseptör vasıtasıyla başlar (38). Fas reseptörü, Tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait olan ve hücre zarının yapısında bulunan bir reseptördür (25). Fas ligandının, Fas reseptörüyle etkileşimi sonucu ölüm sinyalleri hücre içi boşluğa yayılır (38,25). Bu apoptotik süreçte, hücrelerin ölümünden sorumlu kaspaz olarak adlandırılan enzimler görev alır (24). Fas ligandının, Fas reseptörüyle etkileşimiyle prokaspaz halinde bulunan enzimler kaspaz haline geçerler (25). Etkileşim ile birlikte oluşan Fas'la ilişkili ölüm proteini (FADD), Fas reseptörleri ve prokaspaz 8 ile birlikte hücrenin ölümüne sebep olan sinyal

kompleksini oluşturur (38). FADD, kaspaz 8'i dimerize ederek aktiveleştirir (41). Kaspaz 8, proteolitik işlemlerden esas sorumlu olan kaspaz 3'ün oluşumu için prokaspaz 3'ü uyarır kaspaz inhibisyonu hücre ölümlerinin birbirine dönüşmesine neden olabilmektedir (38,42). Kaspaz 3, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek hücre ölümünün sağlıklı bir şekilde olmasını sağlar (43).

Dış uyaranlar dışında; onkogenler, tümör süpresörler, antimetabolitler gibi faktörler de apoptozun iç uyaran yoluyla oluşmasını sağlarlar (24). İç uyaranlarla gerçekleşen apoptozda, mitokondri dış zarının geçirgenliğinin değişmesiyle gerçekleşen bir ölüm yoludur (43). Hücre içindeki apoptozdan sorumlu olan Bax proteini, mitokondride bulunan sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişine neden olur ve böylece apoptozda görev alan proteazlar aktiveleşir (25). Sitokrom c, kaspaz 9'u aktiveleştiren Apaf-1'i bağlar ve aktive olan kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktiveleştirir (43). Yani kaspaz 3, apoptozda önemli bir yere sahip olup hem iç hem dış yollarla aktiveleşir (41). Apoptozun regülasyonunda yer alan Bcl-2 protein ailesi, Bax proteinine bağlanarak hücrelerin apoptoza gitmesini önler (25). Bunun dışında sinir hücrelerinde bulunan nöronal apoptoz inhibitör protein (NAIP) nöronların apoptoza uğramasını önler (24). Tümör süpresör gen olarak görev yapan p53 ise DNA hasarı, hipoksi, Myc ve Ras gibi onkogenlerin açığa çıkması gibi durumlar da apoptozu indükler (38).

Apoptoza giden hücrelerde apoptoza özgü bazı morfolojik özellikler görülür.

*DNA fragmentasyonu: Hücrelerin çekirdeğinde oluşan ve geri dönüşümü olmayan bir durumdur (24). Endonükleaz olarak adlandırılan enzimler DNA'yı küçük parçalara böler (26). Endonükleazlar, Ca ve Mg bağımlıdır ve onların varlığında aktive olurlar (24). DNA fragmentasyonun ardından kromatinler geri dönüşümsüz olarak yoğunlaşıp parçalara ayrılır ve bu durum piknozis olarak adlandırılır (18,24,38). Piknozis, ışık mikroskopunda görülebilen bir durumdur ayrıca elektron mikroskopisinde daha detaylı olarak gözlenebilir (38). Hücrelerin nükleusunda ise karyoreksis olarak adlandırılan çekirdek parçalanması durumu gözlenir (18).

*Hücre boyutlarında azalma ve hücre membranında değişiklikler: Apoptoza giden hücrelerde büzülme görülmesi spesifik bir durumdur (42). Büzülme esnasında membrandaki proteinler yıkıma uğrar ve lipidlerin hareketinde artış olur (26). Bazı

moleküllerin örneğin fosfatidilserinin hücre zarının sitoplazmaya bakan kısmından dış yüzeyine bakan kısma geçmesi gibi durumlar membranda bütünlük bozulmadan kabarcıkların meydana gelmesine sebep olur (24).

*Mitokondride görülen fonksiyon kaybı: Mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişmesiyle beraber apoptozu indükleyen proteinler, mitokondrinin zarlar arasındaki boşluğundan sitoplazmaya geçer (43). Hücrelerin ölümünde görev alan kaspazlar aktifleşir (24). Kaspazlar sistein bağımlı endoproteazların bir üyesidir (44). Başlangıçta oluşan kaspazlar, daha sonra diğer kaspazları harekete geçirerek hücrede protein yıkımına sebebiyet verirler (24).

*Apoptotik cisimciklerin gelişmesi: Apoptozun son kısmını oluşturan apoptotik veziküller; hücreye ait sitoplazma, organel, nükleer materyal gibi yapılar barındırırlar (24,38). Daha sonra bu veziküller, fagositer hücreler tarafından ortadan kaldırılır ve inflamasyonun oluşması engellenmiş olur (39).

Histolojik olarak apoptotik hücrelerin sitoplazmaları asidofilik, çekirdekleri bazofilik olarak gözlenir ve erken dönemde kaspazlarla, geç dönemde ise Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) denilen immünohistokimya veya immünofloresan metodlarla gösterilebilir (42).

2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, aerobik canlılarda oksijen metabolizmasıyla oluşan dış orbitalinde tek sayıda elektron içeren yarılanma ömürleri çok kısa olan yapılardır (45). Bu serbest radikaller hücrelerdeki oksijenden oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojenden oluşan reaktif nitrojen türlerinden meydana gelmektedir. ROS'un normalden fazla üretilmesi vücutta oksidatif strese neden olmaktadır (46, 47). Bu moleküller normalde metabolizmada sürekli olarak üretilirler ancak bazı inflamasyon ve hastalık durumlarında miktarları artarak insan vücudunda gastrointestinal sistem hastalıkları, infertilite, kardiyovasküler, solunum ve üriner sistemde aksaklılara yol açmaktadırlar (45).

ROS; serbest radikallerin yanı sıra süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi oksijenin eksik indirgenmesinden dolayı meydana gelen kimyasal açıdan reaktif molekülleri barındırır ve bu yapılar hücrelerde bulunan lipid,

protein, DNA, enzim gibi bileşiklerde hasara yol açabilirler (48,49). Lipit peroksidasyonu hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri oksijen radikalleriyle peroksit, alkol, malondialdehit (MDA) gibi yapılara dönüştürür. MDA düzeyinin ölçümü hücre zarındaki lipit hasarını ölçmede yardımcı olur. Ayrıca hücre membranında bulunan fosfolipitler tamamen okside olur ve buna bağlı olarak hücre zar geçirgenliği, iyon dengesi bozulur (45,47,48). ROS'un neden olduğu oksidatif stres, DNA'da da yıkımlara yol açarak çeşitli mutasyonların oluşumuna neden olabilir (46). 8-hidroksi 2'deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif strese bağlı oluşan düşük düzeydeki DNA hasarını bile ortaya koyabilen hassas bir belirteçtir ve hidroksil radikalının DNA'daki C8 pozisyonunda bulunan guanidin nükleozidine hasar vermesiyle oluşur (50).

Sperm üzerinde ROS'un etkilerine bakıldığında oksidatif stres sperm apoptozunu artırır ve hücrede siklik adenosin monofosfat/protein kinaz A yolağıyla sperm kapasitasyonunu olumsuz yönde etkiler (51). Yüksek miktarda oluşan ROS'a bağlı olarak sperm morfolojisi ve motilitesi zarar görür ayrıca lipit peroksidasyonu sonucu değişen sperm zar özelliğinden dolayı oositi dölleme yeteneğinde de bozulmalar görülür (51,52).

Vücudumuzda serbest radikallerin oluşturduğu toksisiteyi önlemek için süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, katalaz gibi enzimatik; glutatyon gibi de nonenzimatik antioksidan sistemleri bulunmaktadır (48,53).

SOD; ROS'a karşı ilk savunmayı oluşturan en önemli antioksidan mekanizmalardan biri olup bir süperoksit radikalini O_2 'ye yükseltirken, diğer bir süperoksit radikalini reaktivitesi süperoksite göre daha az olan hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirger. SOD'un üç tipi bulunur. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) barındıran SOD (Cu/Zn SOD) sitoplazmada, mangan (Mn) barındıran SOD (Mn SOD) mitokondride, ekstraselüler SOD (ECSOD) formu ise ekstraselüler sıvıda bulunur (53,54).

GPx; H_2O_2 'nin suya dönüşümünden sorumludur ve en az 8 çeşidi bulunmaktadır. GPx1 hücre içi hidrojen peroksidin temizlenmesinde önemli bir yere sahiptir ve bağırsaklarda yüksek oranda ekprese edilmek üzere hemen hemen birçok

dokuda bulunur. GPx2 gastrointestinal sistemde, GPx3 ise öncelikli olarak böbrekte bulunur. GPx4, fosfolipitlerdeki H_2O_2 'yi temizlemesi açısından önemlidir ve mitokondriyal formu spermin matürasyonunda görev alır. Testis dokusunda GPx'in miktarının azaldığı durumlarda sperm hareketliliğinde ve miktarında azalmayla birlikte DNA hasarı tespit edilmiştir (53,55).

Glutatyon (GSH) ise neredeyse bütün ökaryotik canlılarda bulunan, nonenzimatik antioksidan sistemine ait bir yapıdır ve GPx'in katalizlemesiyle H_2O_2 'nin suya dönüşümünü sağlar. GSH çoğunlukla sitoplazmada olmasına rağmen bazen üretildikten sonra mitokondri, peroksizom, çekirdek, endoplazmik retikulum gibi yapılara geçebilir (54).

Myeloperoksidaz, nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan bir enzimdir. İnflamasyon durumunda açığa çıkan proinflamatuvar sitokinler vasküler geçirgenliği artırır ve nötrofiller bölgeye gelir (56,57). İnflamasyon bölgesine gelen nötrofillerde degranülasyon ve oksidatif patlamayla birlikte myeloperoksidaz açığa çıkar bundan dolayı myeloperoksidaz, inflamasyon kaynaklı oluşan lökosit infiltrasyonunu göstermede yardımcıdır (57).

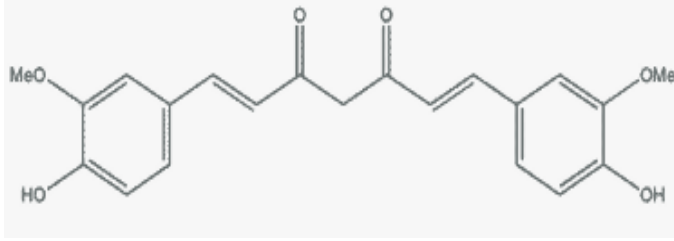
Dokularda oluşan oksidan ve antioksidan havuzlarını ayrı ayrı ölçmek yerine toplam oksidatif durum (TOS) ve toplam antioksidan durum (TAS) olarak adlandırılan hızlı ve kolay yöntemler kullanılmaktadır. Oksidatif stres indeksi (OSI) ise formül ile birlikte TOS ve TAS değerleri kullanılarak elde edilen bir indekstir (58).

2.6. Kurkumin

Kurkumin (CRM); sarı veya turuncu renkte olan ve *Curcuma longa* isimli bitkiden ekstrakte edilen bir baharattır (59). *Curcuma longa* günümüzde bilinen zerdeçalın kaynağıdır ve zerdeçalın özünü başta curcumin, demethoxycurcumin ve bisdemethoxycurcumin olmak üzere farklı kurkuminoidleri yapısında barındırır (9,60). Tıpta çeşitli kullanım alanları ve farklı uygulanma yolları bulunmaktadır (61).

Kurkumin 368,37 g/mol moleküler ağırlığında bir polifenoldür ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nde (IUPAC) ismi 1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksi fenil) olarak geçmektedir. Erime derecesi yaklaşık 183 °C'dir.

Kimyasal olarak yapısına bakıldığında bir beta diketon parçasına simetrik olarak bağlı iki tane aril halkası içerir (9).



Şekil 1: Kurkuminin moleküler yapısı (62)

Kurkumin oral yolla alındığında bağırsaklardaki absorpsiyonun ardından karaciğerde tetrahidrokurkumin ve hekzahidrokurkumi metabolitlerine dönüşür ve uygulamadan sonraki 1 saat içinde plazmada en yüksek konsantrasyona ulaşır (9). Suda çözünürlüğü zayıftır ve bu anlamda bakıldığında gastrointestinal sistemden emilimi düşük orandadır. Yapılan bir çalışmada 4 ay boyunca oral, intraperitoneal, intramüsküler yollarla kurkumin alan farelerde intraperitoneal ve intramüsküler uygulamalarda oral uygulamaya göre dokuda daha fazla kurkumin konsantrasyonlarına ulaşıldığı görülmüştür (63). Yapısı gereği hidrofobik olduğundan etanol, metanol, dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünür (9,60).

Kurkumin; süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri gibi reaktif molekülleri yakalayarak indükler ve antioksidan bir etkinlik göstermiş olur. Aynı zamanda SOD, GPx, katalaz gibi antioksidan proteinlerinin yapımını indirekt olarak uyarır (64).

Kurkumin toksisitesi ve antiinflamatuvar etkinliği için 25 insan üzerinde yapılan faz 1 çalışmasında 3 ay boyunca günde 8000 mg'a kadar kurkumin alan deneklerde herhangi bir toksisite gösterilmemiştir. Yine insanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada günde 1125-2500 mg dozunda kurkumin alımının güvenli olduğu görülmüştür. Bu insan çalışmaları kurkuminin antiinflamatuvar etkinliğine dair bazı kanıtlar sunmuştur. Kurkuminin; TNF alfa, IL 12, COX 2, prostaglandin, lökotrien gibi inflamasyonla ilişkili molekülleri inhibe ettiği görülmüştür. İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarla kurkuminin güvenli ve etkin olduğu belirlenmiş

olup Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kurkumin “genel olarak güvenli bir bileşik” olarak kabul edilmiştir (61,65).

Vücuttaki sistemler üzerindeki etkilere bakıldığında nöroprotektif etkiden sorumlu olduğu ve oksijen-glukoz eksikliğinden ötürü meydana gelebilecek kortikal nöron hasarını onardığı gösterilmiştir (65). Antiinflamatuvar etkinliğiyle trombosit agregasyonunu engeller, kolesterol homeostazını düzenleyerek aterokslerozu önler. Ayrıca HDL düzeylerini artırırken; LDL, trigliserid, kolesterol düzeyini düşürür (66). Sahip olduğu hidroksil gruplarıyla lümeni daralmış havayolunu genişletir, antioksidan kapasiteyi artırarak astım gibi alerjik hastalıklara olumlu etki yapar. Ayrıca proinflamatuvar sitokin ve IgE antikor yapımını azaltarak daha az inflamatuvar cevabın oluşmasını sağlar. Aynı zamanda beta katenin, COX 2, NF-kB'nin ekspresyonunu baskılayarak inflamatuvar bağırsak hastalığının iyileşimine katkı sağlar (65).

Erkeklerde sperm fonksiyonunu etkileyen faktörlerden biri oksidatif streten kaynaklı oluşan ROS'tur. Bunun nedeni sperm membranlarının çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olup oksidatif strese duyarlı bir yapıya sahip olmasıdır. Bu durum sperm-oosit füzyonunda, döllenme oranlarında azalmaya ve embriyogenez esnasında değişikliklere sebep olur (67). Kurkuminin de antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Yakın zamanda insan veya veterinerlik alanında yapılan androloji çalışmalarında in vitro ortamdaki erkek gametlerine antioksidan takviyesi yapılmasının hücrenin yapısı ve fonksiyonu üzerinde pozitif etkileri görülmüştür (68,69). Kurkuminin erkek fertilitesine ilişkin etkileriyle ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar kurkuminin testiste enerjiyi artırdığını ve koruyucu olduğunu rapor ederken; başka çalışmalar kurkuminin potansiyel olarak toksik olabileceği, kontraseptif etkileri bakımından daha geniş bir araştırma yapılmasını önermiştir (70,71). Kurkuminin, spermatogenik seri hücrelerine ilişkin etkileri için daha fazla incelemeye ihtiyaç vardır (67).

3. MATERYAL-METOD

3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınarak başlandı (Tarih: 05.05.2023; Protokol No: 2023/17) ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi (Proje kodu: TTU-2023-10978).

3.2. Deney Hayvanları ve Deneysel Çalışma Planı

Çalışmamızda 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi (2-3 aylık, 250 ± 25 gr ağırlığında) sıçan kullanıldı. Sıçanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından temin edildi ve deney boyunca sıçanların beslenmesi, bakımı ve dokuların elde edilmesi işlemleri bu merkezde gerçekleştirildi. Bu sayede uyum sorunu ve çevresel stres oluşmaması hedeflendi.

Sıçanlar, oda sıcaklığı 22 ± 1 derecede, nem oranı %50 ve 12 saat aydınlık ve karanlık periyodunda düzenli olarak kalacak şekilde takip edildi ve sıçanlara su, standart sıçan yemi ad libitum olarak verildi. Sıçanların barınması çalışma boyunca standart tip III kafeslerde gerçekleştirildi.



Resim 2: Deney boyunca deney hayvanlarının barındığı kafesler

Çalışmada kullanılan 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlar, aşağıda belirtildiği gibi her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Deneyin 1. günü deneyin başlangıcı olarak kabul edildi.

Kontrol (K) grubu (n:6): Deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük 0,5 ml Dimetil Sülfoksit (%70) uygulandı.

Gentamisin (GEN) grubu (n:6): Deneyin 1. gününden itibaren başlanarak 7 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal GEN uygulandı.

Kurkumin (CRM) grubu (n:6): Deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük 10 mg/kg olacak şekilde 0,5 ml Dimetil Sülfoksit (%70)'da çözdürülmüş CRM intraperitoneal uygulandı.

Gentamisin+ Kurkumin (GEN + CRM) grubu (n:6): Deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük intraperitoneal 10 mg/kg olacak şekilde 0,5 ml Dimetil Sülfoksit (%70) 'da çözdürülmüş CRM ve 100 mg/kg dozunda intraperitoneal GEN uygulandı.

Deneyde 7 gün boyunca uygulanan işlemler günün hep aynı saatlerinde (10-11 saatleri arası) gerçekleştirildi. Çalışmada uygulanacak olan Gentamisin (80 mg/2 ml Menarini Sağlık ve İlaç Sanayi Tic. A.Ş. İstanbul) ve Kurkumin (Ambeed-A147405, %98, 10g) dozları literatüre uygun olarak belirlendi (36,72).



Resim 3: Deney hayvanlarına uygulanan intraperitoneal enjeksiyon

3.3. Deneklerin Tartılması, Dekapitasyonu ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Tüm denekler deneyin 1. ve 8. günü tartıldı. Deney süresinin sonunda (8. günde) sıçanlar tartılıp anestezi altındayken (i.p. ketamin 90 mg/kg) dekapitasyon uygulandı. Abdominal bölge orta hattın kesilerek her iki testis ve epididimis çıkartıldı. Tüm denekler vücut ağırlığı takibi için, deneyin 1. ve 8. günü tartıldı. Çıkarılan sol testisler tek tek hassas terazide tartılıp kayıt altına alındı. Deneklerin “Testis Kütle İndeksi = (Testis Kütlesi / Vücut Kütlesi) x 100” formülüyle deney sonundaki “Testis Kütle İndeksleri (TKİ)” hesaplandı (31).

Histolojik değerlendirmeler için sol testis, bütünlüğü bozulmayacak şekilde ekvator bölgesi ile alt ve üst kutuplarından iğne yardımıyla delindi ve Davidson Fiksatif (DF) solüsyonunda 20 saat boyunca tespit edildi. Sağ testis ise biyokimyasal değerlendirmeler için eppendorf tüp içerisine alınıp -80°C’de derin dondurucuda saklandı. Ayrıca sol epididimis Tris tampon solüsyonu içeren, vücut sıcaklığındaki petri kaplarına alınarak total sperm sayısı, vitalite, motilite ve morfolojik analizler için değerlendirildi. Sağ epididimis ise %10’luk formaldehit içinde fiksasyonu sağlanarak histolojik değerlendirmeler için kullanıldı.



Resim 4: Deney hayvanlarından testis ve epididimis dokularının çıkarılması

3.4. Histolojik Prosedür

3.4.1. Davidson Fiksatif (DF) Solüsyonunun Hazırlanması

Testis dokularının tespitinde kullanılan Davidson Fiksatif (DF) hazırlanırken içeriğinde 200 ml formaldehit (%37), 300 ml etanol (%95'lik), 100 ml glasiyal asetik asit ve 300 ml su olacak şekilde hazırlandı. Davidson Fiksatif (DF) solüsyonunda 20 saat boyunca ışık almayan ve kuru ortamda oda sıcaklığında bekletildi.

3.4.2. %10'luk Formaldehit Fiksasyon Solüsyonunun Hazırlanması

Elde edilen epididimis dokularının fiksasyonu için kullanılan %10'luk formaldehit solüsyonu; %90 oranında distile su ile %10 oranında %37-40'luk formaldehit içeren çözeltinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.4.3. Dokuların Işık Mikroskobunda İncelenmesi İçin Hazırlanması

Dokuların boyanması, kesit alımı, takibi ve gerekli olan solüsyonların hazırlanması Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Işık mikroskopik inceleme için 20 saat boyunca DF solüsyonunda bekletilen testisler daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Sol epididimis sperm analizi için kullanılırken sağ epididimis ise üç gün boyunca %10'luk formaldehit solüsyonunda ışık almayan kuru ve oda sıcaklığındaki ortamda bekletildi. Dokular doku takip cihazına (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) yerleştirilerek aşağıdaki tabloda süresi, dereceleri ve sırası belirtilen standart doku takip prosedürü uygulandı. Takip işlemiyle birlikte dokular alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen serilerinden geçirilerek saydamlaşması sağlandı.

Tablo 1: Standart doku takip prosedürü

UYGULAMA	SÜRE
Formaldehit	1 saat
Alkol (%70) (30°C)	50 dakika
Alkol (%80) (30°C)	1 saat
Alkol (%90) (30°C)	1 saat
Alkol (%96) (30°C)	1 saat
Alkol (%100) (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1,5 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1,5 saat

Ardından dokular, doku gömme cihazında (HistoCore Arcadia H-C Leica, Germany) parafin bloklar haline getirildi. Elde edilen bloklar, tam otomatik mikrotom (Leica RM2255, Germany) cihazıyla dokuya ilk başta ulaşana kadar 20 µm'lik kesitlerle, ulaştıktan sonra ise 5 µm'lik daha ince kesitlerle trimlendi. Alınan parafin kesitleri, benmari (Apex Instruments, USA) içinde 37°C'ye ısıtılmış sıcak suya koyuldu böylece kesitlerin üzerindeki kırışıklıkların açılması sağlandı. Daha sonra kesitler lam üzerine alındı. Lama alınan dokulara Hematoksilen & Eozin (H&E), Periyodik Asid Schiff (PAS) ve Masson Trikrom yöntemleriyle boyamalar yapıldı. Mikroskopik incelemeler, KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki Görüntüleme Laboratuvarı'nda dijital fotoğraf makinesi (Olympus, XCAM, 4K UHD) ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Japonya) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Almanya) programı ile gerçekleştirildi.

3.4.4. Hematoksilen & Eozin Boyama

Lama alınan doku kesitleri hematoksilen & eozin (H&E) boyaması için zembillere koyuldu. Aşağıdaki tabloda belirtilen prosedür ile tam otomatik doku boyama cihazında (LEICA Auto Stainer XL, Germany) H&E boyandı. Boyama

işlemi bittikten sonra lamaların üzerine kapama medyumunu damlatılarak lamelle kapatıldı ve sonrasında kurumaya bırakıldı.

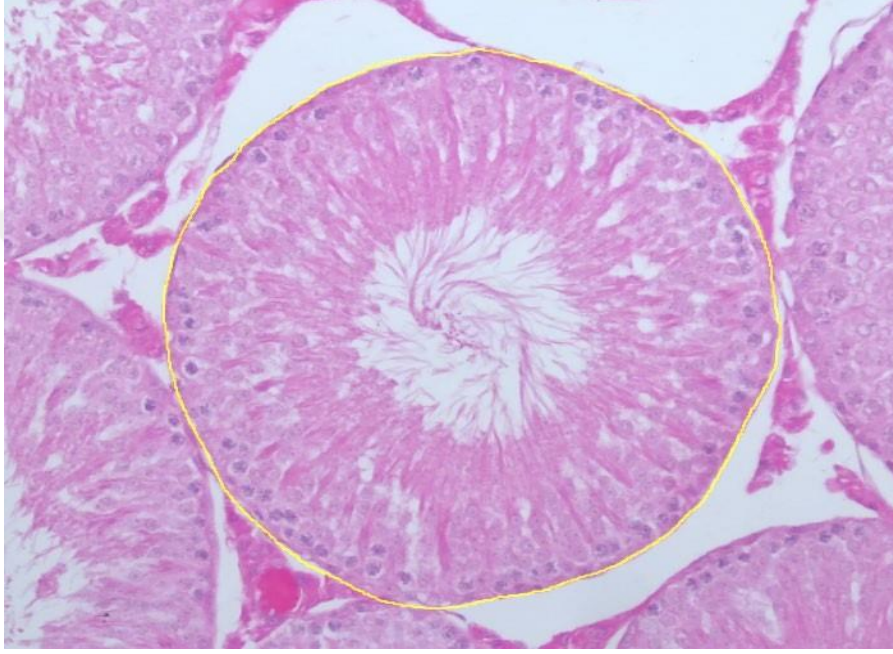
Tablo 2: Hematoksilen & Eozin boyama protokolü

UYGULAMA	SÜRE
Fırın (60 °C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%70 Alkol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Hematoksilen	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Asit Alkol	1 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Amonyaklı Su	10 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Eozin	1,5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
%96 Alkol	5 saniye
%100 Alkol	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika

Hematoksilen & Eozin boyalı preparatlarda hayvanların testislerine ait mutlak seminifer tübül hacmi (V), total seminifer tübül uzunluğu (L), total seminifer tübül yüzey alanı (S), total Sertoli hücre sayısı, gram başına düşen Sertoli hücre sayısı, total round spermatid sayısı, günlük sperm üretimi, gram başına düşen günlük sperm üretimi, total Leydig hücre sayısı, birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı verilerinin bulunması amaçlandı.

Mutlak seminifer tübül hacmi için öncelikle içinde sıvı bulunan dereceli kapta total testis hacmi bulundu. Preparatlardaki testis kesitlerinde 200X büyütmede, 30 seminifer tübül dijital fotoğraf makinesi (Olympus, XCAM, 4K UHD) ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus BX 51, Japonya) çekildi. Çekilen kesitlerde ImageJ

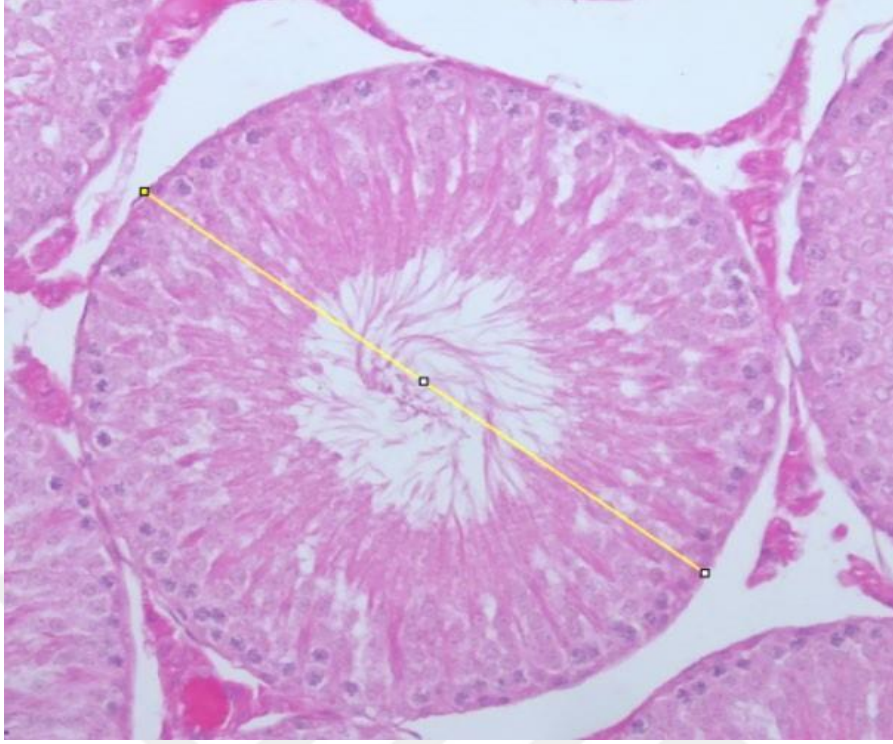
programı (ImageJ 1.54f, National Institutes of Health, USA) ile tübüllerin kapladığı alan hesaplanarak toplam alana oranlandı. Elde edilen 30 tane oranın ortalaması alınarak ortalama bir orana ulaşıldı. Her bir deneğe özgü hesaplanan bu ortalama oranlar deneklerin total testis hacimleriyle çarpılarak mutlak seminifer tübül hacmi (V) hesaplandı.



Resim 5: ImageJ programı ile tübüllerin kapladığı alanın hesaplanması

Total seminifer tübül uzunluğu (L) için çekilen 30 seminifer tübülün en uzun ve en kısa çapları ImageJ programı ile hesaplanıp ikiye bölünerek ortalama bir yarıçap (r) elde edildi (73,74). Daha sonra total tübül bir silindir gibi düşünülerek;

$L = V / \pi \times r^2$ formülüyle mutlak seminifer tübül hacminin (V), tübül taban alanına bölünmesiyle total tübül uzunluğuna (L) ulaşıldı.



Resim 6: İmageJ programı ile tübüllerden ortalama yarıçap (r) elde edilmesi

Total seminifer yüzey alanı (S) için öncelikle bulunan ortalama yarıçap (r) ile Dairenin çevresi= $2 \times \pi \times r$ formülü kullanılarak tübül taban çevresi bulundu. Daha sonra yine tübül bir silindir gibi düşünülerek;

$S = 2 \times \pi \times r \times L$ formülüyle tübül taban çevresi ve total tübül uzunluğunun (L) birbirleriyle çarpımı sonucu total tübül yüzey alanına (S) ulaşıldı (73,75).

Total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı için ImageJ programıyla 30 seminifer tübülde bulunan Sertoli hücreleri sayıldı (76). Sayılan Sertoli hücrelerinin 10 tanesinin ImageJ programıyla çekirdek çapları ölçülüp ortalama bir Sertoli hücre çekirdek çapı (D) elde edildi. Kesit kalınlığından dolayı oluşabilecek olası yanlış sonuçlardan kaçınmak amacıyla Abercrombie'nin düzeltme faktörü kullanılarak her bir hayvana ait düzeltilmiş Sertoli hücre sayılarına (n) ulaşıldı (77).

$$n = \text{cell count per tubular section} \times \frac{\text{section thickness}}{D + \text{section thickness}}$$

Şekil 2: Abercrombie'nin düzeltme faktörü (78)

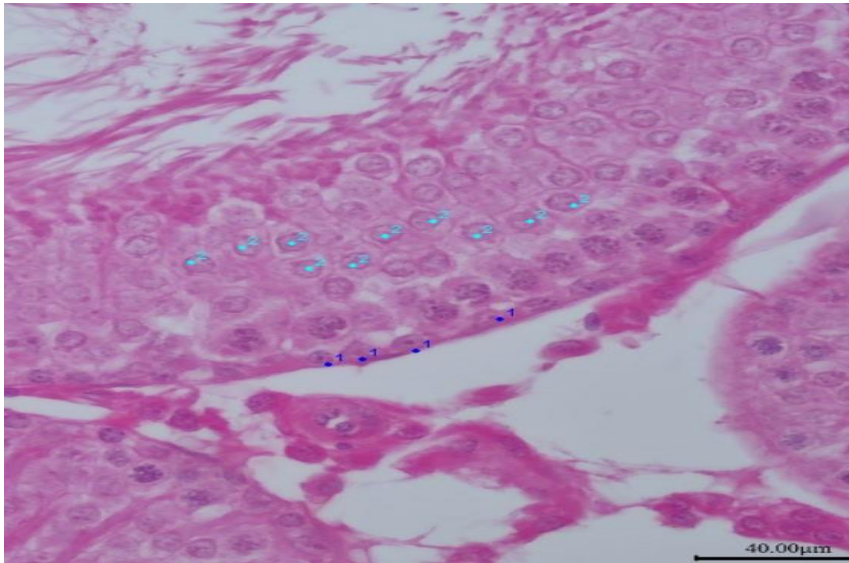
Daha sonra aşağıdaki formül yardımıyla düzeltilmiş Sertoli hücre sayısı (n), total tübül uzunluğu (L) ve kesit kalınlığı kullanılarak her bir hayvana ait total Sertoli hücre sayısına ulaşıldı (78).

$$\text{Total n. of Sertoli cells} = n \times \frac{L}{\text{section thickness}}$$

Şekil 3: Total Sertoli hücre sayısını veren formül (78)

Her bir hayvana ait bulunan total Sertoli hücre sayısının o hayvana ait testis ağırlığına bölünmesiyle gram başına düşen Sertoli hücre sayısı bulundu.

Total round spermatid sayısı da yine total Sertoli hücre sayısında olduğu gibi Abercrombie'nin düzeltme faktörü ve total round spermatid hücre sayısını veren formülle aynı şekilde hesaplandı.

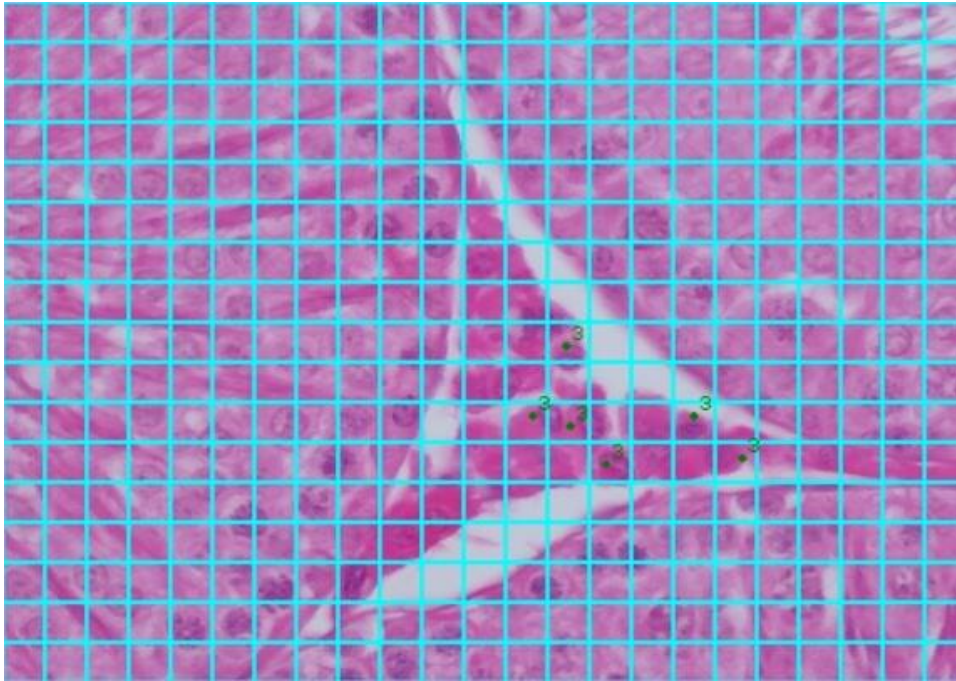


Resim 7: İmageJ programı ile tübüllerdeki Sertoli hücresi ve round spermatidlerin sayımı

Günlük sperm üretimi için sperm üretimi sürecinde spermiyogenez evresinde anlamlı olmayan derecede sperm kaybı olduğundan spermiyogenez öncesi yani tip A koyu spermatogonyumlardan round yani erken spermatidlere kadar olan süreç esas alındı (73,79). Tip A koyu spermatogonyumların bölünerek kaç günde round spermatidlere dönüştüğü hesaplandı ve total round spermatid sayısına bölünerek günlük sperm üretimi bulundu. Sprague Dawley cins erkek sıçanlarında bir spermatogenez süreci 51,6 gün sürmektedir ve bu sürecin tip A koyu spermatogonyumlardan round spermatidlere dönüşümüne kadar olan kısmı sürecin %75,58'ini oluşturmaktadır (73,80).

Her hayvana ait bulunan günlük sperm üretimi hayvanların testis ağırlıklarına bölünerek gram başına düşen günlük sperm üretimi bulundu.

Total Leydig hücre sayısı için öncelikle testisteki total Leydig hücre çekirdek volümü ve bir tane Leydig hücre çekirdeğinin hacmi bulundu. X400 büyütmedeki kesitler, ImageJ programında 441 kare içeren ortama aktarıldı. Leydig hücre çekirdeği içeren kareler toplam kare sayısına yani 441'e bölünerek bir oran elde edildi. Bu yöntemle elde edilen 30 tane oranın ortalaması alınarak ortalama bir orana ulaşıldı. Her bir deneğe özgü hesaplanan bu ortalama oranlar deneklerin total testis hacimleriyle çarpılarak testisteki total Leydig hücre çekirdek volümüne ulaşıldı.



Resim 8: ImageJ programıyla Leydig hücre sayısının hesaplanması

Daha sonra bir tane Leydig hücresinin çekirdek hacmini bulmak için ImageJ programıyla 30 tane Leydig hücresin yarıçapları ölçölüp ortalama bir Leydig hücre çekirdek yarıçapı elde edildi. Leydig hücresinin çekirdek hacmi, elde edilen ortalama Leydig hücre çekirdek yarıçapı kullanılarak;

Kürenin hacmi= $\frac{4}{3} \pi r^3$ formülü ile hesaplandı.

Total Leydig hücre sayısına elde edilen bu iki verinin yani total Leydig hücre çekirdek volümünün bir tane Leydig hücresinin çekirdek hacmine bölünmesiyle ulaşıldı (81).

Birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısına ise her hayvana ait bulunan total Leydig hücre sayısının o hayvana ait testis volümüne bölünmesiyle birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı bulundu.

Tübüllerde seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı değerlendirmesi için ışık mikroskobu altında X200 büyütmede çekilen 30 seminifer tübülde ImageJ programı kullanılarak her hayvana ait seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı verileri elde edildi. Aynı zamanda bu verilerle germinal epitel kalınlığı/seminifer tübül çapı oranları bulundu.

Seçilen alanlarda germinal epitelinde ayrılma içeren tübüllerin sayısı tespit edilerek gruplara ait germinal epitelde ayrılma yüzdesi hesaplandı. Bununla birlikte her testis kesitinde histolojik değerlendirme için Modifiye Johnsen Skorlama kriterleri kullanılarak testis hasarı belirlendi.

Modifiye Johnsen Skorlama Sistemi (82):

- 10: Birçok spermatozoanın bulunduğu tam spermatogenez
- 9: Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel
- 8: Tübül başına beşten daha az spermatozoa, birkaç geç spermatid
- 7: Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birçok erken spermatid
- 6: Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
- 5: Spermatozoa ve spermatid yok, pek çok spermatosit
- 4: Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit
- 3: Sadece spermatogonya

2: Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri

1: Seminifer epitel yok.

Epididimis preparatları da Hematoksilen&Eozin ile boyandı ve her preparat için X200 büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alan histopatolojik olarak değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama

Seminifer tübül bazal membranının germinal hücrelerle olan ilişkisini, bütünlüğünü, kalınlığını yarıkantitatif olarak değerlendirmek için yapılan Periyodik Asit-Schiff Boyama (PAS) boyama yöntemi öncesi parafin bloklara gömülen testis dokularından 5 µm'lik kesitler alındı. Daha sonra tabloda belirtildiği gibi tam otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) deparafinizasyon programından geçirildi.

Tablo 3: Deparafinizasyon protokolü

UYGULAMA	SÜRE
Fırın (60 °C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%70 Alkol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye

Deparafinize olan dokularda PAS boyama yapılması için BESLAB BS-346 100 Testlik Amb. kullanıldı. Üreticinin protokolüne uygun bir şekilde aşağıdaki tabloda verildiği gibi uygulamalar manuel olarak yapıldı. Daha sonra kapama medyumuyla birlikte lamelle üzeri kapatılıp kurumaya bırakıldı.

Tablo 4: Periyodik Asit-Schiff boyama protokolü

UYGULAMA	SÜRE
Periyodik Asit Solüsyonu (A)	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 Saniye
Schiff Reagent Solüsyonu (B)	20 dakika
Sıcak Suda Bekletme	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye
Harris Hematoksilen Solüsyonu (C)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye
Bluing Solüsyonu (D)	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	2dakika
%96 Alkol	30 saniye
%100 Alkol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

Bazal membran değerlendirilmesinde her bir hayvana ait testis preparatında, 200X büyütmede 5 farklı alan 0-3 arasında yarıkantitatif olarak skorlandı. Buna göre (0: Hiçbir değişiklik yok; 1: hafif değişiklikler; 2: orta değişiklikler; 3: şiddetli değişiklikler).

3.4.6.Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Masson Trikrom boyama yöntemi için parafin bloklardaki testis dokularından alınan 5 µm'lik kesitler, otomatik boyama cihazının deparafinizasyon programında yukarıda da bahsedildiği gibi deparafinize edildi. Daha sonra kit (Masson Trikrom Boyama Kiti, GBL, Türkiye) kullanılarak üreticinin önerdiği aşağıdaki tablodaki protokolle Masson trikrom boyama yapıldı. Boyamanın ardından kapama medyumu damlatılan lamalar lamelle kapatılıp kurumaya bırakıldı.

Tablo 5: Masson Trikrom boyama protokolü

UYGULAMA	SÜRE
Weigert'in Demirli Hematoksileni (A+B)	10 dakika
Kurutma	45 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Pikrik Asit Alkolik Çözeltisi (C)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Gelincik Kızılı Fuksin Çözeltisi (D)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Fosfomolibdik Asit Çözeltisi (E)	10 dakika
Kurutma	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Masson Anilin Mavisi Çözeltisi (F)	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye
%70 Alkol	30 saniye
%96 Alkol	30 saniye
%100 Alkol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

Masson trikrom boyalı testis preparatlarında interstisyel alanda bağ doku artışı ve interstisyel alanda ödem için 200X büyütmede 5 farklı alan 0-3 arasında yarıkantitatif olarak skorlandı. Buna göre (0: Hiçbir değişiklik yok; 1: hafif değişiklikler; 2: orta değişiklikler; 3: şiddetli değişiklikler). Her bir hayvana ait testis preparatında tunica albuginea kalınlığını ölçmek için ise her preparattan 200X büyütmede 3 farklı alandan dijital fotoğraf makinesi (Olympus, XCAM, 4K UHD) ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus BX 51, Japonya) fotoğraf çekildi ve ölçümler ImageJ programı kullanılarak yapıldı (83).

3.4.7. Sperm Vitalite, Hareketlilik, Sayı ve Morfolojinin Değerlendirilmesi

Sperm analizi için bir deney hayvanı başına 2 ml Tris tampon solüsyonu (tris-hydroxymethyl aminomethane) (pH: 7,5) içeren petri kapları hazırlandı ve etüvde bekletildi. Çıkarılan sol epididimis petri kaplarında parçalara bölündü, spermatozoanın epididimal tübüllerden dışarı çıkması için 30 dakika kadar 37° C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu sıvıdan alınan örnekler ışık mikroskobunda

(Olympus BX 51, Japonya) sperm vitalite (canlılık), motilite (hareketlilik), sayımı ve morfolojisi açısından değerlendirildi.

Sperm sayımı, X200 büyütmede Makler sperm sayım kamerasıyla birlikte ışık mikroskopunda yapıldı. Makler sperm sayım kamerasının (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel) merkezine bir damla semen (5 µl) damlatılarak kamaranın kapağı kapatıldı. X200 büyütmede 10 kare içerisinde bulunan hareketli yani motil ve hareketsiz yani immotil sperm sayıları belirlendi ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6$ /mL) toplam sperm sayısı, hareketli sperm sayısı kaydedildi. Vitalite (canlılık) değerlendirmesi için 10 µl semen örneği ile örneğin yaklaşık olarak iki katı hacminde bulunan %1'lik Eosin Y lamda 15 saniye kadar karıştırıldı ve preparatın üzeri lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda renksiz veya açık pembe görünen yani boyayı içine almayan spermiler canlı, kırmızı veya koyu pembe yani boyayı içine alan spermiler ise cansız olarak değerlendirildi. Her lamda toplam 50 sperm sayıldı ve canlı sperm yüzdesi hesaplanarak sperm vitalite yüzdeleri bulundu (84).

Morfolojik değerlendirme için X400 büyütmede farklı alanlarda her hayvandan baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk açısından en az bir tane anomali olan 100 tane sperm sayıldı. Tüm ayrı anomalilerin toplam sayısı, toplam anormal spermatozoa sayısı olan 100'e bölünerek hayvanlara ait teratozoospermik indeks oluşturuldu (85). Aynı zamanda sayılan spermilerden baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk anomali yüzdesi bulundu.

3.4.8. Tris Tamponun Hazırlanması

Sperm analizi için kullanılan tris tamponu 0,4 molar (M) derişime sahip 250 ml'lik çözelti olarak hazırlandı. Öncelikle “molarite = mol sayısı / çözeltinin hacmi (litre)” formülü ile kullanılması gereken Tris'in mol sayısı 0,1 olarak hesaplandı. Mol kütlesi 121,14 gr olan Tris'ten 0,1 mol yani 12,114 gr alındı ve 200 ml suda çözüldü. Üzerine pH: 7,4'e ayarlanana kadar 1 M derişimli HCl çözeltisi eklendi. Ardından çözeltinin hacmi suyla 250 ml'ye tamamlandı.

3.4.9. İmmünohistokimyasal Boyama İşlemleri

Apoptoza giden hücreleri belirlemek için terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) metodu kullanıldı. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm'lik kesitler pozitif şarjlı

lamalara alındı ve preparatlar dijital fotoğraf makinesi (Olympus, XCAM, 4K UHD) ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Japonya) değerlendirildi.

Seminifer tübüllerde bulunan germinal hücrelerin DNA fragmentasyonları belirlendi. Kahverengi nükleuslu, homojen boyanmış nekroz alanları bulunmayan hücreler TUNEL (+) yani apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Nükleusları mora boyanmış hücreler ise TUNEL (-) yani nonapoptotik hücreler olarak değerlendirildi. Her bir preparatta X400 büyütmede boyalı ve boyasız olarak toplam 100 germinal hücre sayıldı ve apoptotik indeks (AI) belirlendi.

$$AI = \text{TUNEL (+) hücre sayısı} / \text{TUNEL (+) ve TUNEL (-) toplam 100 hücre}$$

TUNEL boyama aşağıdaki tablodaki basamaklara uyularak tamamlandı.

Tablo 6: TUNEL boyama protokolü

UYGULAMA	BULUNMASI GEREKEN ORTAM	SÜRE
Phosphate Buffered Saline (PBS)		2x5 dakika
Hydrogen Peroxide Block (Thermo Scientific/TA-125-HP)		15 dakika
Distile Su (Yıkama)		5 dakika
PBS		2x5 dakika
Ultra V Block (Thermo Scientific/TA-125-UB)		10 dakika
Enzyme Solution (TdT) + Label Solution (fluorescein-dUTP) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	1,5 saat
PBS		2x5 dakika
Converter Peroxidase (antifluorescein antibody-peroxidase) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	30 dakika
PBS		3x5 dakika
DAB Kromojen Kit (Thermo Scientific/TA-125-HD)	Karanlık	2 dakika
Distile Su (Yıkama)		5 dakika
Hematoksilen		2 dakika
Distile Su (Yıkama)		5 dakika
%70 Etanol		5 dakika
%96 Etanol		5 dakika
%100 Etanol		5 dakika
Ksilen		5 dakika

3.5. Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri

3.5.1. Doku Numunelerin Hazırlanışı

Alınan dokuların her birinden 20'şer mg civarı parçalar alındı. Alınan dokular bir homejenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) ile 2 ml fosfat tamponu (PBS, pH: 7,4) içerisinde 9500 rpm'de homojenize edildi.

Homojenatlar 1800xg'de 10 dakika kadar santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlarda ilgili biyokimyasal parametreler ölçüldü.

3.5.2. Doku Numunelerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Doku numunelerindeki protein miktarları üretici firmanın tavsiyeleri ile ticari kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No: 23227, Rockford, IL, ABD) kullanılarak ölçüldü ve sonuçlar mg/ml cinsinden verildi. Dokularda malondialdehit (MDA) ve ELISA kitleri ile ölçülen tüm biyokimyasal parametreler, standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak mg protein başına olacak şekilde verildi.

3.5.3. Doku Malondialdehit (MDA) Seviyelerinin Belirlenmesi

MDA ölçümü, Mihara ve Uchiyama yöntemi modifiye edilerek yapıldı. Bu metod, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır (86).

3.5.4. Doku MDA Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Doku homojenizasyon tamponu (0.01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS), pH: 7,4): 10 tane PBS tableti (Medicago, Uppsala, İsveç) içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözüldü elde edilen çözeltinin pH'sı, pH metrede (Hanna Instrument, HI 9321, ABD) 7,4'e ayarlandı. Daha sonra pH'sı ayarlanan çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

%1'lik fosforik asit (H₃PO₄) çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ (Sigma, St. Louis, MO, ABD) eklendi ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

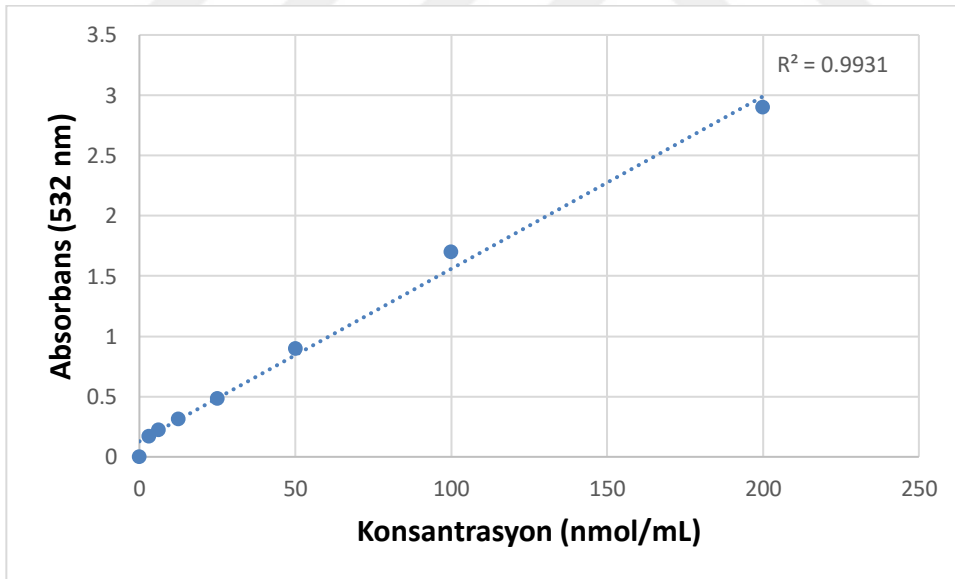
TBA çözeltisi: Tartılan 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, ABD), 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek magnetik bar ile karıştırılıp çözüldü.

Standart çözeltiler: 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, ABD), 0.01 M 50 ml HCl (Sigma, St. Louis, MO, ABD) çözeltisine eklendi. Çözelti 50°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Bu şekilde hazırlanan ana stok

çözeltilerinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar hazırlanarak 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.078 ve 0.039 nmol/mL’lik standart çözeltiler ve kör elde edildi.

3.5.5. Doku MDA Ölçümü

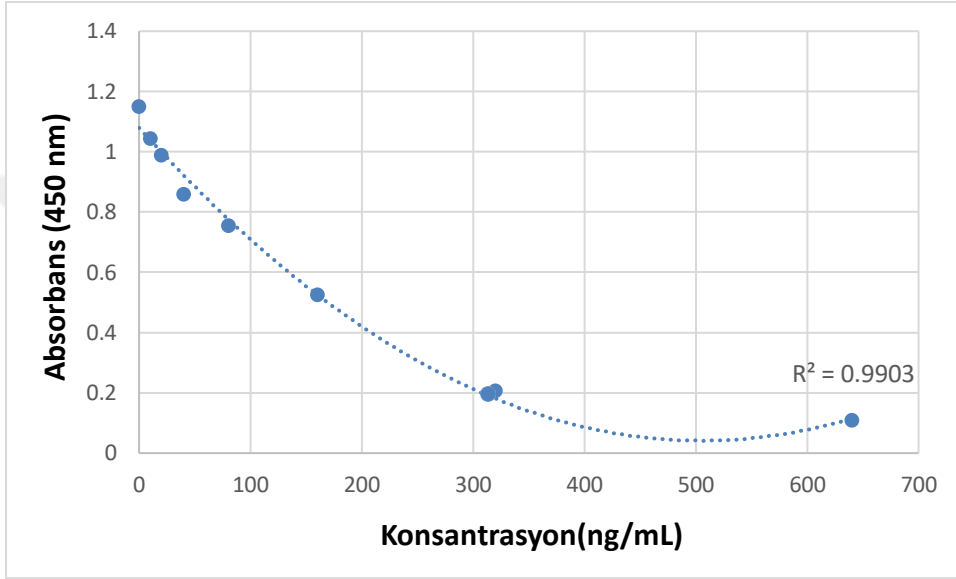
500 µL homojenatın üstüne 3 ml %1’lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı. Karışıma 1 ml %0.672’lik TBA eklendikten sonra tekrar karıştırıldı ve 60 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Sürenin sonuna gelindiğinde tüpler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve daha sonra 1800xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısımlardan 200’er µl alınıp 96 kuyucuktan oluşan pleyte yüklenerek mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, California, ABD) 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği elde edildi. Elde edilen grafik ve dokulardaki protein miktarı yardımıyla doku MDA düzeyleri nmol MDA/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 4: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.6. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi

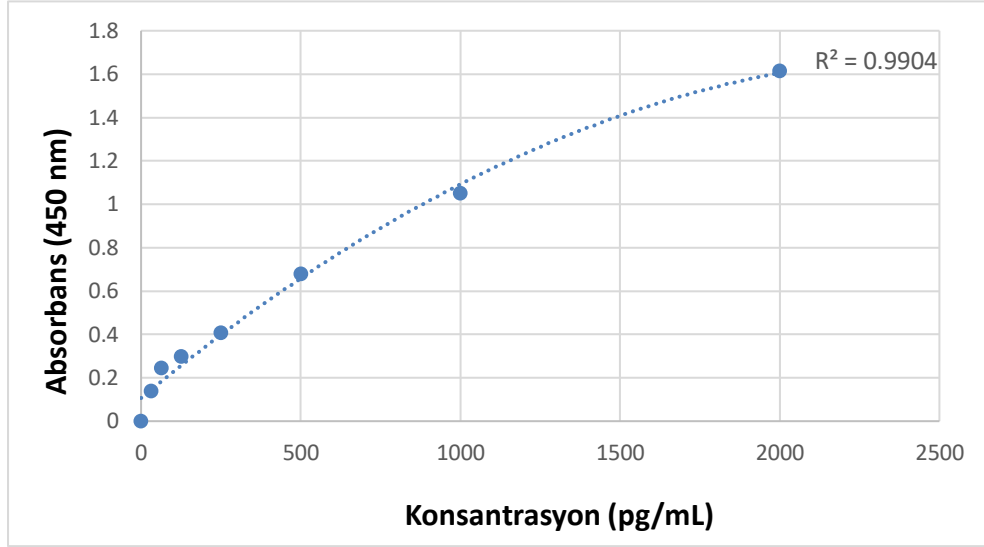
Doku numunelerin SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE1626R, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku SOD seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 5’de gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 9.76 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 5: Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.7. Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi

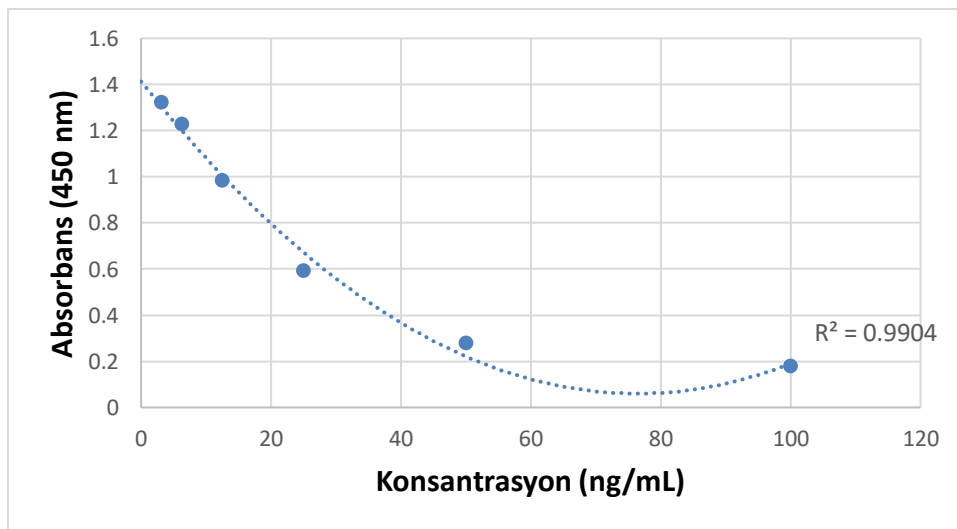
Doku örneklerinin GPx seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE2557R, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar pg/mg protein birimiyle verildi. Doku GPx seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 6’da gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 8.00 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 6: Doku GPx ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.8. Doku Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi

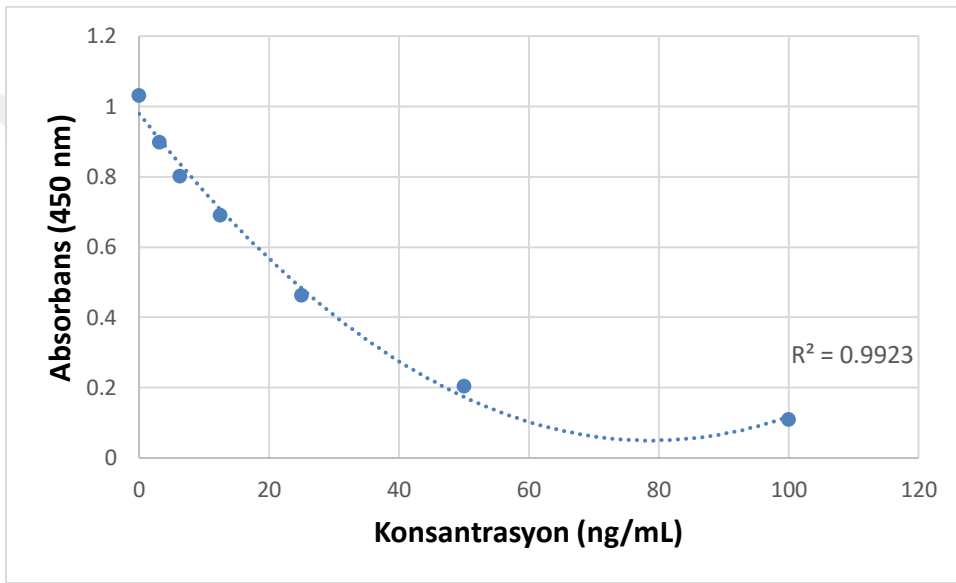
Doku örneklerinin GSH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE10155, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku GSH seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 7’ de gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 6.76 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 7: Doku GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.9. Doku 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) Seviyelerinin Belirlenmesi

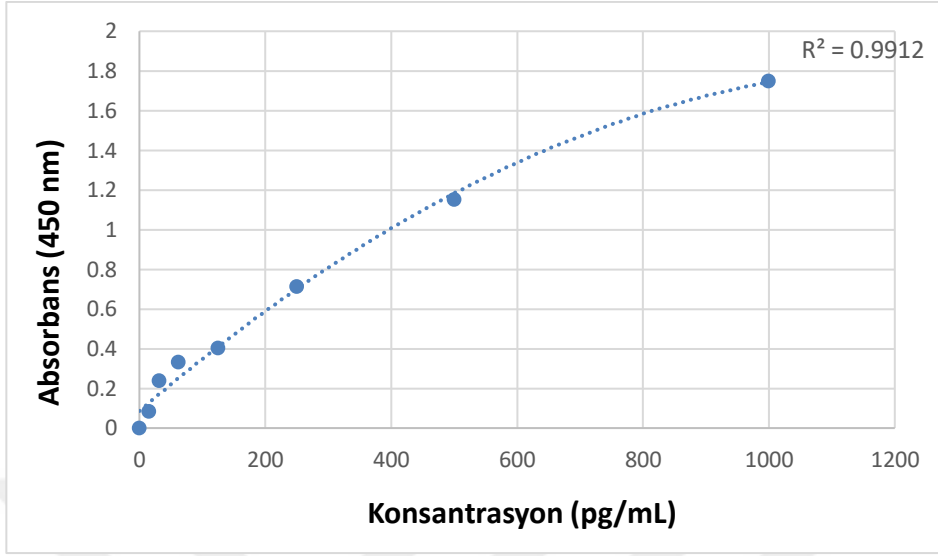
Doku örneklerinin 8-OHdG seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE10185, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku 8-OHdG seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 8'de gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 8.86 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 8: Doku 8-OHdG ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.10. Doku Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi

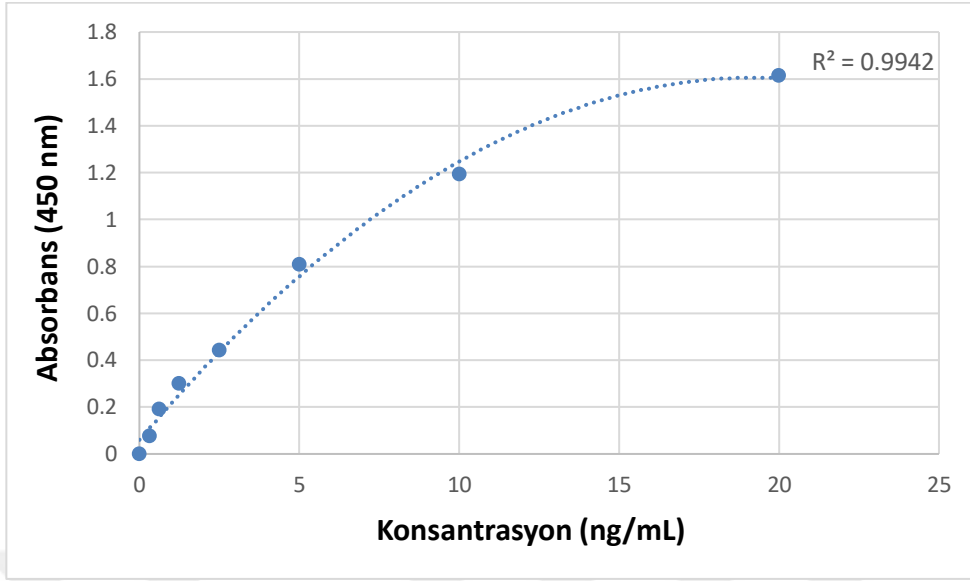
Doku örneklerinin TNF- α seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE1060R, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar pg/mg protein birimiyle verildi. Doku TNF- α seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 9'da gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 9.83 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 9: Doku TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.11. Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi

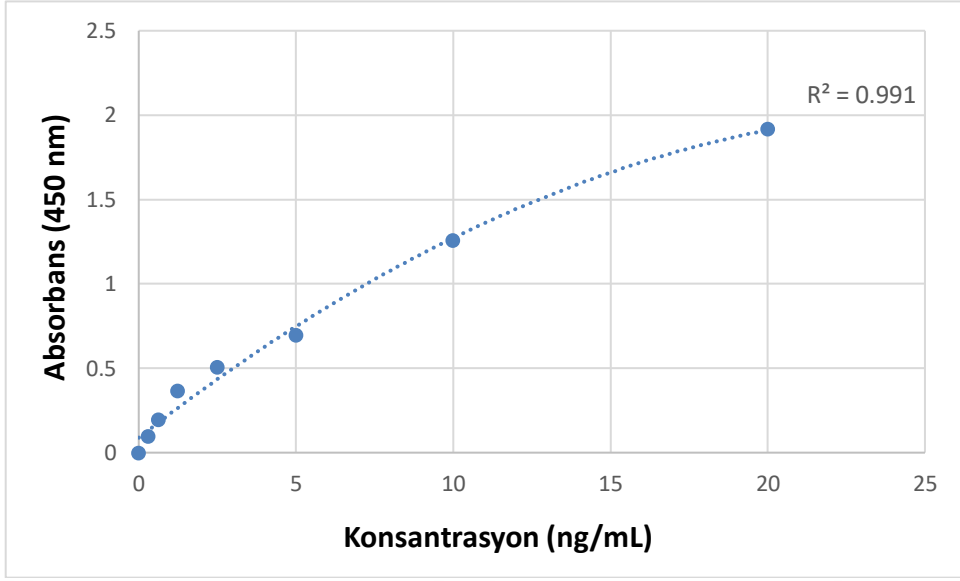
Doku örneklerinin MPO seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE3110R, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku MPO seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 10'da gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 9.10 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 10: Doku MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.12. Doku Kaspaz-3 (CASP3) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku örneklerinin CASP3 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Reed Biotech Ltd. Cat No: RE2850R, Wuhan, Çin) ile belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. CASP3 seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği Şekil 11’de gösterildi. Bu parametre için intra-assay kesinliğin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%CV) 8.20 olarak hesaplandı (n=10).



Şekil 11: CASP3 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.5.13. Doku Örneklerinde Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TOS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Turkey) ile belirlendi ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L birimiyle verildi.

3.5.14. Doku Örneklerinde Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi

Doku örneklerindeki TAS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Turkey) ile belirlendi ve sonuçlar mmol troloks eşdeğeri/L birimiyle verildi.

3.5.15. Doku Örneklerinde Oksidatif Stres İndekslerinin (OSI) Hesaplanması

Doku örneklerindeki OSI seviyeleri;

$$\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol troloks eşdeğeri/L})] \times 100$$

formülü ile hesaplandı (87).

3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS 23.0 istatistik programına aktarıldı. İstatistiksel hesaplamalarda çoklu grup karşılaştırmaları için ONE-WAY ANOVA yöntemi kullanılarak Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Gruplar arasındaki fark $p<0.05$ seviyesinde anlamlı olarak kabul edildi. Tablo olarak değerler ortalama $\pm$ standart sapma (ORT $\pm$ SD) olarak gösterildi aynı zamanda grup farklılıkları tablolar ve grafikler üzerinde simgelerle ifade edildi.



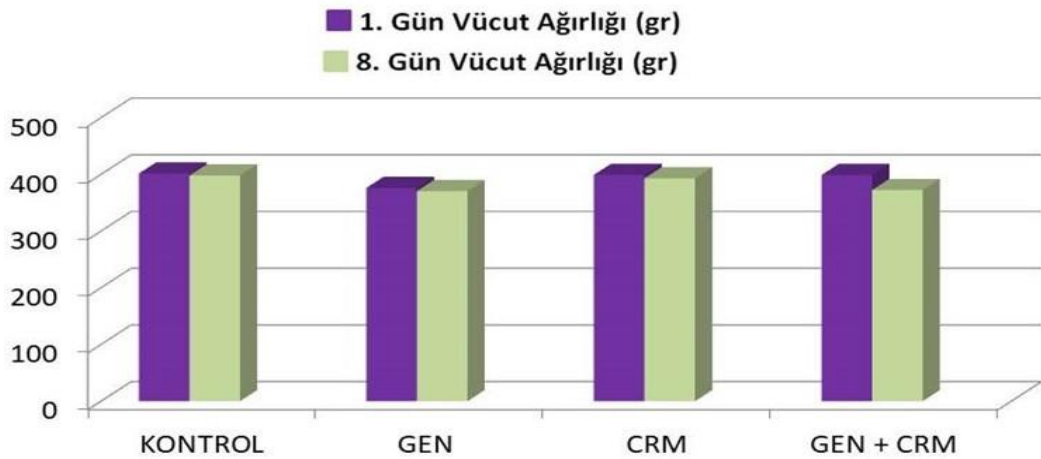
4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Dair Bulgular

Deneyin 1. günü ve 8. günü ölçülen vücut ağırlıklarına bakıldığında; her grupta 1. güne göre 8. günde ölçülen vücut ağırlıklarında bir azalma görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 7: Deneyin 1. günü ve 8. günü grupların vücut ağırlığı

Vücut Ağırlığı (gr)	KONTROL	GEN	CRM	GEN+CRM
1. Gün Vücut Ağırlığı (gr)	401,66 ± 54,13	376,33 ± 54,42	399,33 ± 43,03	399,00 ± 32,09
8. Gün Vücut Ağırlığı (gr)	398,00 ± 59,18	370,60 ± 40,74	393,16 ± 44,16	372,40 ± 23,30



Şekil 12: Deneyin 1. günü ve 8. günü deneklerin vücut ağırlığı

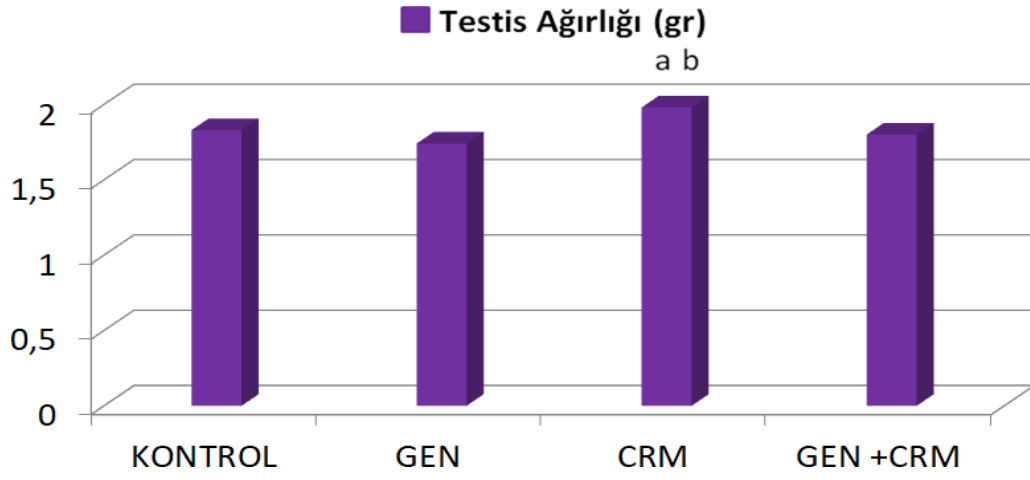
Deneyin 8. günü ölçülen sol testis ağırlıklarına bakıldığında K kıyasla GEN ve GEN+CRM gruplarında testis ağırlıkları daha az ölçüldü ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. CRM grubunda ise K ve GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde testis ağırlıklarında artış olduğu görüldü. Testis/kütle indekslerine bakıldığında ise hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 8: Deney sonu grupların testis ağırlıkları

GRUP	Testis Ağırlığı (gr)
KONTROL Ort±SD	1,83 ± 0,07
GEN Ort±SD	1,74 ± 0,15
CRM Ort±SD	1,98 ± 0,14 ^{ab}
GEN+CRM Ort±SD	1,80 ± 0,16

a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p<0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p<0,05$



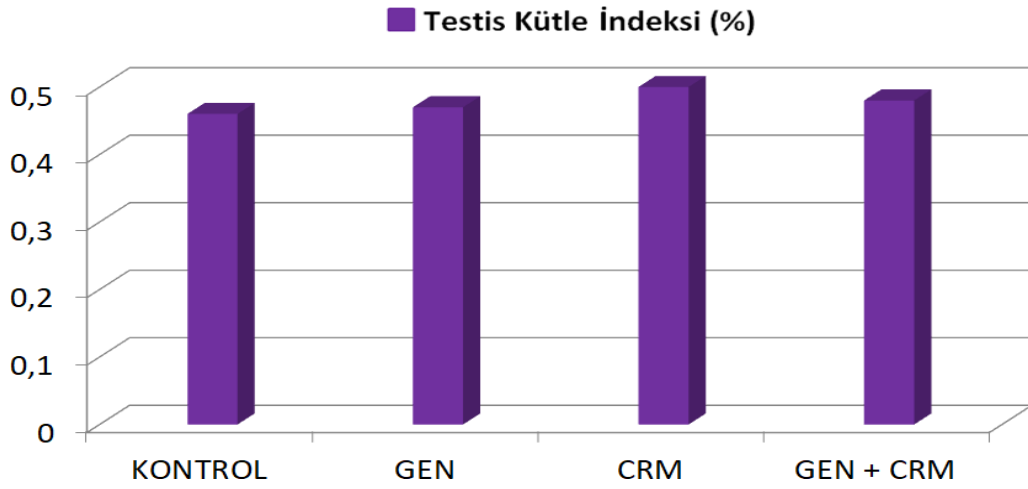
a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 13: Deney sonu grupların testis ağırlıkları

Tablo 9: Deney sonu grupların testis/kütle indeksleri

GRUP	Testis Kütle İndeksi (%)
KONTROL Ort±SD	0,46 ± 0,06
GEN Ort±SD	0,47 ± 0,04
CRM Ort±SD	0,50 ± 0,04
GEN+CRM Ort±SD	0,48 ± 0,05



Şekil 14: Deney sonu grupların testis/kütle indeksleri

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Hemotoksilen & Eozin Boyama Bulguları

Mutlak Seminifer Tübül Hacmi, Total Seminifer Tübül Uzunluğu, Total Seminifer Tübül Yüzey Alanı

Mutlak seminifer tübül hacminde K grubuna kıyasla GEN grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma; CRM grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi. GEN+CRM grubunda ise K grubuna göre anlamlı bir azalma olmakla birlikte GEN grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldü.

Total seminifer tübül uzunluğunda GEN grubuna göre K grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. CRM ve GEN+CRM gruplarında GEN grubuna göre bir artış görülmekle birlikte bu artış CRM grubunda istatistiksel olarak anlamlı; GEN+CRM grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı değildi.

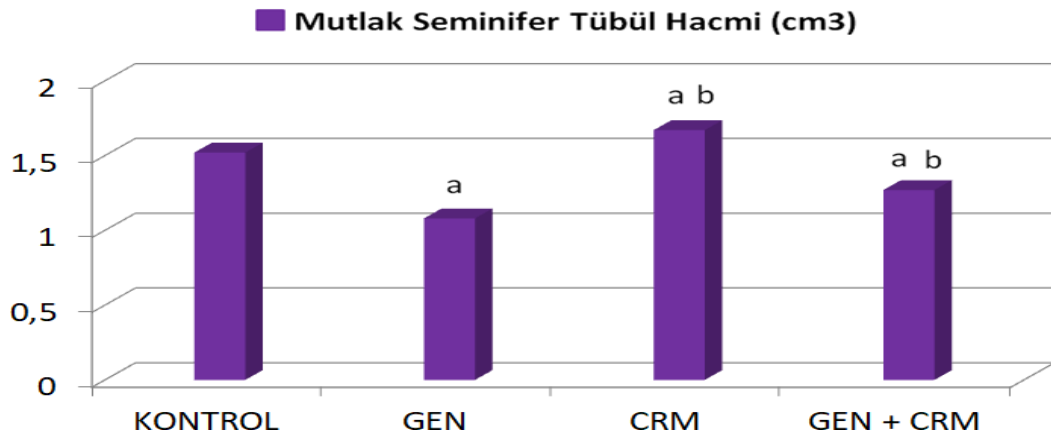
K grubuna kıyasla total seminifer tübül yüzey alanında GEN grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma; CRM grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi. GEN+CRM grubunda ise K grubuna göre anlamlı bir azalma olmakla birlikte GEN grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldü.

Tablo 10: Deney sonu grupların mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül uzunluğu, total seminifer tübül yüzey alanı değerleri

GRUP	Mutlak Seminifer Tübül Hacmi (cm ³)	Total Seminifer Tübül Uzunluğu (cm)	Total Seminifer Tübül Yüzey Alanı (cm ²)
KONTROL Ort±SD	1,52 ± 0,06	2191,12 ± 138,20	204,57 ± 8,91
GEN Ort±SD	1,08 ± 0,03 ^a	1388,26 ± 139,94 ^a	137,38 ± 8,34 ^a
CRM Ort±SD	1,67 ± 0,01 ^{ab}	2255,45 ± 114,99 ^b	217,83 ± 5,77 ^{ab}
GEN+CRM Ort±SD	1,27 ± 0,01 ^{ab}	1713,79 ± 156,51 ^a	165,54 ± 7,53 ^{ab}

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

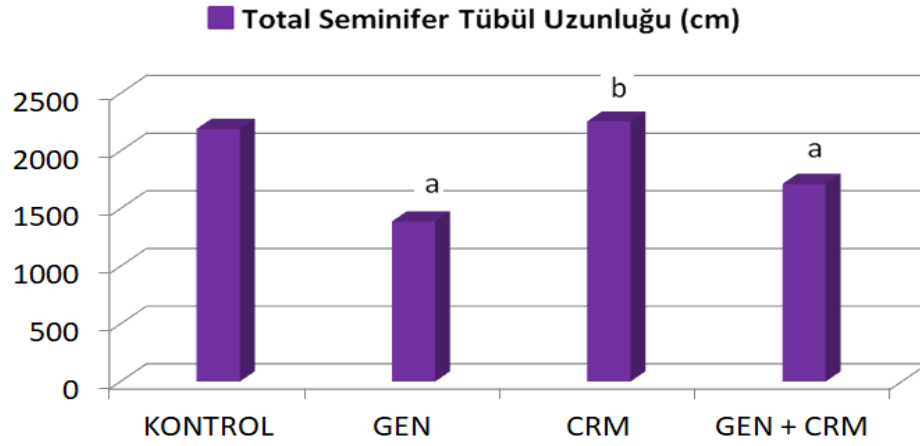
b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

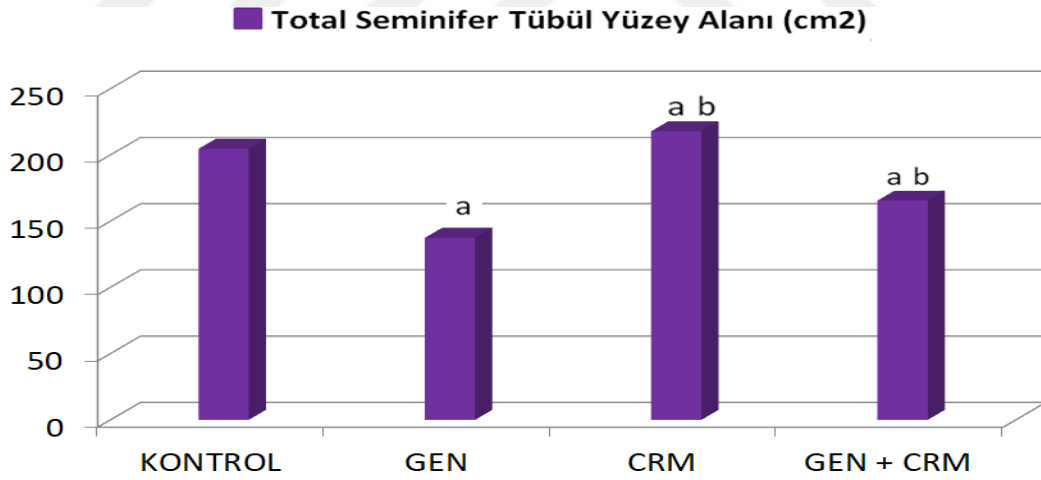
Şekil 15: Deney sonu grupların mutlak seminifer tübül hacmi



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 16: Deney sonu grupların total seminifer tübül uzunluğu



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 17: Deney sonu grupların total seminifer tübül yüzey alanı

Total Sertoli Hücre Sayısı, Gram Başına Düşen Sertoli Hücre Sayısı

Total Sertoli hücre sayısı açısından bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gözlemlendi.

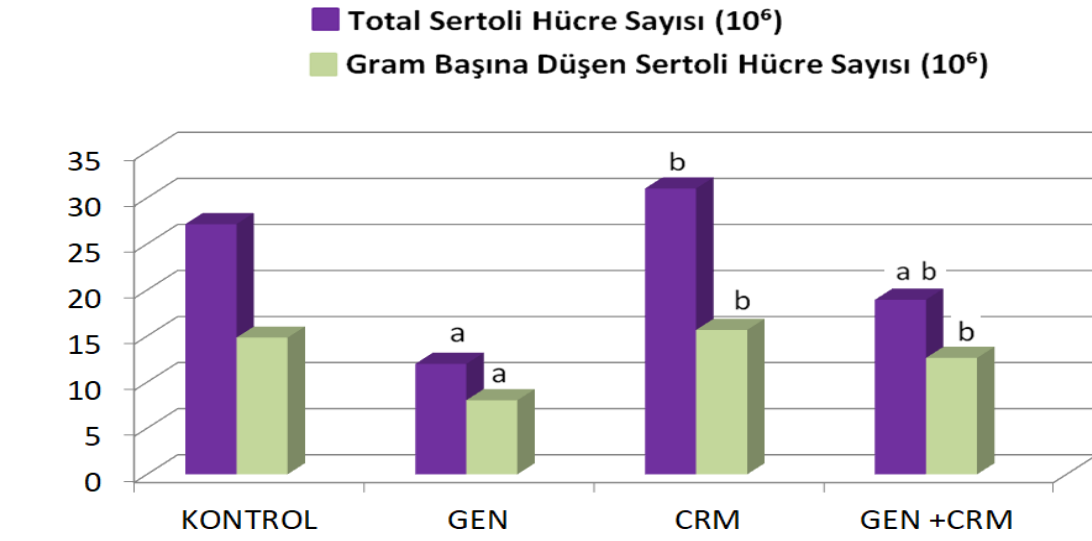
GEN+CRM grubunda ise K grubuna göre anlamlı bir azalma olmakla birlikte GEN grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldü. GEN grubunda gram başına düşen Sertoli hücre sayısı K ve CRM gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı. GEN+CRM grubunda ise K grubuna kıyasla azalma görülmekle beraber bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. GEN grubuna göre ise GEN+CRM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü.

Tablo 11: Deney sonu grupların total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı

GRUP	Total Sertoli Hücre Sayısı (10^6)	Gram Başına Düşen Sertoli Hücre Sayısı (10^6)
KONTROL Ort±SD	27,15 ± 6,07	14,83 ± 3,31
GEN Ort±SD	11,98 ± 2,96 ^a	8,04 ± 1,98 ^a
CRM Ort±SD	31,02 ± 4,55 ^b	15,67 ± 2,30 ^b
GEN+CRM Ort±SD	18,94 ± 3,76 ^{ab}	12,63 ± 2,51 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p<0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p<0,05$



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 18: Deney sonu grupların total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı

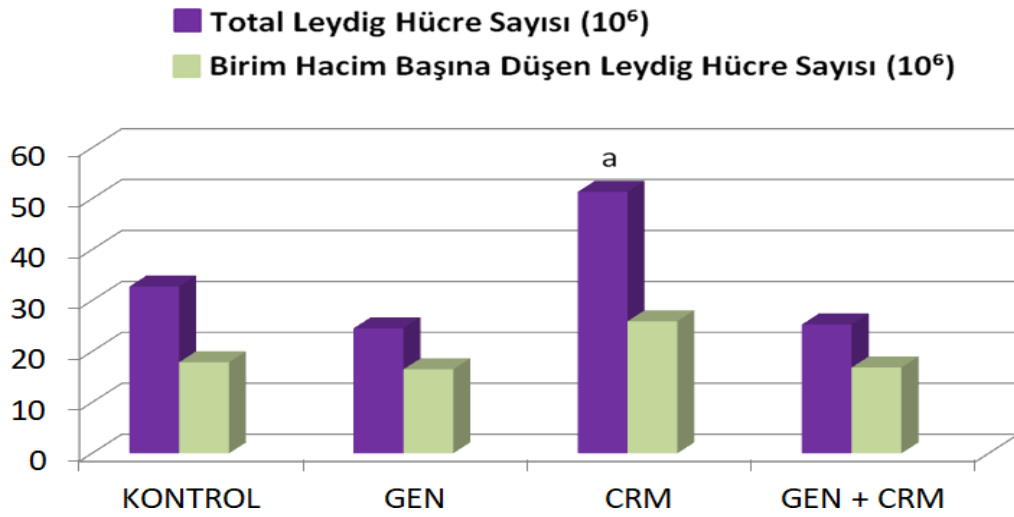
Total Leydig Hücre Sayısı ve Birim Hacim Başına Düşen Leydig Hücre Sayısı

Total Leydig hücre sayısı CRM grubunda GEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde fazla ölçüldü. Birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısına bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi.

Tablo 12: Deney sonu grupların total Leydig hücre sayısı ve birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı

GRUP	Total Leydig Hücre Sayısı (10^6)	Birim Hacim Başına Düşen Leydig Hücre Sayısı (10^6)
KONTROL Ort±SD	32,75 ± 10,26	17,89 ± 5,60
GEN Ort±SD	24,55 ± 11,45	16,48 ± 7,68
CRM Ort±SD	51,34 ± 21,87 ^a	25,93 ± 11,04
GEN+CRM Ort±SD	25,30 ± 12,62	16,86 ± 8,41

a: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p<0,05$



a: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p<0,05$

Şekil 19: Deney sonu grupların total Leydig hücre sayısı ve birim hacim başına düşen Leydig hücre sayısı

Total Round Spermatid Sayısı, Günlük Sperm Üretimi ve Gram Başına Düşen Günlük Sperm Üretimi

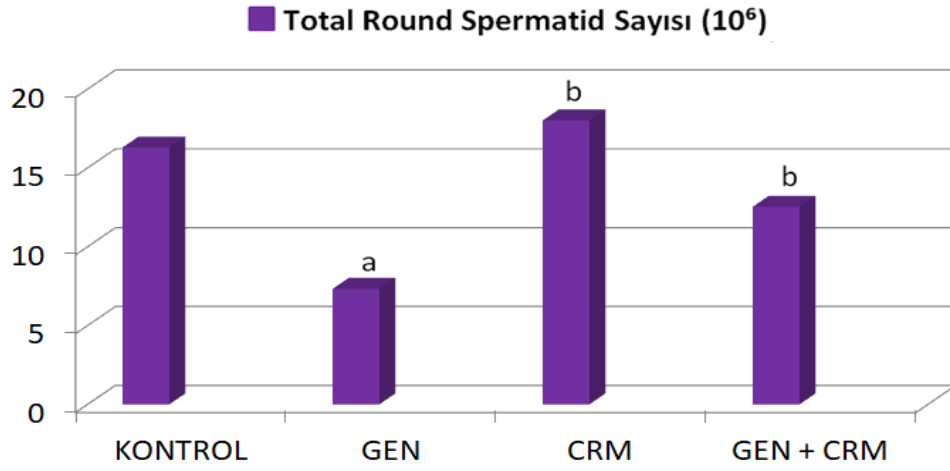
Total round spermatid sayısı, günlük sperm üretimi ve gram başına düşen günlük sperm üretiminde GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. GEN+CRM grubunda ise K grubuna kıyasla azalma görülmekle beraber bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. GEN grubuna göre GEN+CRM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi.

Tablo 13: Deney sonu grupların Total Round Spermatid Sayısı, Günlük Sperm Üretimi ve Gram Başına Düşen Günlük Sperm Üretimi

GRUP	Total Round Spermatid Sayısı (10 ⁶)	Günlük Sperm Üretimi (10 ⁴)	Gram Başına Düşen Günlük Sperm Üretimi (10 ⁴)
KONTROL Ort±SD	16,30 ± 3,47	41,90 ± 8,93	22,90 ± 4,88
GEN Ort±SD	7,33 ± 1,24 ^a	18,84 ± 3,20 ^a	12,64 ± 2,15 ^a
CRM Ort±SD	18,01 ± 3,20 ^b	46,29 ± 8,15 ^b	23,38 ± 4,11 ^b
GEN+CRM Ort±SD	12,54 ± 2,82 ^b	32,25 ± 7,26 ^b	21,50 ± 4,84 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

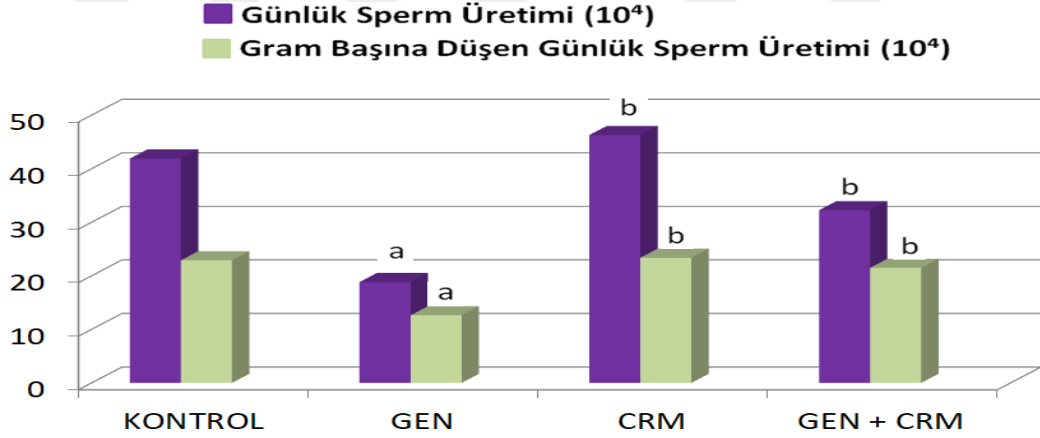
b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 20: Deney sonu grupların Total Round Spermatid Sayısı



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 21: Deney sonu grupların Günlük Sperm Üretimi ve Gram Başına Düşen Günlük Sperm Üretimi

Germinal Epitelde Ayrılma

K grubu ile CRM grubu arasında germinal epitelde ayrılma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. GEN grubunda ise K grubuna göre

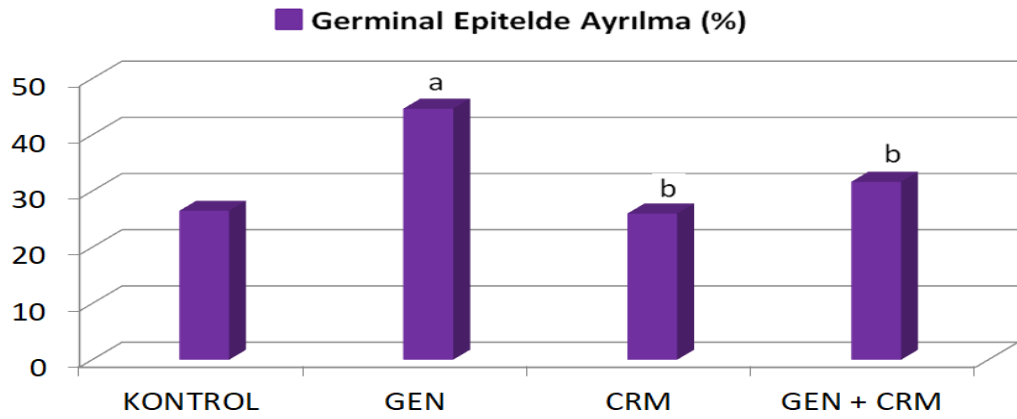
istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde germinal epitelde ayrılma gözlemlendi. GEN+CRM grubunda K grubuna göre bir artış gözlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. GEN grubuna göre ise GEN+CRM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlendi.

Tablo 14: Deney sonu grupların germinal epitelde ayrılma yüzdeleri

GRUP	Germinal Epitelde Ayrılma (%)
KONTROL Ort±SD	26,50 ± 4,37
GEN Ort±SD	44,66 ± 5,75 ^a
CRM Ort±SD	26,00 ± 6,78 ^b
GEN+CRM Ort±SD	31,66 ± 8,04 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p<0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p<0,05$



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 22: Deney sonu grupların germinal epitelde ayrılma yüzdeleri

Modifiye Johnsen Skoru

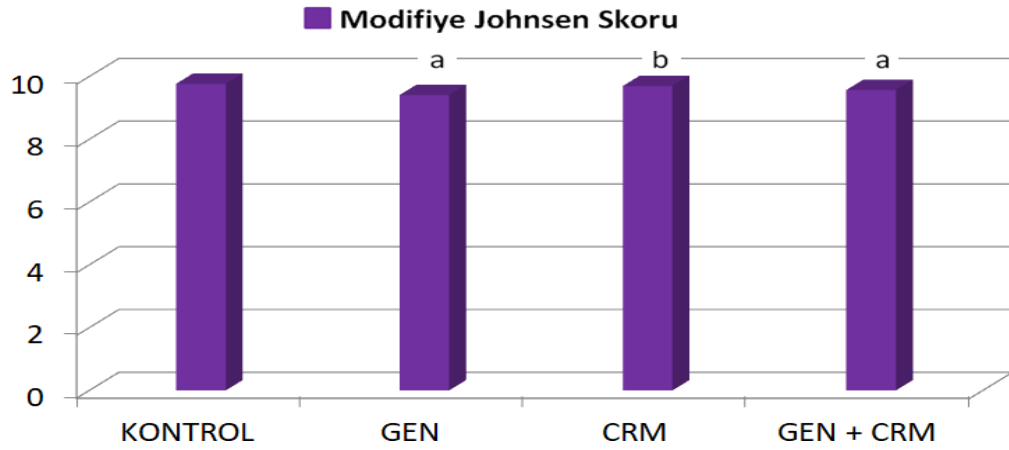
Modifiye Johnsen skoru açısından bakıldığında K grubu ile CRM grubunda birbirine yakın değerler bulundu. GEN ve GEN+CRM grupları K grubuyla karşılaştırıldığında GEN grubunda daha belirgin olmak üzere her iki grupta da K grubuna göre Modifiye Johnsen skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. GEN+CRM grubunda GEN grubuna kıyasla bir artış olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 15: Deney sonu grupların Modifiye Johnsen Skorları

GRUP	Modifiye Johnsen Skoru
KONTROL Ort±SD	9,77 ± 0,08
GEN Ort±SD	9,41 ± 0,07 ^a
CRM Ort±SD	9,70 ± 0,09 ^b
GEN+CRM Ort±SD	9,57 ± 0,14 ^a

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

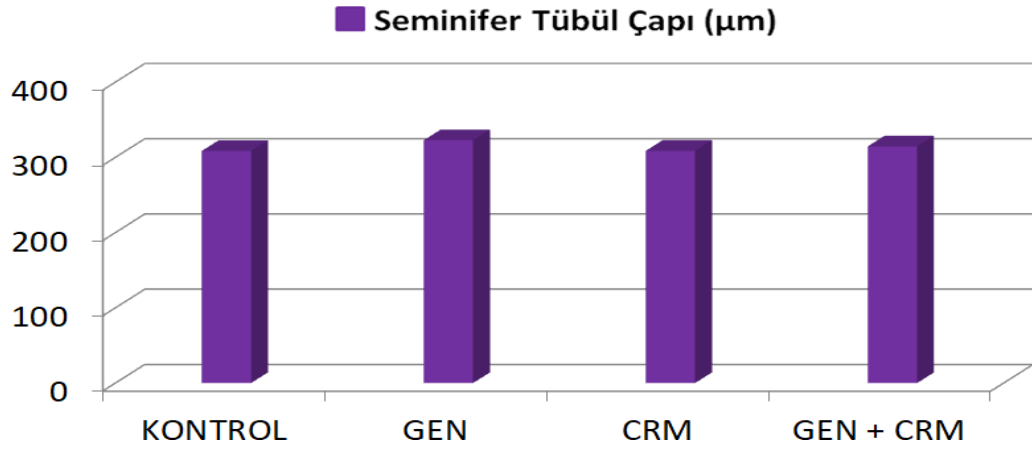
Şekil 23: Deney sonu grupların Modifiye Johnsen Skorları

Seminifer Tübül Çapı

Seminifer tübül çapı açısından bakıldığında GEN grubunda K grubuna kıyasla belirgin bir artış olmakla birlikte hiçbir grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 16: Deney sonu grupların seminifer tübül çap değerleri

GRUP	Seminifer Tübül Çapı (µm)
KONTROL Ort±SD	308,50 ± 17,29
GEN Ort±SD	322,75 ± 16,52
CRM Ort±SD	308,68 ± 14,12
GEN+CRM Ort±SD	314,65 ± 17,45



Şekil 24: Deney sonu grupların seminifer tübül çap değerleri

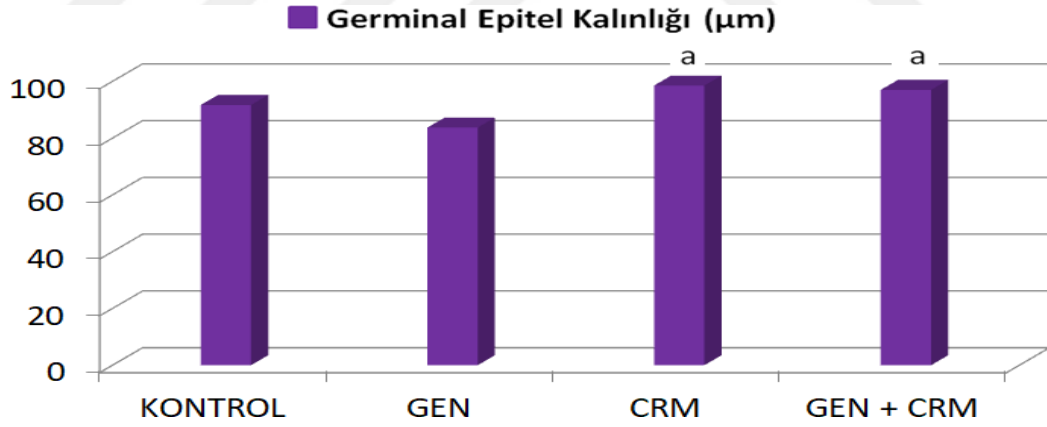
Germinal Epitel Kalınlığı

K grubu ile CRM grubu arasında germinal epitel kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. GEN grubunda K grubuna göre germinal epitel kalınlığında azalma gözlemlendi, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. GEN+CRM ve CRM gruplarında GEN grubuna göre germinal epitel yüksekliğinde anlamlı bir artış görüldü.

Tablo 17: Deney sonu grupların germinal epitel kalınlık değerleri

GRUP	Germinal Epitel Kalınlığı (μm)
KONTROL Ort±SD	91,66 ± 8,58
GEN Ort±SD	83,70 ± 5,28
CRM Ort±SD	98,51 ± 7,30 ^a
GEN+CRM Ort±SD	96,98 ± 7,55 ^a

a: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

Şekil 25: Deney sonu grupların germinal epitel kalınlık değerleri

Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı Oranı

Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı oranı ile tübül başına düşen germinal epitel kalınlığına bakıldığında GEN grubunda K grubuna göre istatistiksel

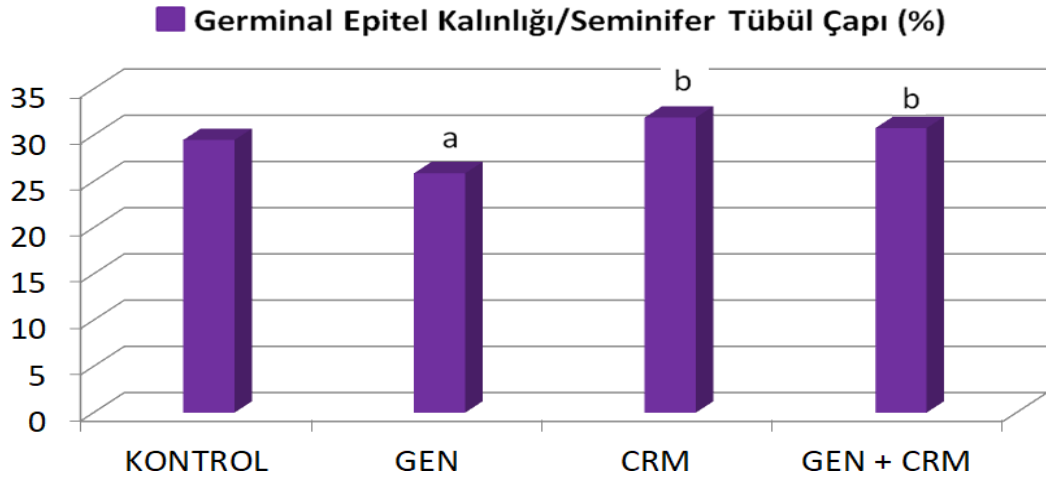
olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. CRM ve GEN+CRM gruplarında K grubuna yakın değerler gözlemlendi. GEN+CRM grubunda GEN grubuna göre tübül başına düşen germinal epitel yüksekliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi.

Tablo 18: Deney sonu grupların Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı oranları

GRUP	Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı (%)
KONTROL Ort±SD	29,48 ± 2,21
GEN Ort±SD	25,88 ± 0,89 ^a
CRM Ort±SD	31,90 ± 2,58 ^b
GEN+CRM Ort±SD	30,76 ± 2,64 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

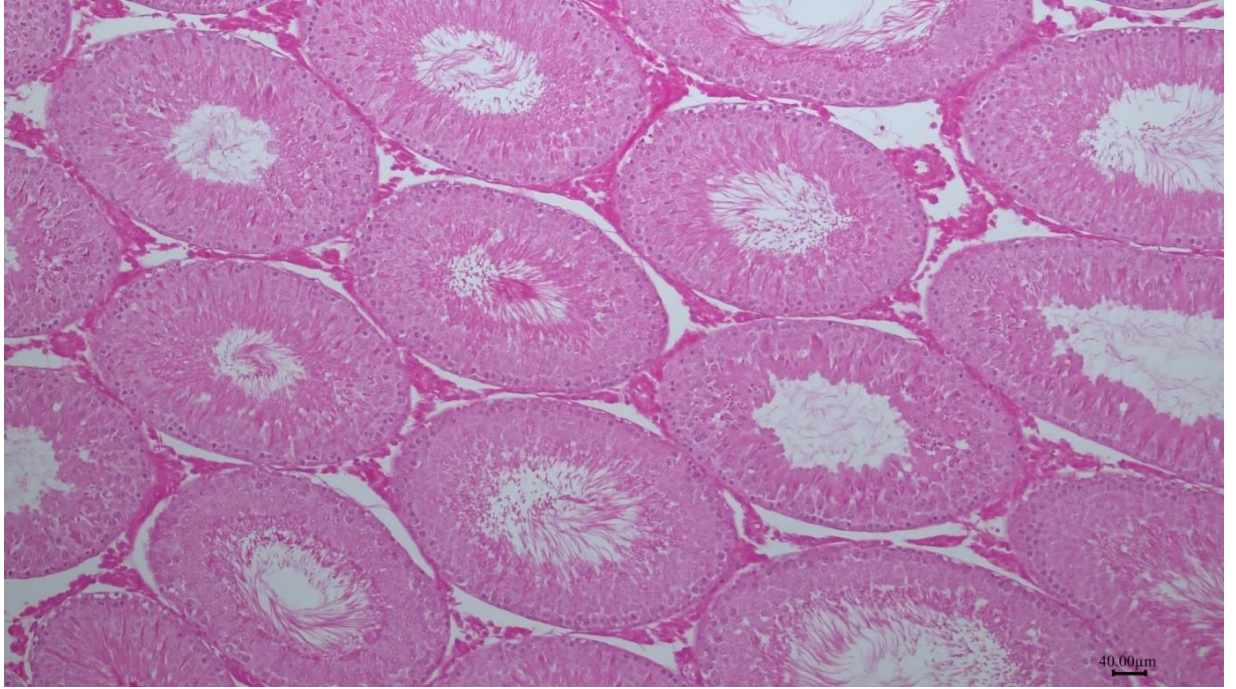
b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



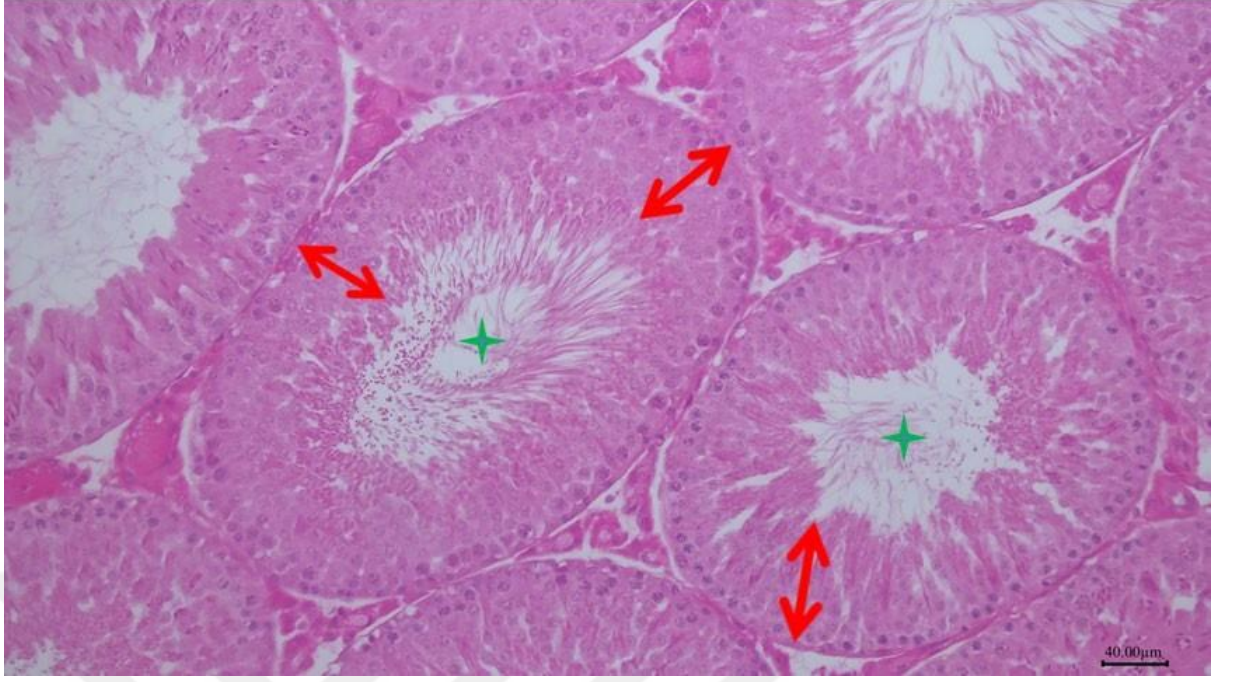
a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

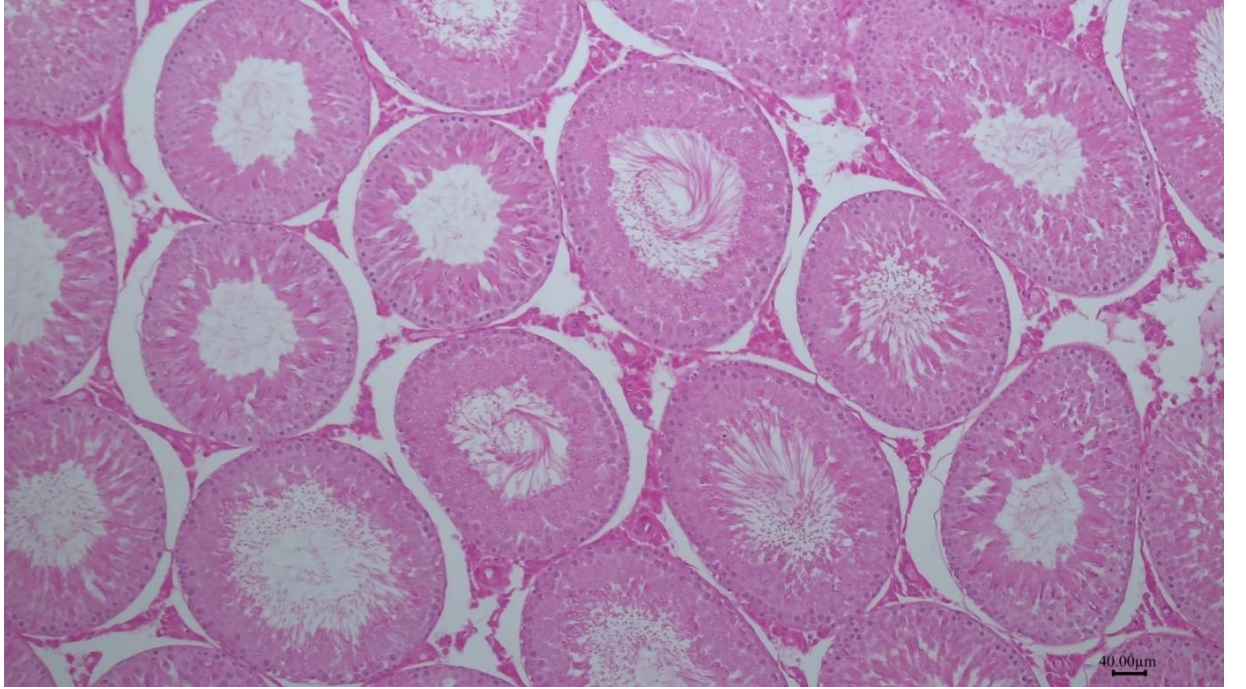
Şekil 26: Deney sonu grupların Germinal Epitel Kalınlığı / Seminifer Tübül Çapı oranları



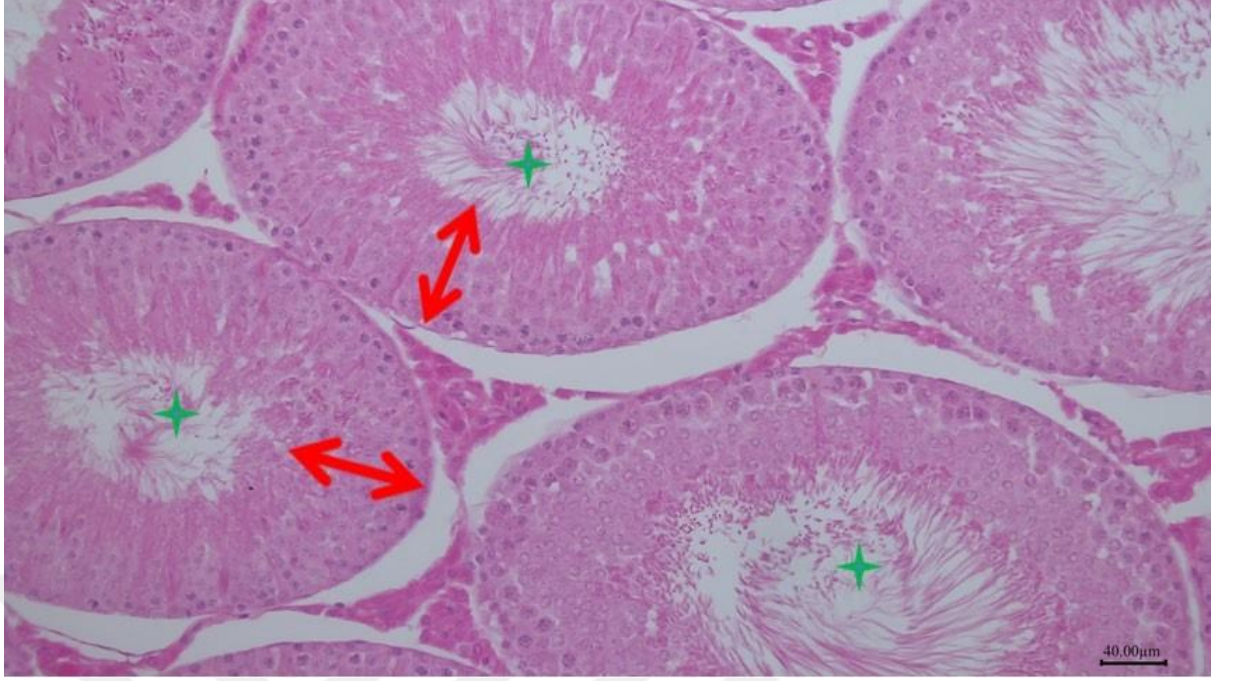
Resim 9: Kontrol grubu genel görünüm (Hematoksilen&Eozin X100)



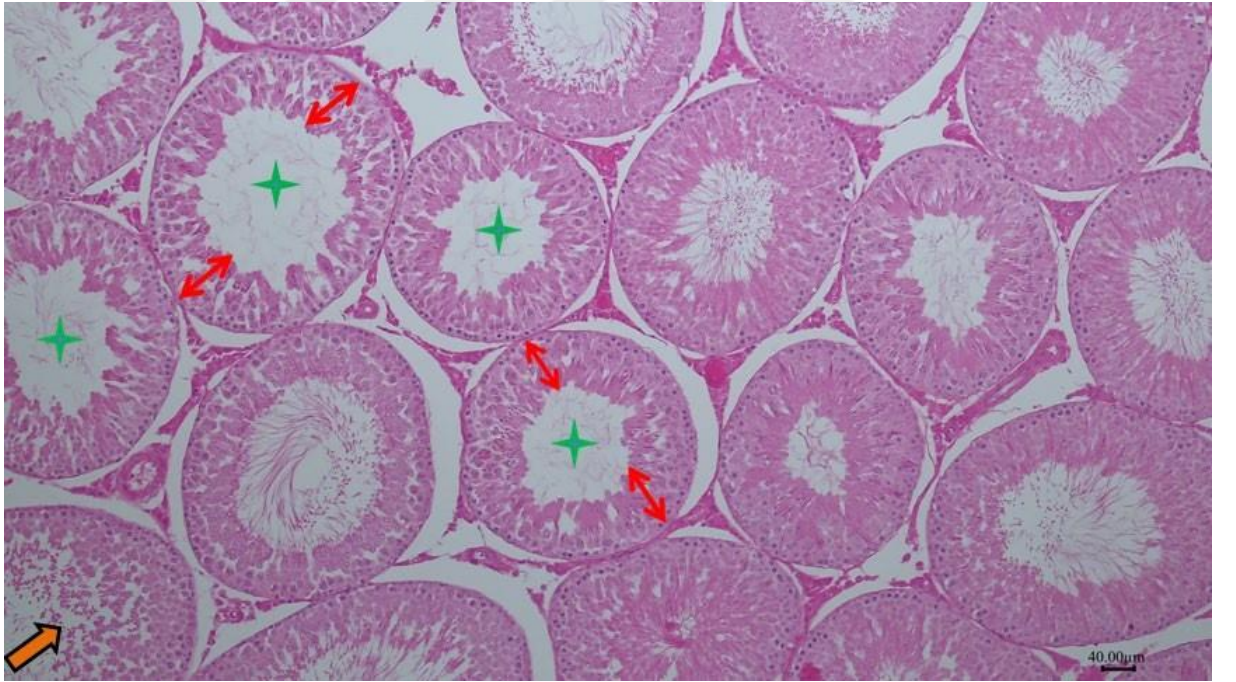
Resim 10: Kontrol grubu normal görünümde germinal epitel (kırmızı çift başlı ok), normal görünümde spermatozoa (yeşil dörtgen) (Hematoksilen&Eozin X200)



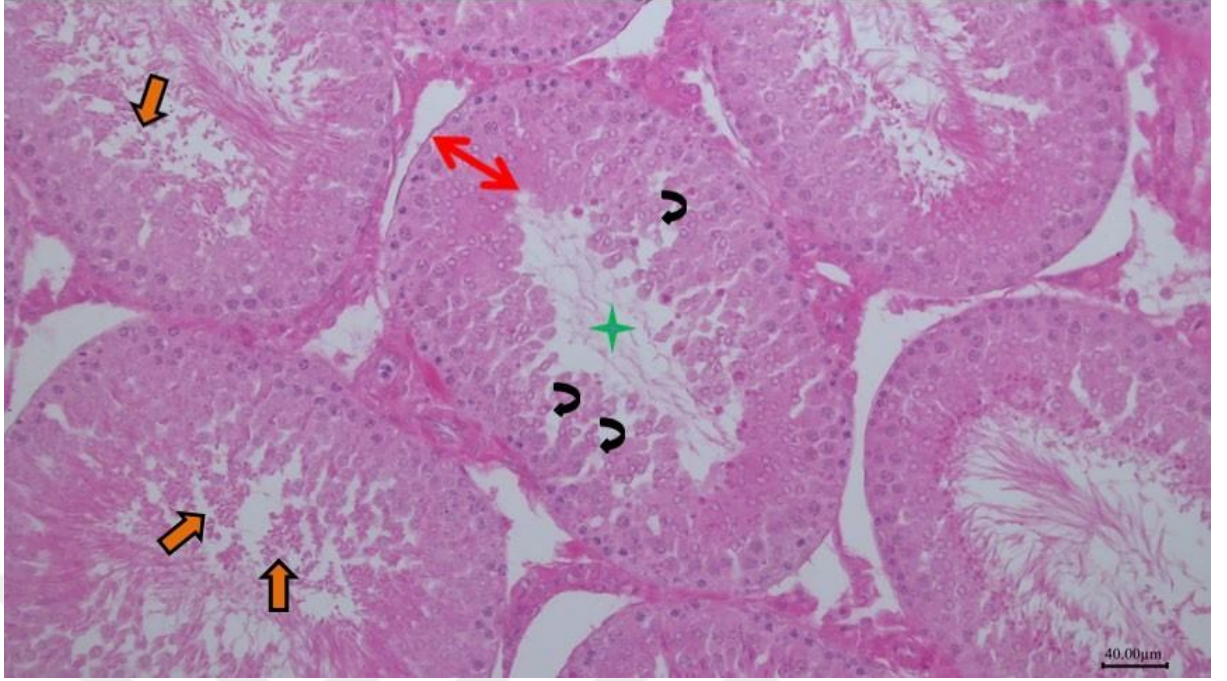
Resim 11: Kurkumin grubu genel görünüm (Hematoksilen&Eozin X100)



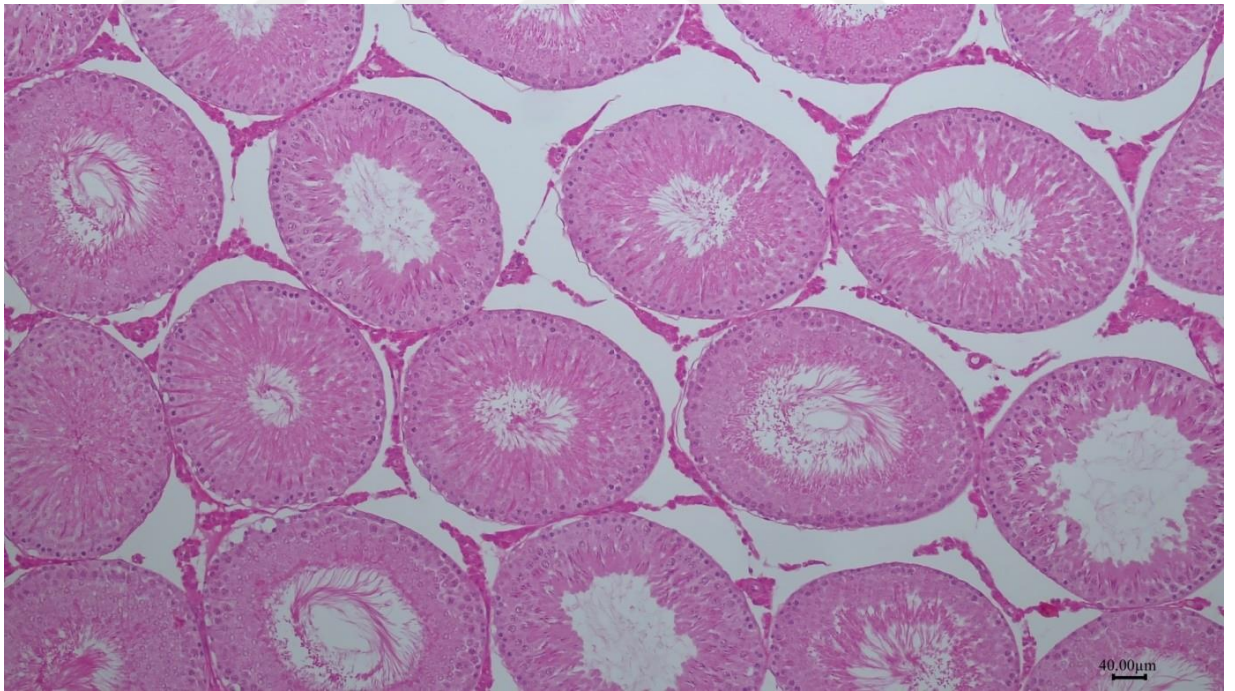
Resim 12: Kurkumin grubu normal görünümde germinal epitel (kırmızı çift başlı ok), normal görünümde spermatozoalar (yeşil dörtgen) (Hematoksilen&Eozin X200)



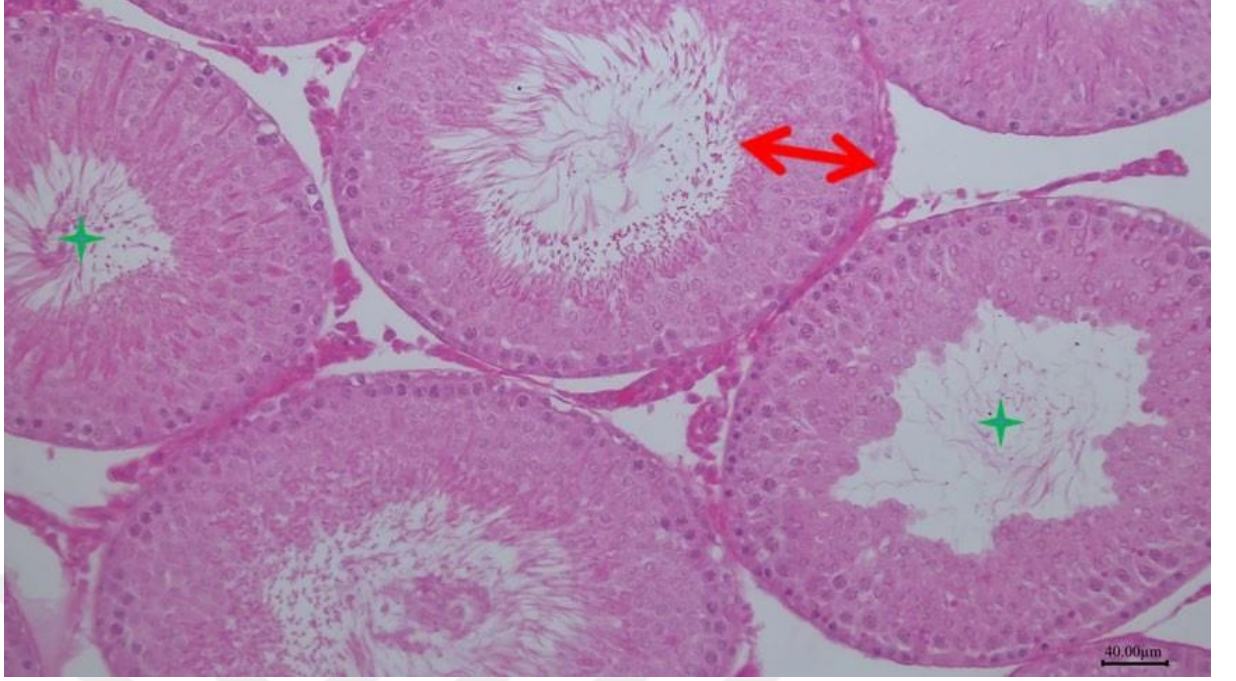
Resim 13: Gentamisin grubu genel görünüm germinal epitelde azalma (kırmızı çift başlı ok), azalmış spermatozoa (yeşil dörtgen), spermatogenezde bozulma (turuncu ok) (Hematoksilen&Eozin X100)



Resim 14: Gentamisin grubu germinal epitelde azalma (kırmızı çift başlı ok), azalmış spermatozoa (yeşil dörtgen), spermatogenezde bozulma (turuncu ok), germinal epitelde ayrılma (siyah kıvrık ok) (Hematoksilen&Eozin X200)



Resim 15: Gentamisin + Kurkumin grubu genel görünüm (Hematoksilen&Eozin X100)



Resim 16: Gentamisin+Kurkumin grubu normal görünümde germinal epitel (kırmızı çift başlı ok), tübül içi spermatozoa miktarında kısmi iyileşme (yeşil dörtgen) (Hematoksilen&Eozin X200)

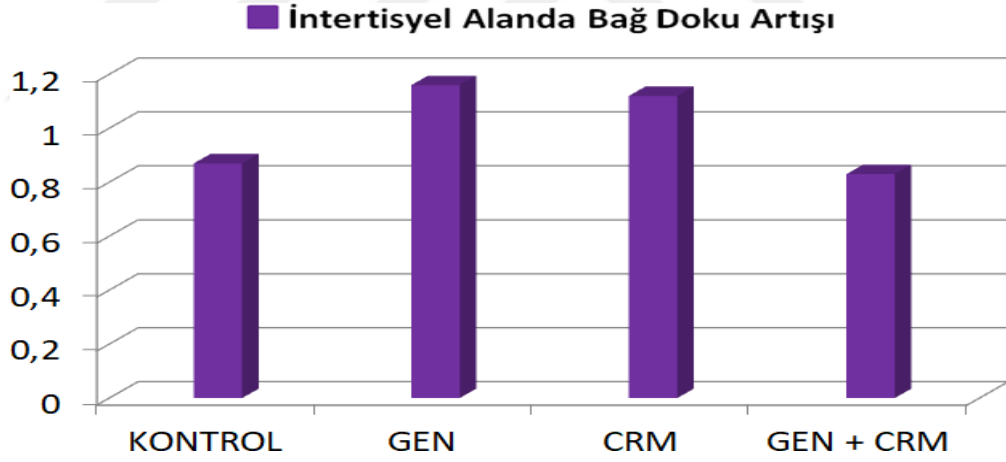
4.2.2. Masson Trikrom Boyama Bulguları

İnterstisyel Alanda Bağ Doku Artışı

İnterstisyel alanda bağ doku artışında GEN grubunda K ve CRM grubuna kıyasla artış oldu. Ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 19: Deney sonu grupların interstisyel alanda bağ doku artış skorlaması

GRUP	İnterstisyel Alanda Bağ Doku Artışı
KONTROL Ort±SD	0,87 ± 0,35
GEN Ort±SD	1,16 ± 0,4
CRM Ort±SD	1,12 ± 0,35
GEN+CRM Ort±SD	1,14 ± 0,37



Şekil 27: Deney sonu grupların interstisyel alanda bağ doku artış skorlaması

İnterstisyel Alanda Ödem

İnterstisyel alanda ödem K ve CRM grubunda birbirine yakın oranda izlendi. GEN grubunda interstisyel alanda yer yer ödem izlenmiş olup K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. GEN+CRM grubunda

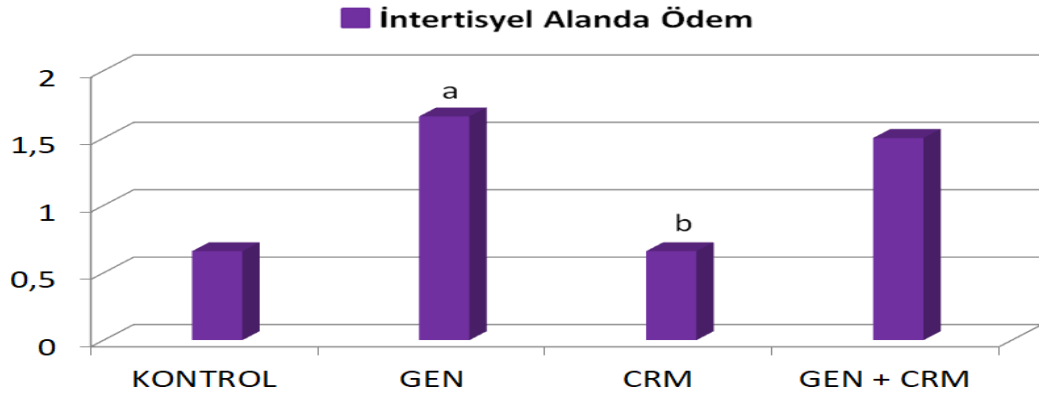
GEN grubuna kıyasla bir azalma gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 20: Deney sonu grupların interstisyel alanda ödem skorlaması

GRUP	İnterstisyel Alanda Ödem
KONTROL Ort±SD	0,66 ± 0,53
GEN Ort±SD	1,66 ± 0,51 ^a
CRM Ort±SD	0,66 ± 0,51 ^b
GEN+CRM Ort±SD	1,50 ± 0,54

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

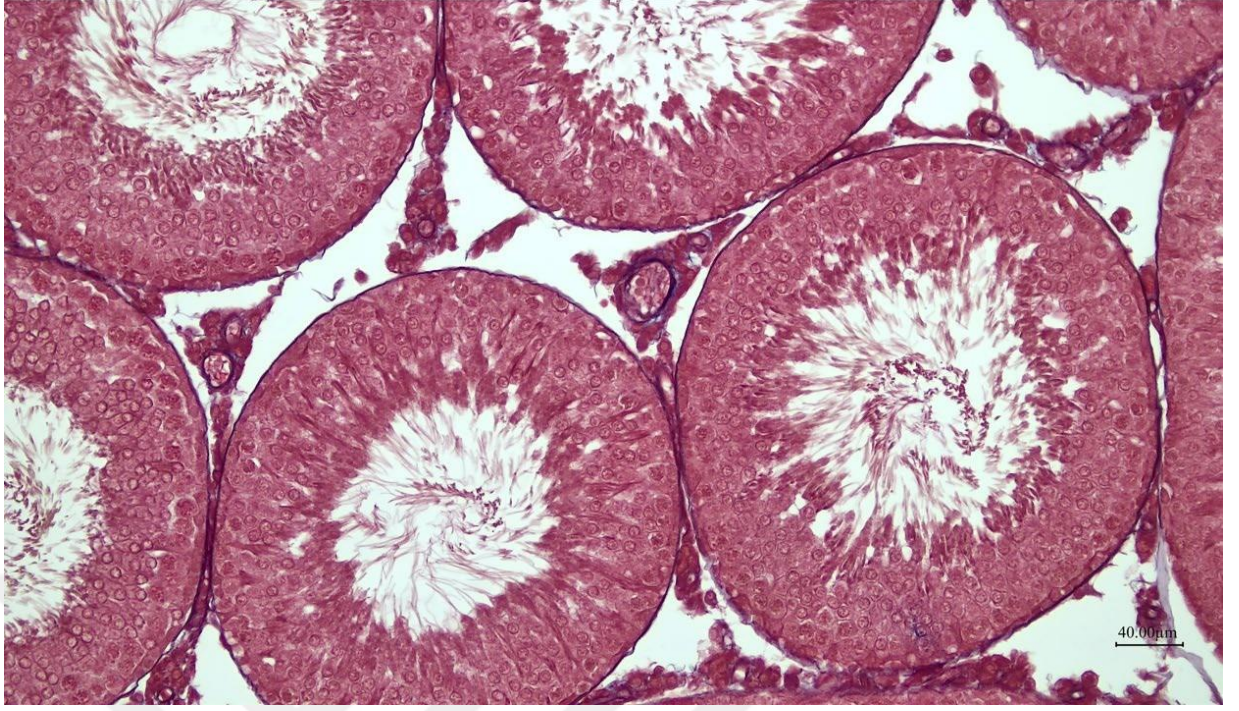
b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



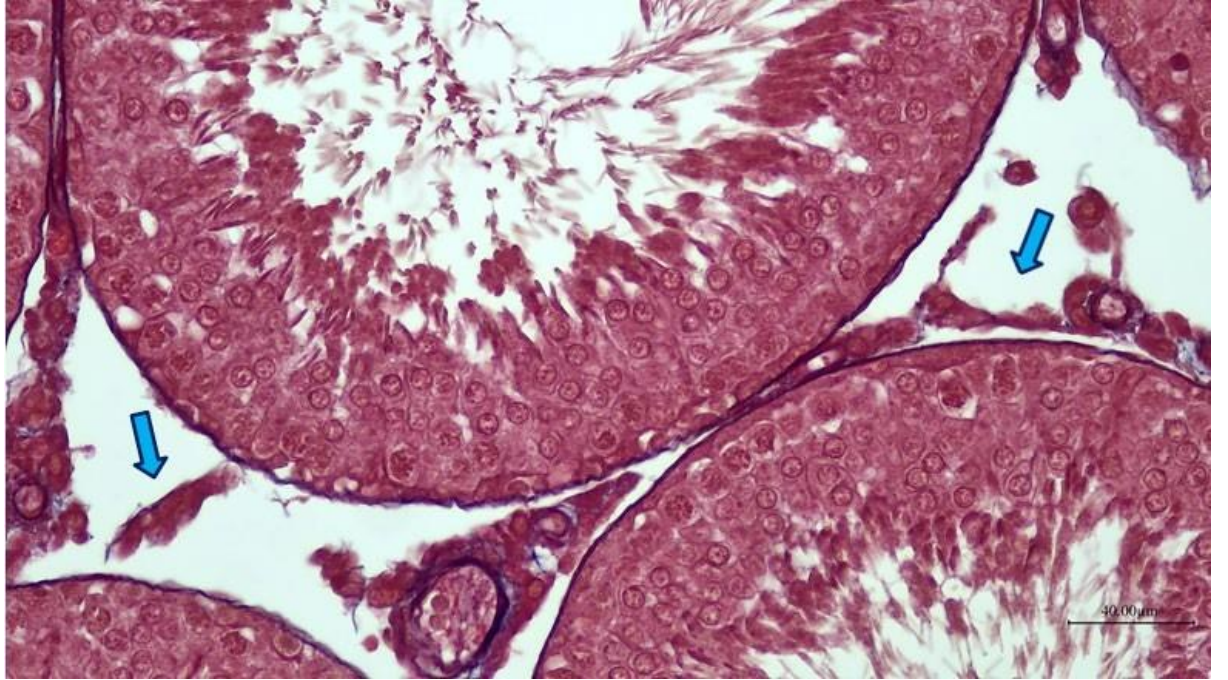
a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

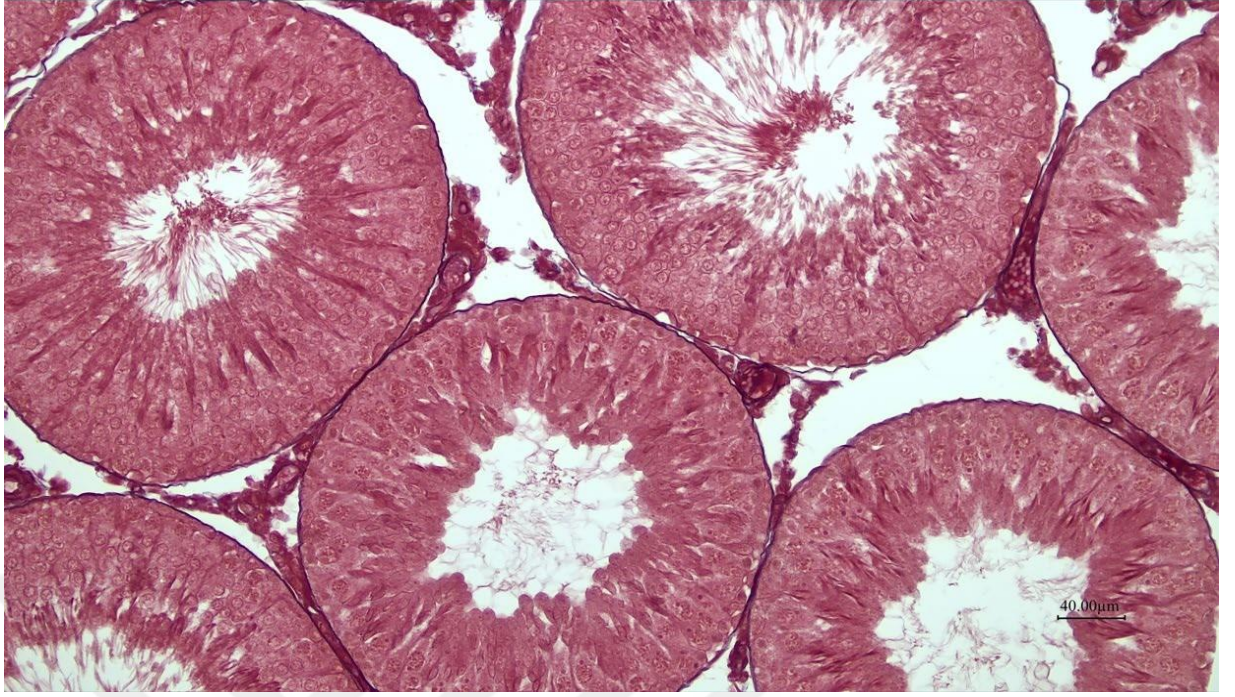
Şekil 28: Deney sonu grupların interstisyel alanda ödem skorlaması



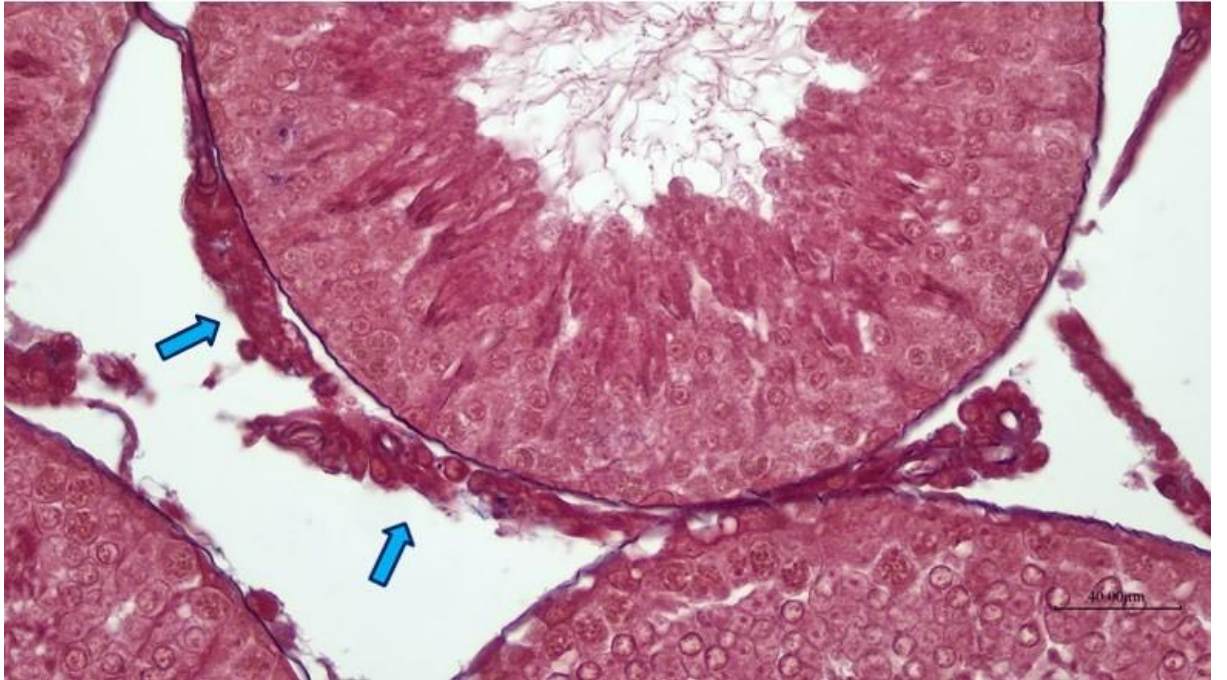
Resim 17: Kontrol grubu genel görünüm (Masson Trikrom X200)



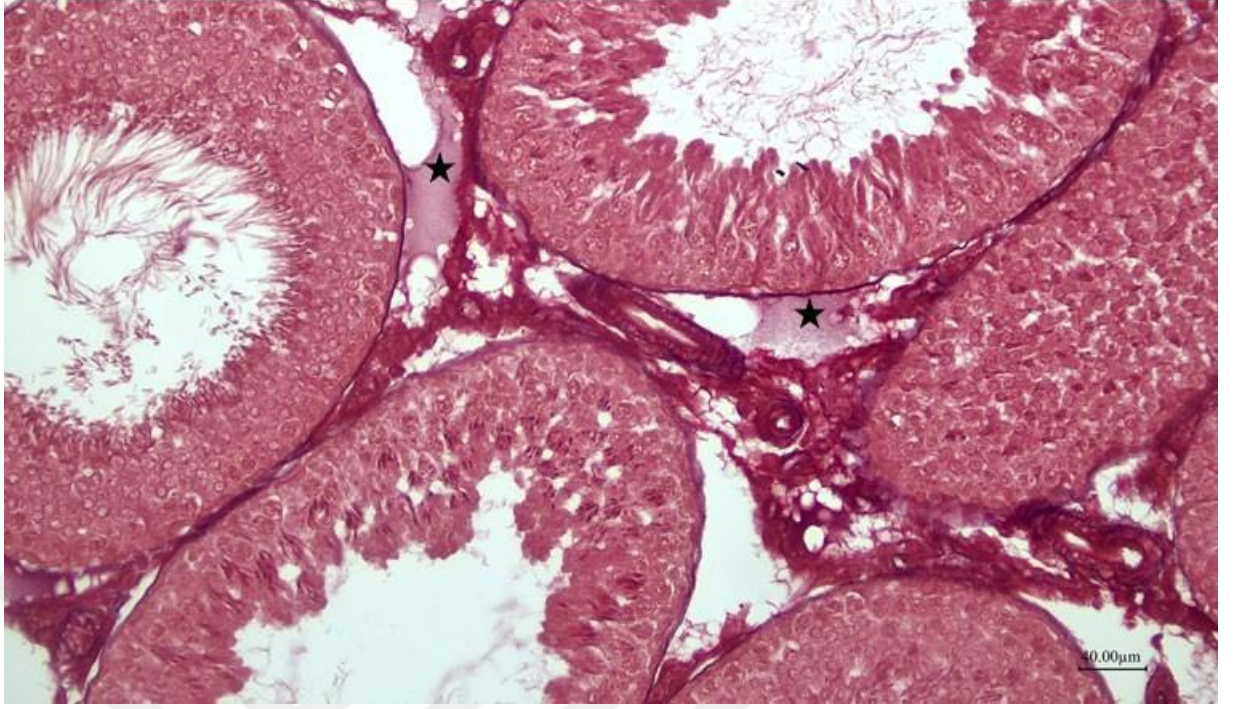
Resim 18: Kontrol grubu normal görünümde interstisyel alan (mavi ok) (Masson Trikrom X400)



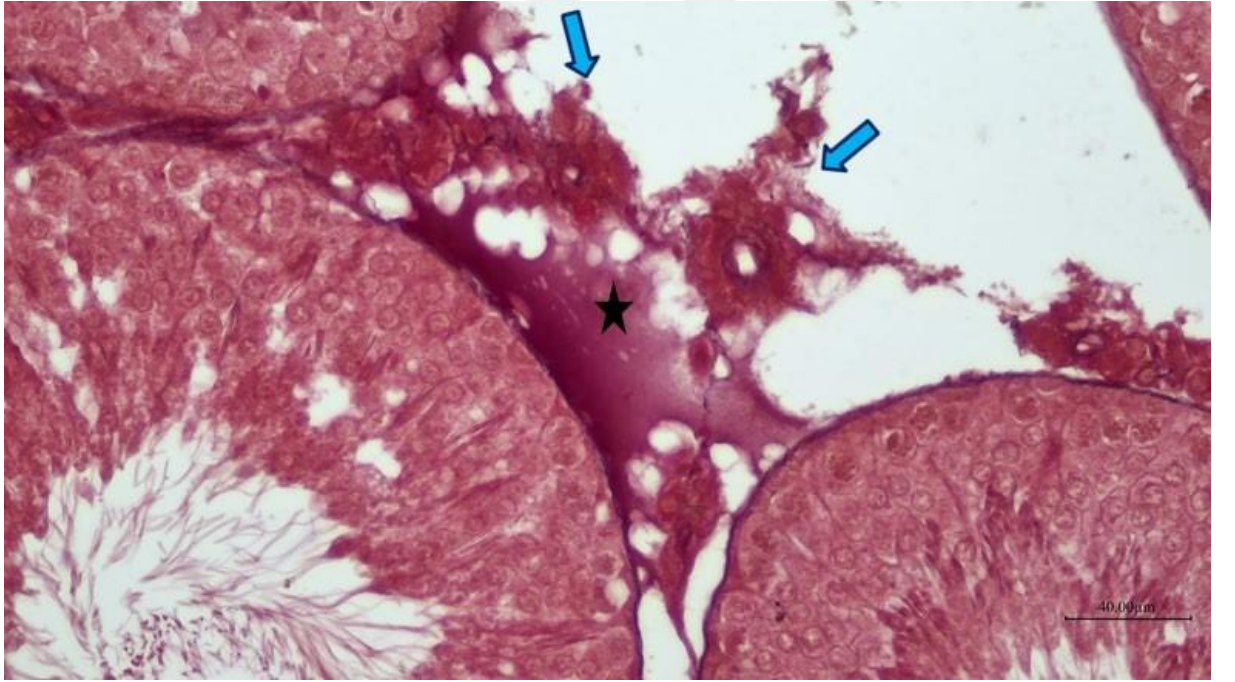
Resim 19: Kurkumin grubu genel görünüm (Masson Trikróm X200)



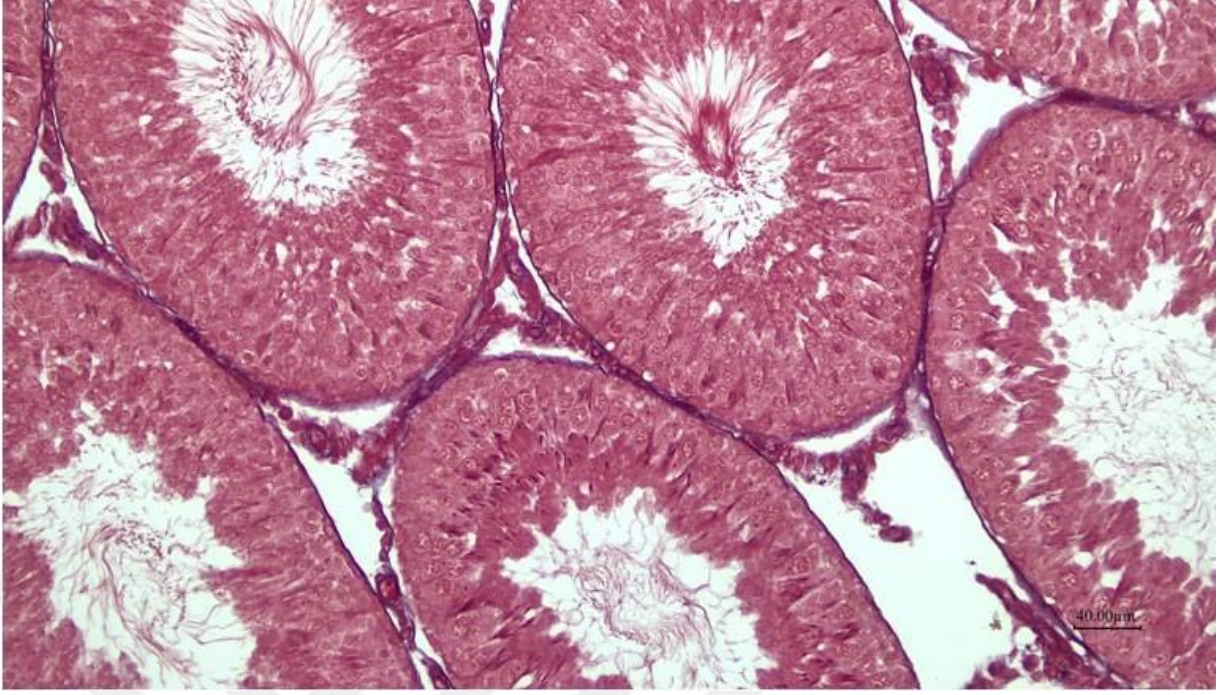
Resim 20: Kurkumin grubu normal görünümde interstisyel alan (mavi ok) (Masson Trikróm X400)



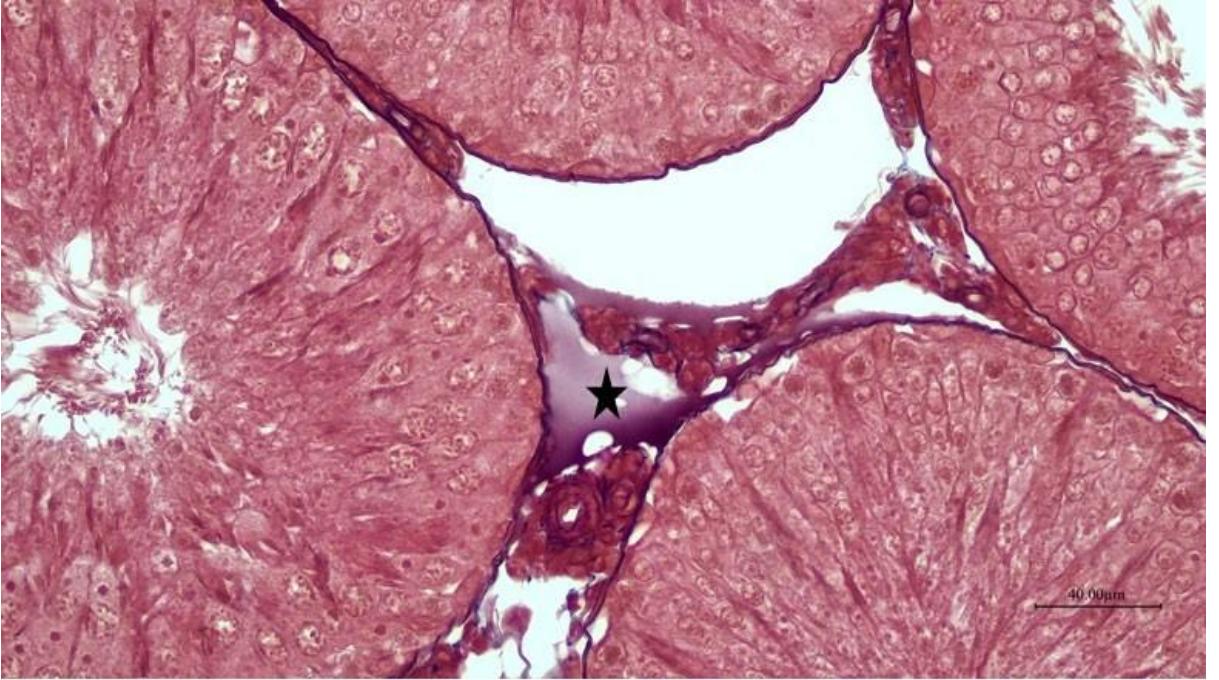
Resim 21: Gentamisin grubu genel görünüm interstisyel alanda ödem (siyah yıldız) (Masson Trikrom X200)



Resim 22: Gentamisin grubu interstisyel alanda ödem (siyah yıldız), interstisyel alanda düzensizlikler (mavi ok) (Masson Trikrom X400)



Resim 23: Gentamisin+Kurkumin grubu genel görünüm (Masson Trikrom X200)



Resim 24: Gentamisin+Kurkumin grubu interstisyel alanda ödem (siyah yıldız) (Masson Trikrom X400)

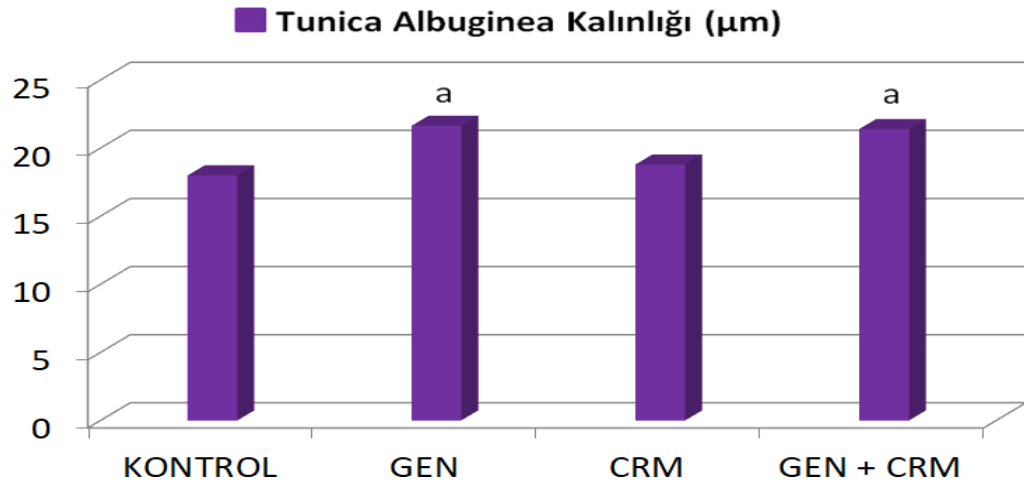
Tunica Albuginea Kalınlığı

Tunica albuginea kalınlığı ölçümlerinde K grubu ile CRM grubunda birbirine yakın değerler bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. GEN ve GEN+CRM grupları K grubuyla karşılaştırıldığında GEN grubunda daha belirgin olmak üzere her iki grupta da K grubuna göre tunica albuginea kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. GEN+CRM grubunda GEN grubuna kıyasla bir azalma olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 21: Deney sonu grupların tunica albuginea kalınlıkları

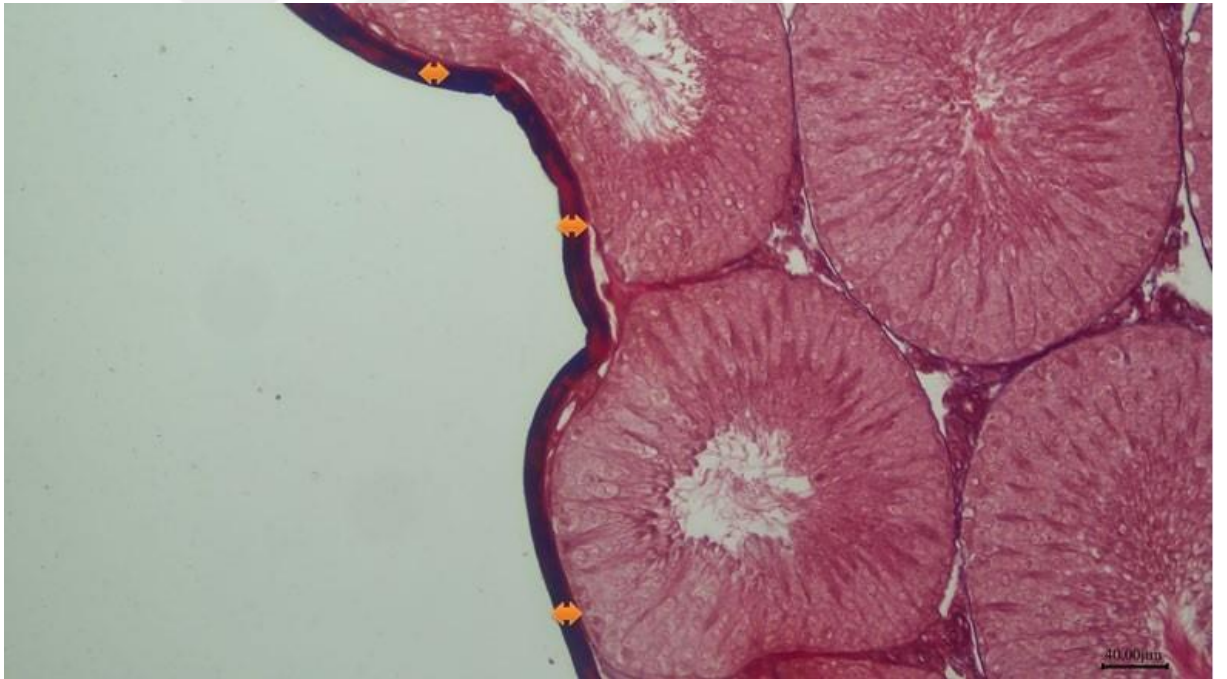
GRUP	Tunica Albuginea Kalınlığı (µm)
KONTROL Ort±SD	17,99 ± 1,64
GEN Ort±SD	21,63 ± 2,95 ^a
CRM Ort±SD	18,79 ± 2,38
GEN+CRM Ort±SD	21,40 ± 1,61 ^a

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

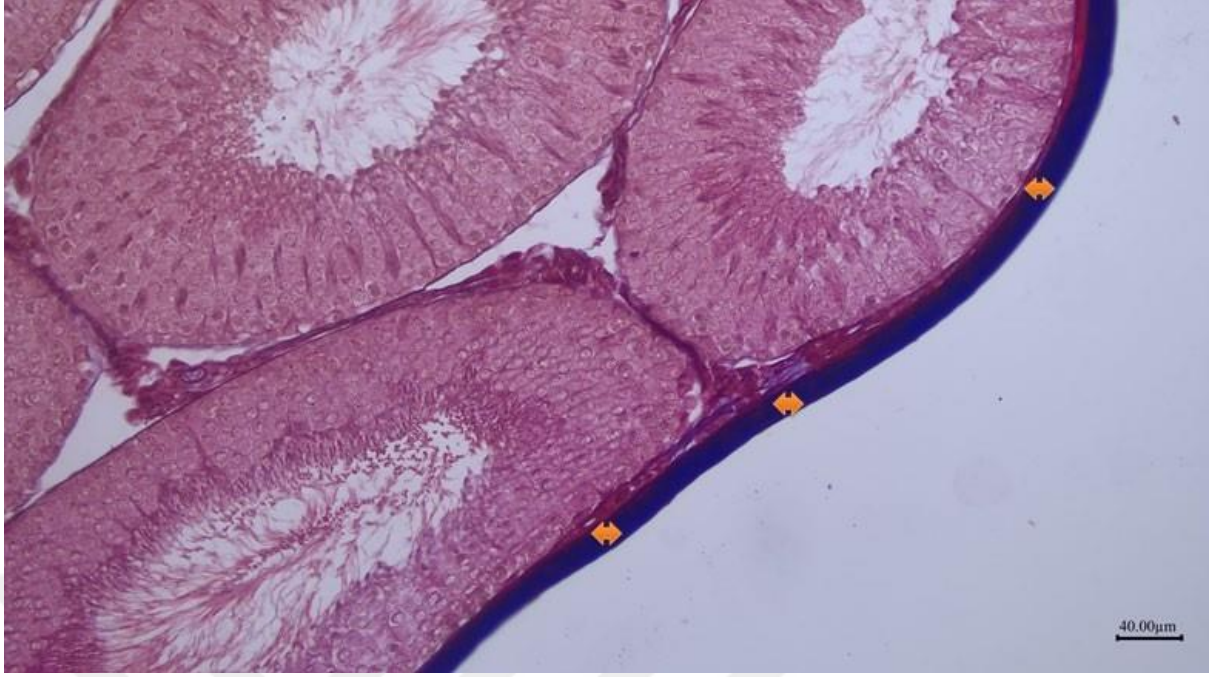


a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

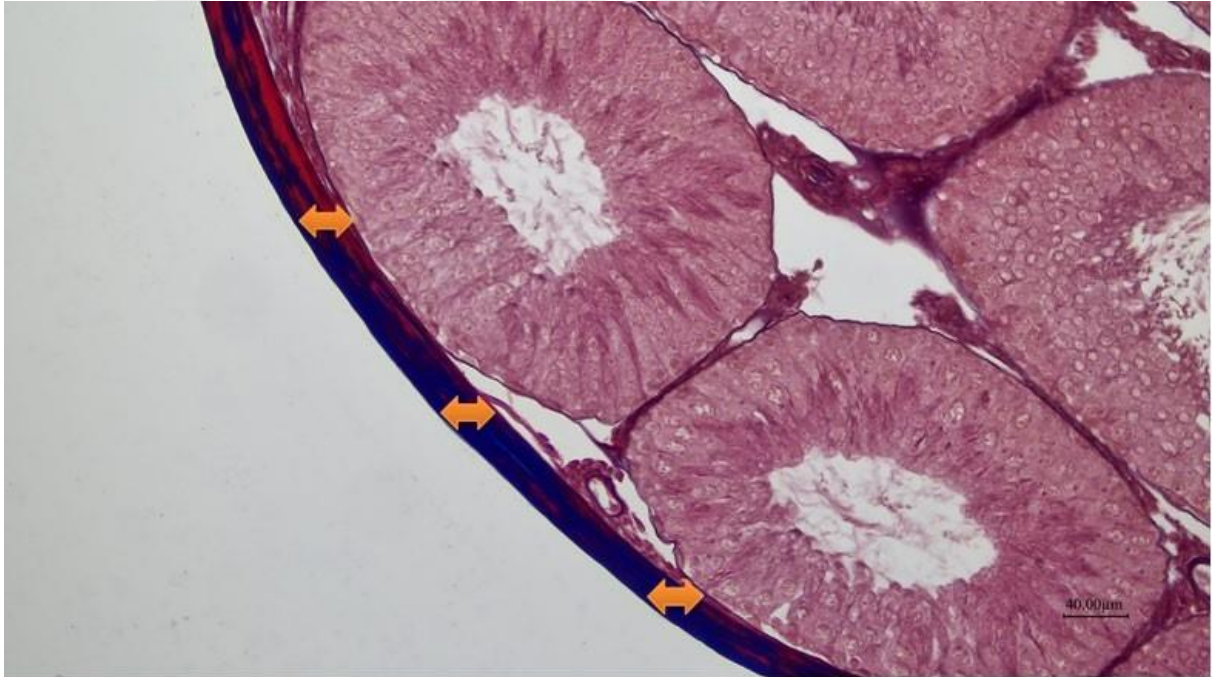
Şekil 29: Deney sonu grupların tunica albuginea kalınlıkları



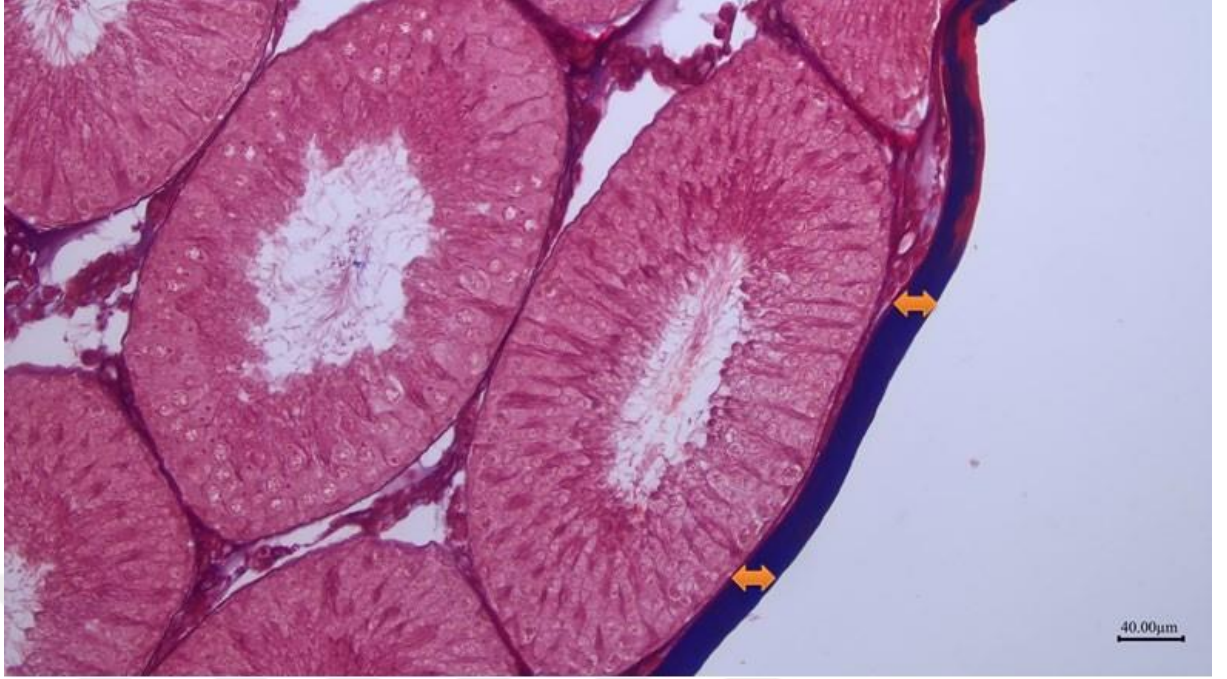
Resim 25: Kontrol grubu normal görünümde tunica albuginea (turuncu çift başlı ok) (Masson Trikrom X200)



Resim 26: Kurkumin normal görünümde tunica albuginea (turuncu çift başlı ok) (Masson Trikrom X200)



Resim 27: Gentamisin grubu nispeten daha kalın gözlenen tunica albuginea yapısı (turuncu çift başlı ok) (Masson Trikrom X200)



Resim 28: Gentamisin+Kurkumin grubu nispeten kalın gözlenen tunica albuginea yapısı (turuncu çift başlı ok) (Masson Trikrom X200)

4.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyama Bulguları

Bazal Membran Hasar Değerlendirmesi

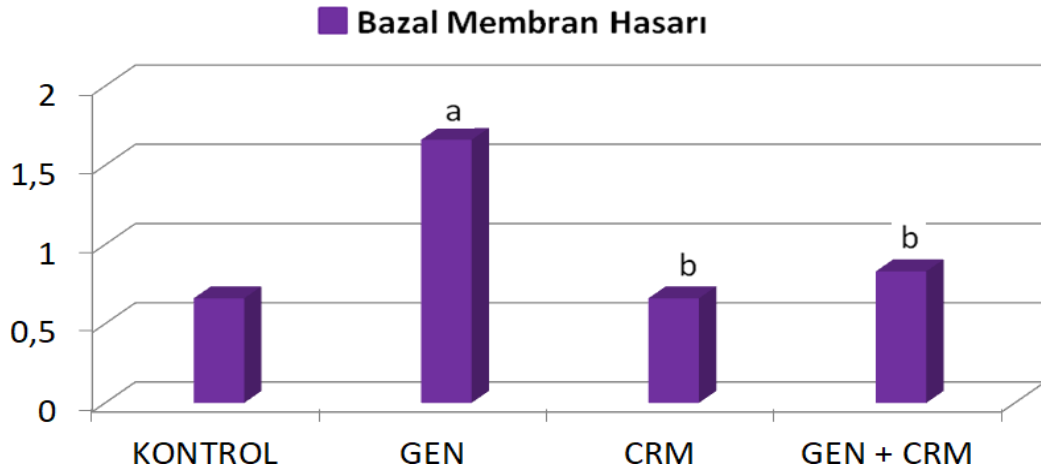
Grupların bazal membran hasar değerlendirmesinde GEN grubunda K ve CRM grubuna kıyasla hasar skoru istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi.

Tablo 22: Deney sonu grupların bazal membran hasar skorları

GRUP	Bazal Membran Hasarı Skoru
KONTROL Ort±SD	0,66 ± 0,51
GEN Ort±SD	1,66 ± 0,51 ^a
CRM Ort±SD	0,66 ± 0,51 ^b
GEN+CRM Ort±SD	0,83 ± 0,40 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

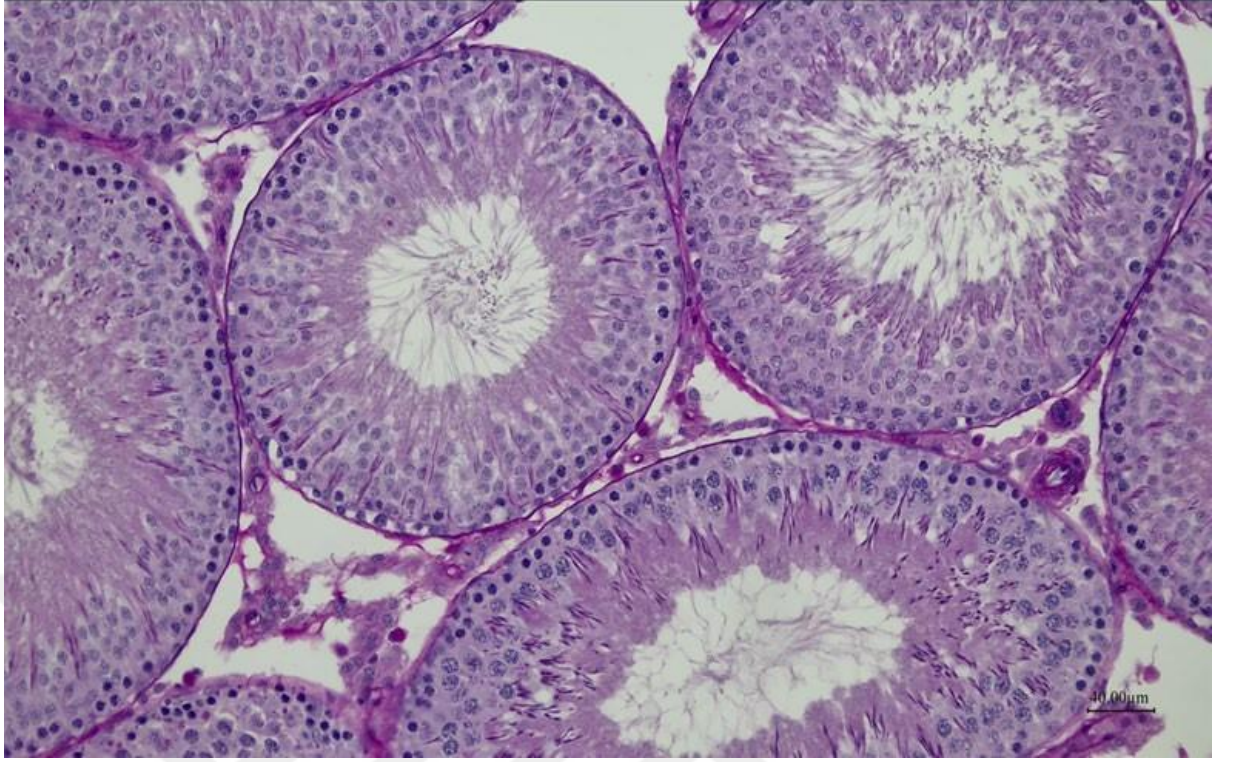
b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

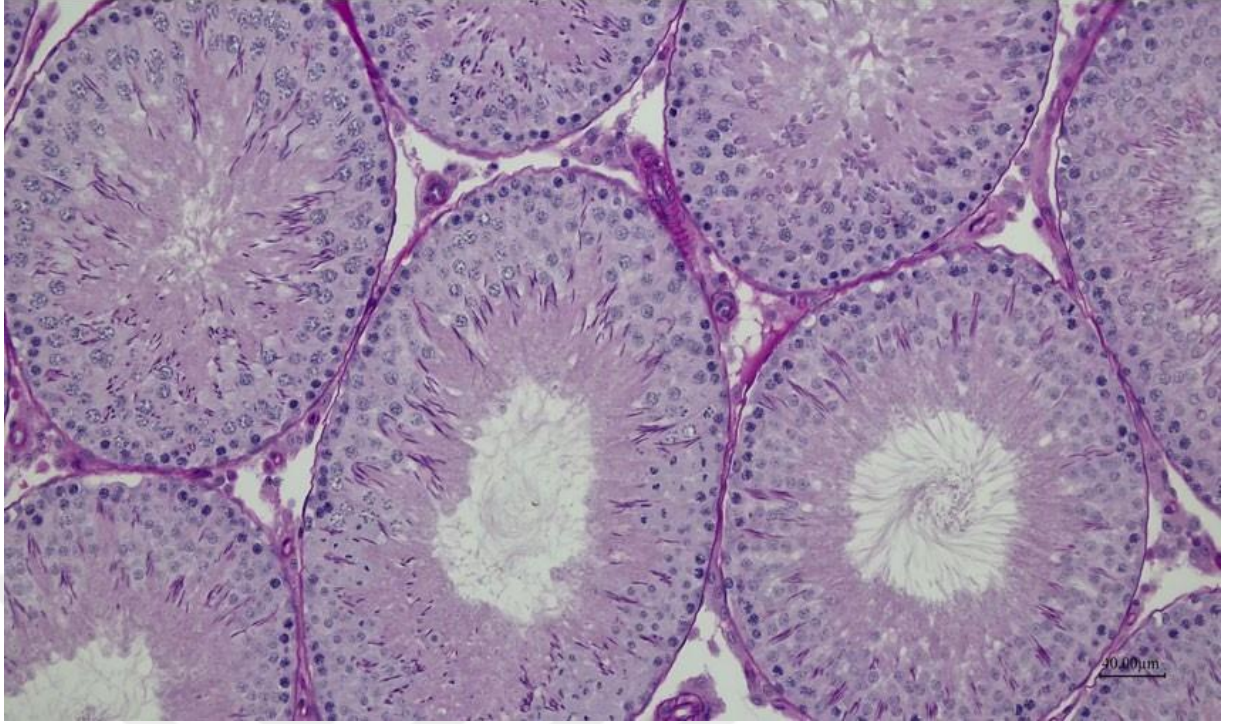
Şekil 30: Deney sonu grupların bazal membran hasar skorları



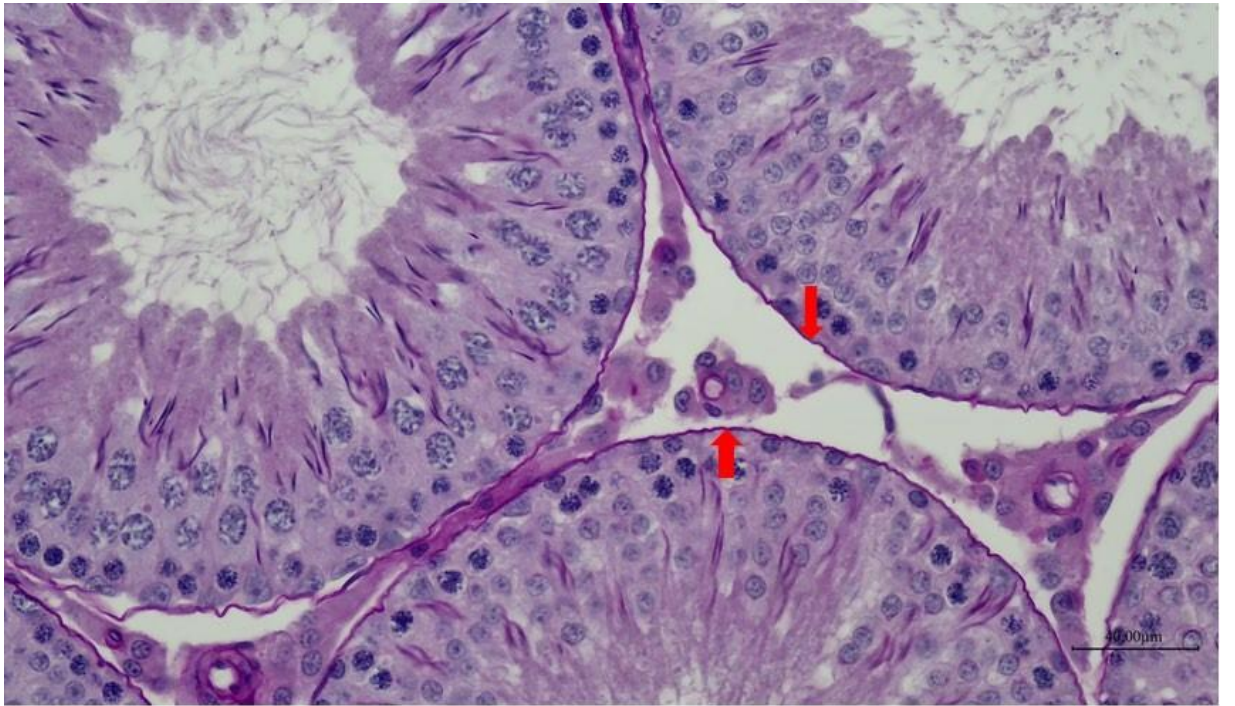
Resim 29: Kontrol grubu genel görünüm (Peryodik Asit-Schiff X200)



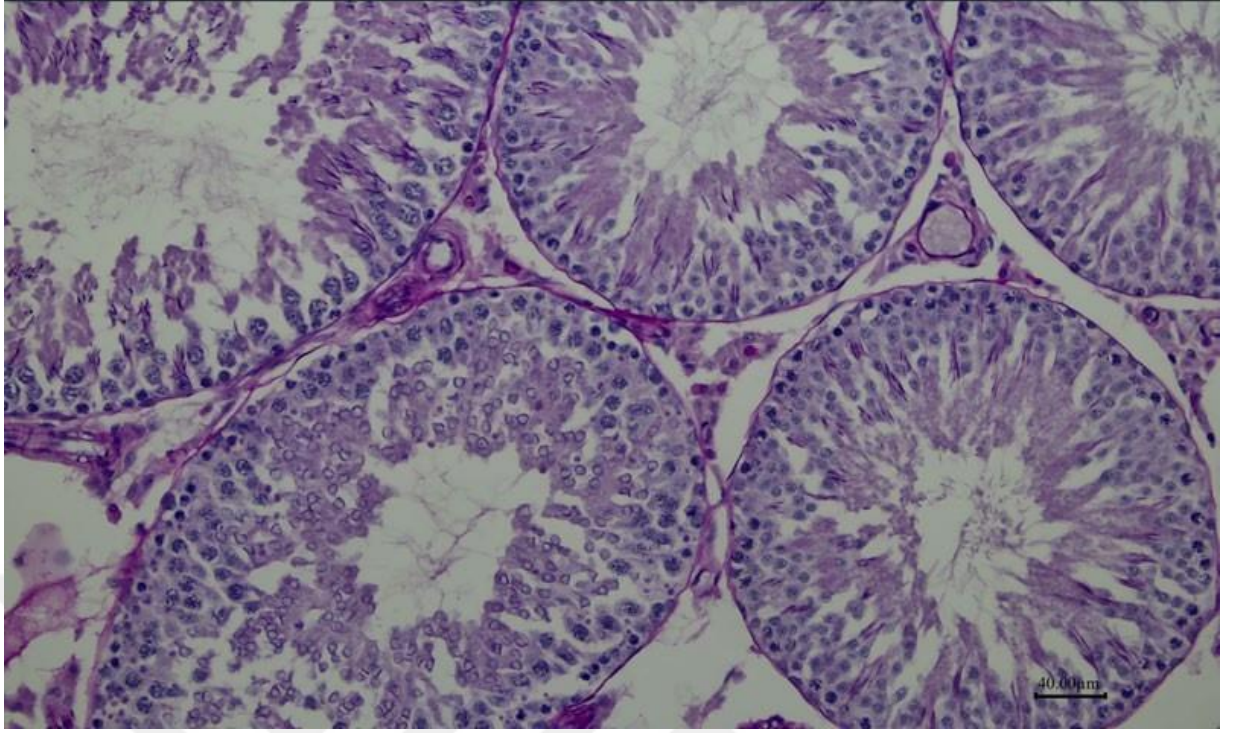
Resim 30: Kontrol grubu normal görünümde bazal membran yapısı (kırmızı ok) (Peryodik Asit-Schiff X400)



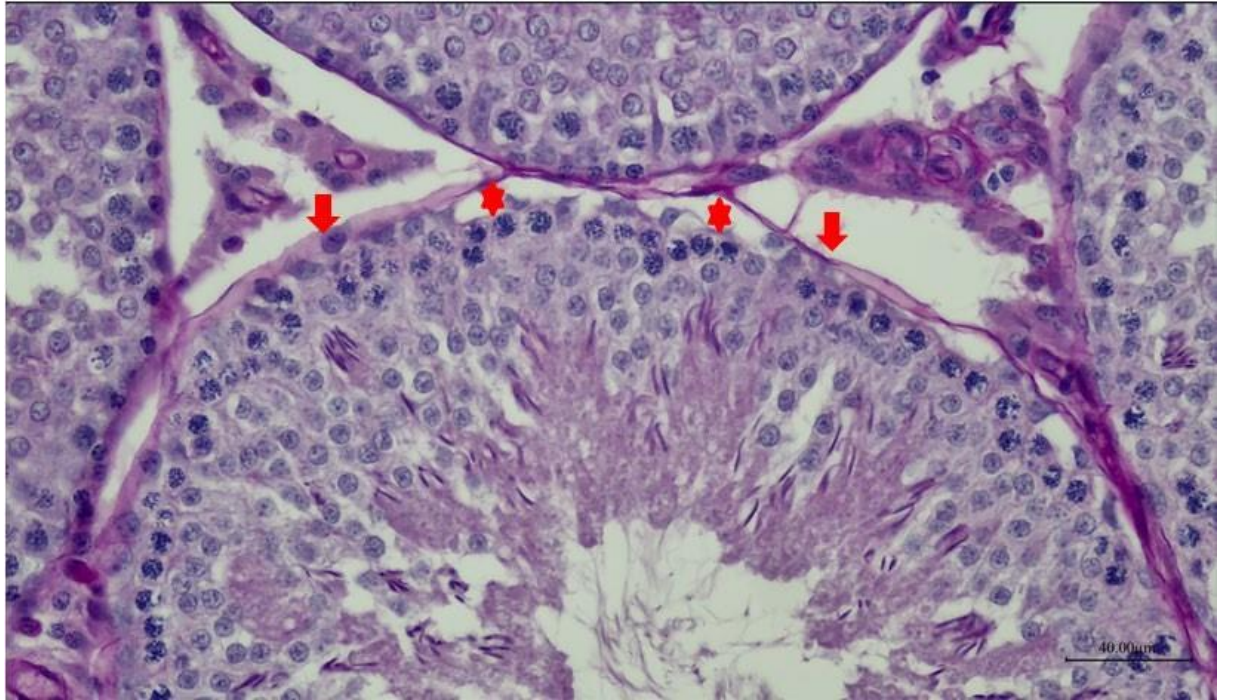
Resim 31: Kurkumin grubu genel görünüm (Periyodik Asit-Schiff X200)



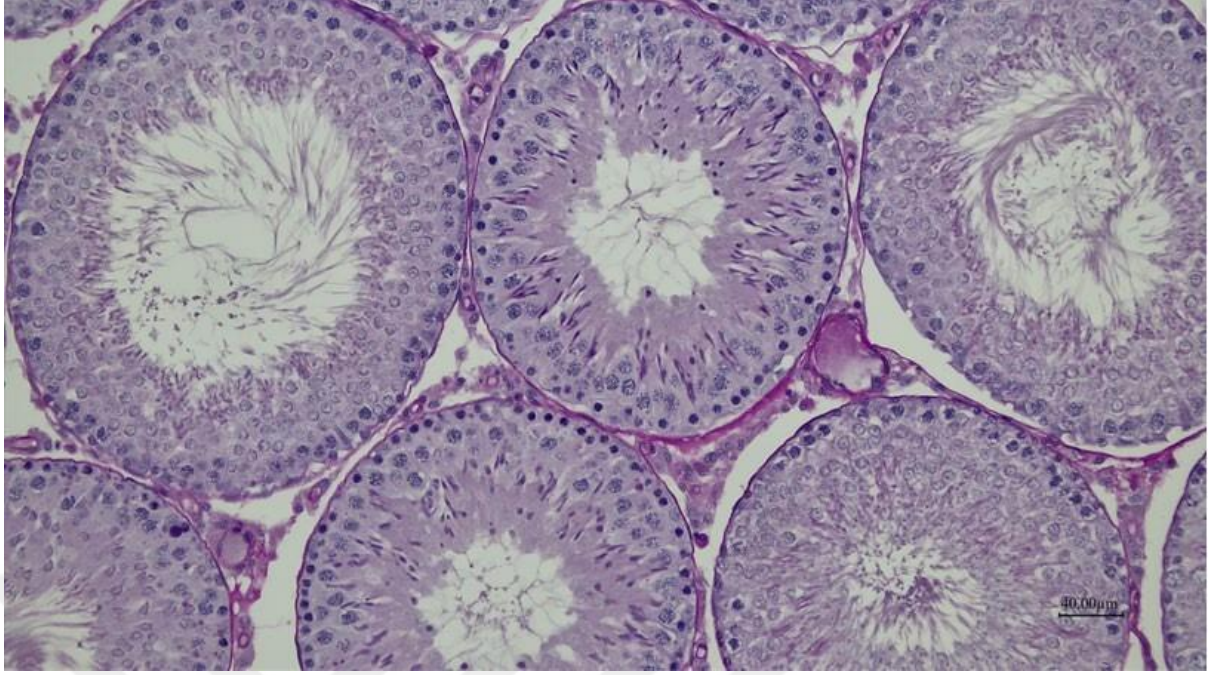
Resim 32: Kurkumin grubu normal görünümde bazal membran yapısı (kırmızı ok) (Periyodik Asit-Schiff X400)



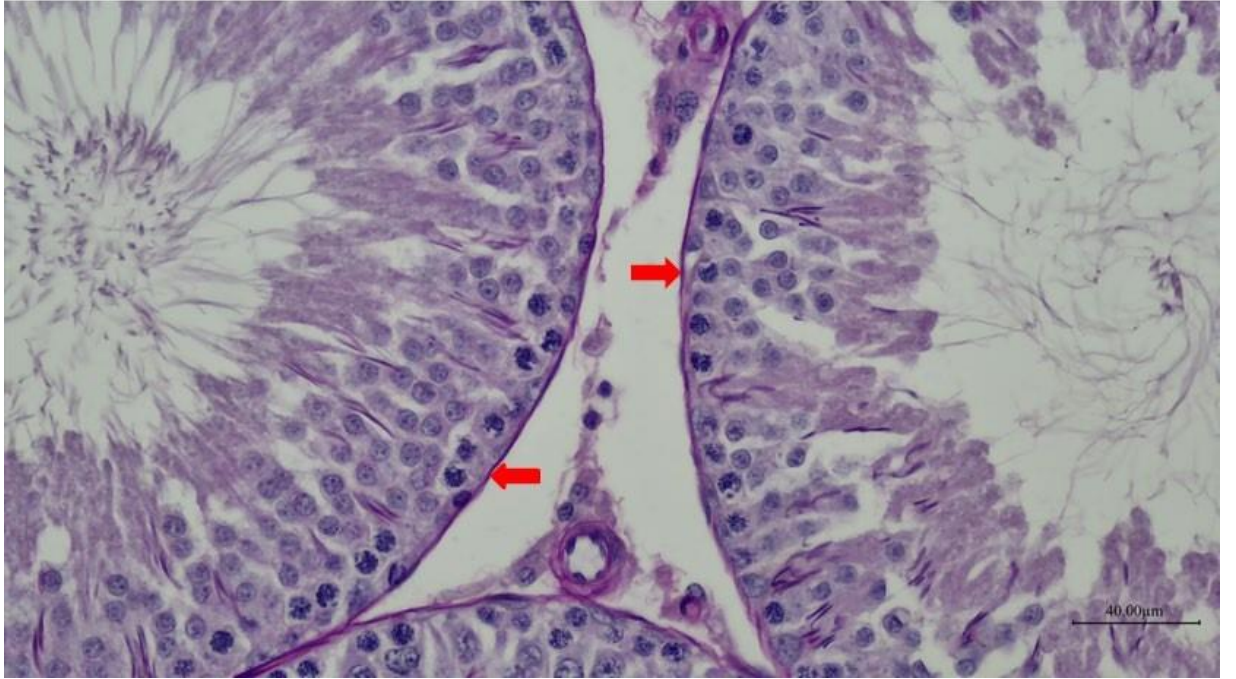
Resim 33: Gentamisin grubu genel görünüm (Periyodik Asit-Schiff X200)



Resim 34: Gentamisin grubu bazal membranda ayrılmalar (kırmızı altıgen), hasarlı bazal membran yapısı (kırmızı ok) (Periyodik Asit-Schiff X400)



Resim 35: Gentamisin+Kurkumin grubu genel görünüm (Periyodik Asit-Schiff X200)



Resim 36: Gentamisin + Kurkumin grubu normal görünümde bazal membran yapısı (kırmızı ok)
(Periyodik Asit-Schiff X400)

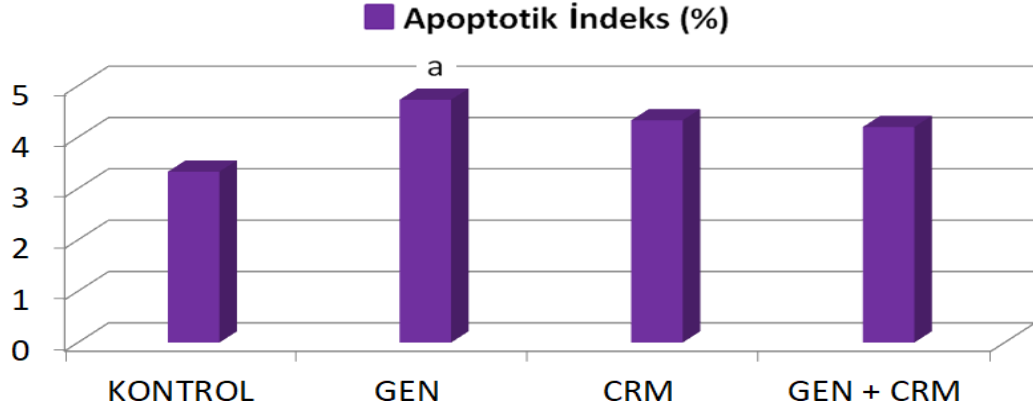
4.2.4. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

TUNEL boyalı preparatlarda yapılan apoptoz değerlendirme sonuçlarında; GEN grubunda K grubuna kıyasla apoptotik indeks istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı. CRM ve GEN+CRM gruplarında GEN grubuna kıyasla azalma olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 23: Deney sonu grupların apoptotik indeksleri

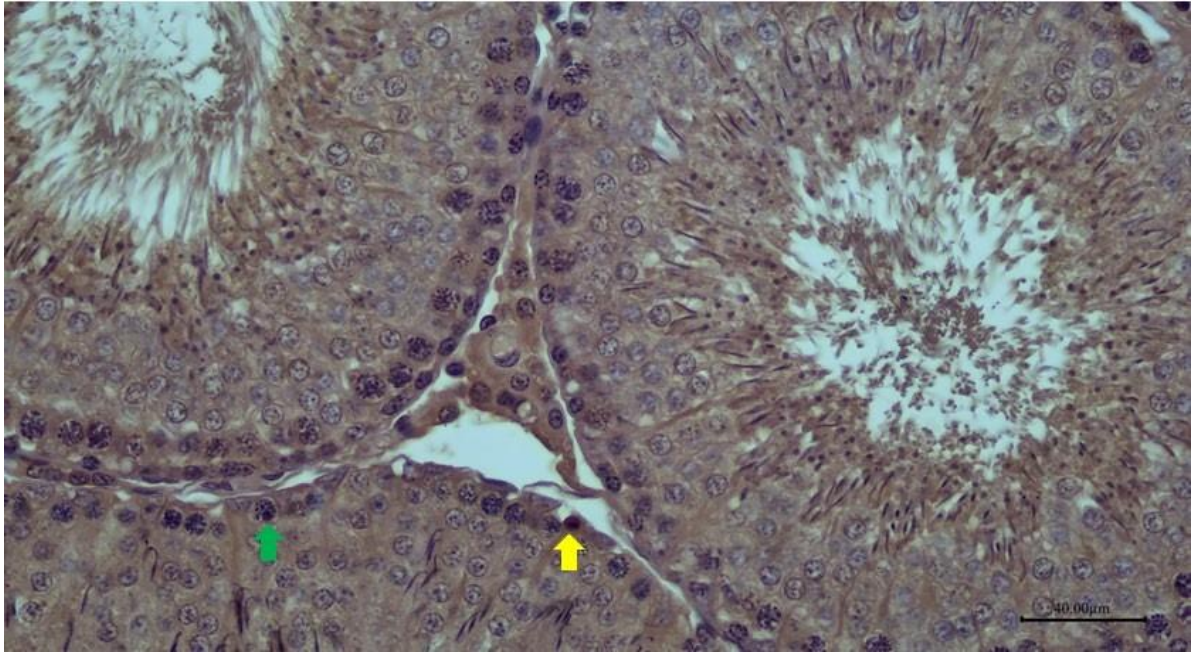
GRUP	Apoptotik İndeks (%)
KONTROL Ort±SD	3,33 ± 0,69
GEN Ort±SD	4,73 ± 1,04 ^a
CRM Ort±SD	4,33 ± 1,33
GEN+CRM Ort±SD	4,20 ± 0,43

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

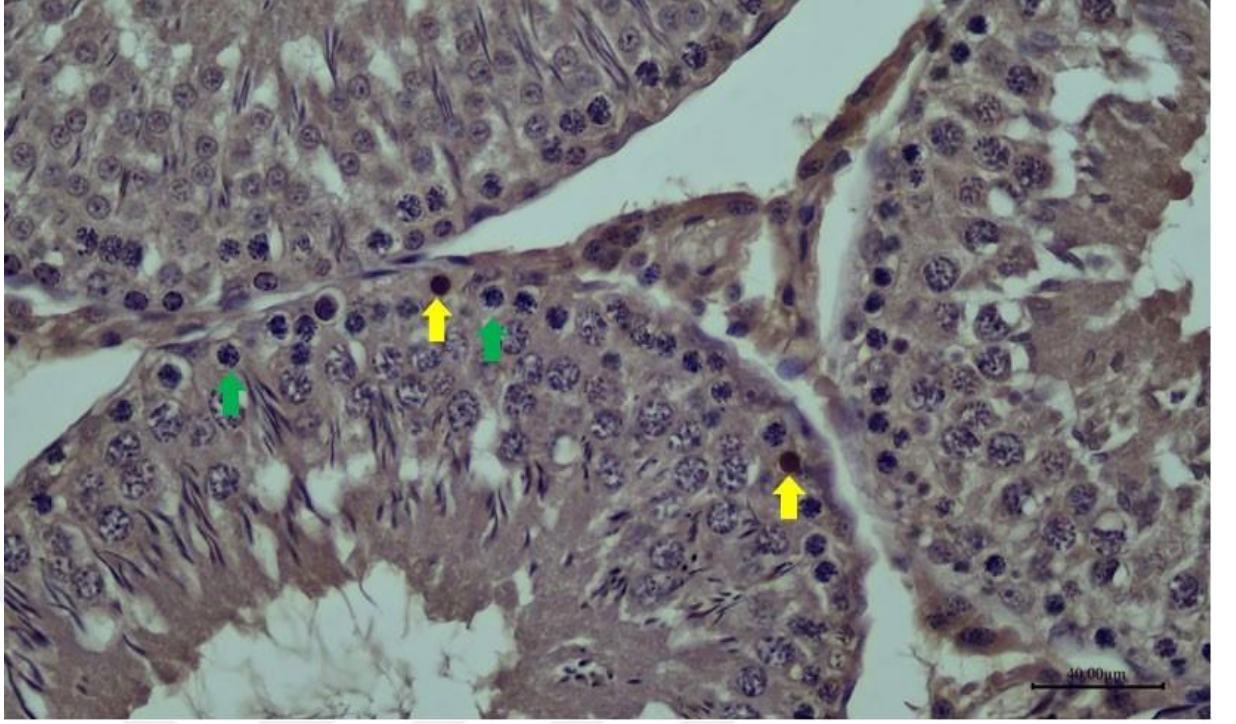


a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

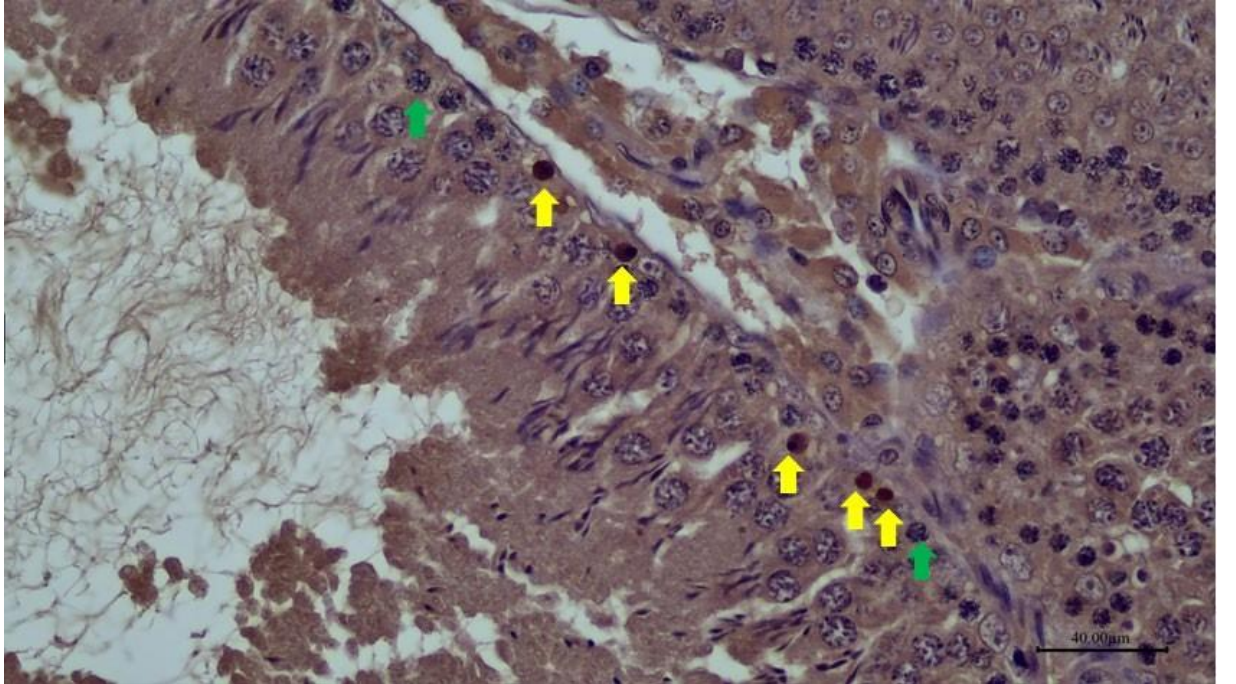
Şekil 31: Deney sonu grupların apoptotik indeksleri



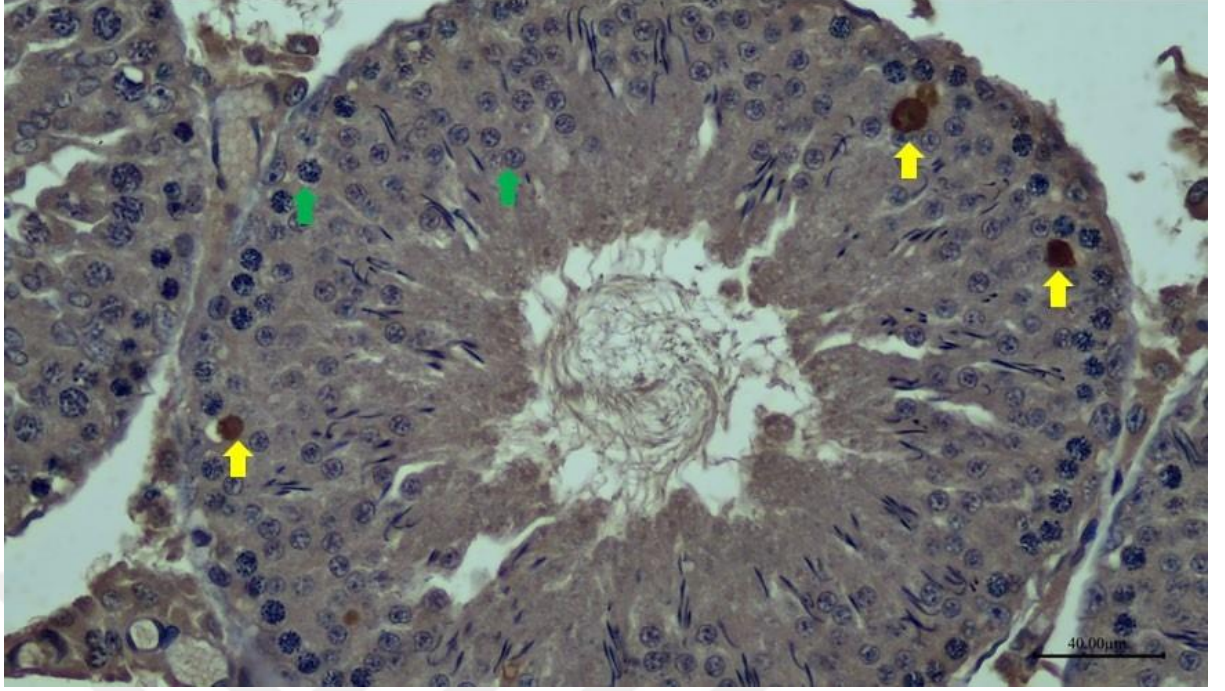
Resim 37: Kontrol grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler (yeşil ok) ve TUNEL (+) hücreler (sarı ok) (TUNEL X400)



Resim 38: Kurkumin grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler (yeşil ok) ve TUNEL (+) hücreler (sarı ok) (TUNEL X400)



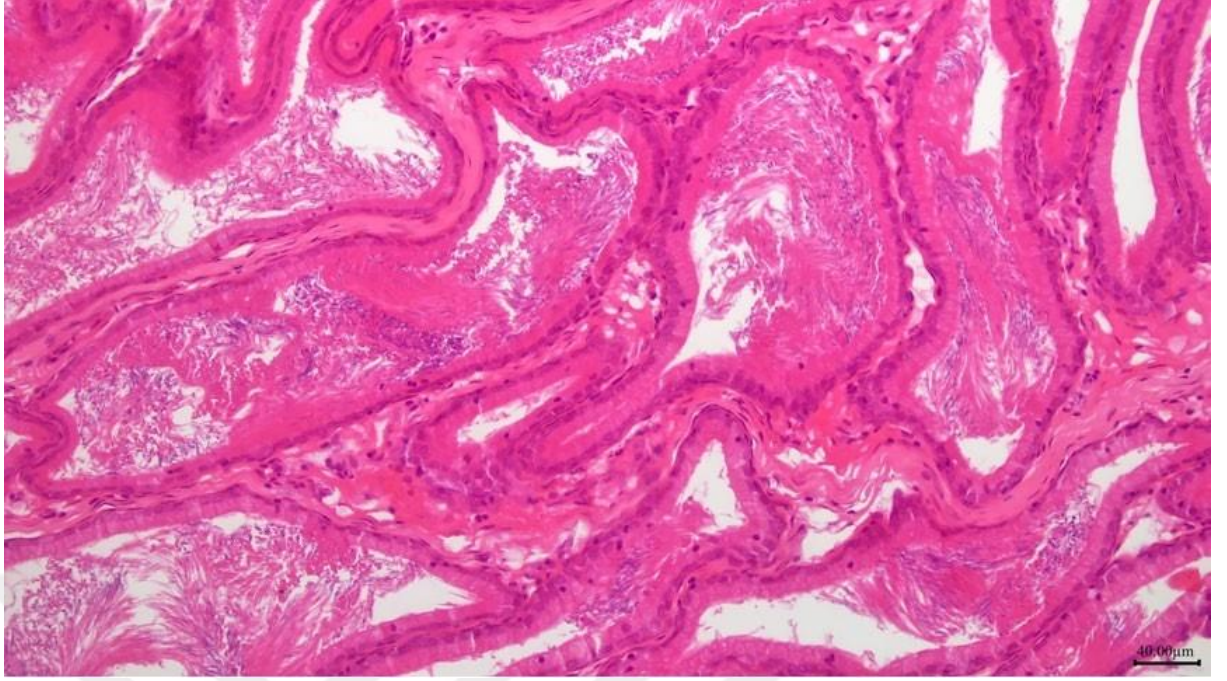
Resim 39: Gentamisin grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler (yeşil ok) ve TUNEL (+) hücreler (sarı ok) (TUNEL X400)



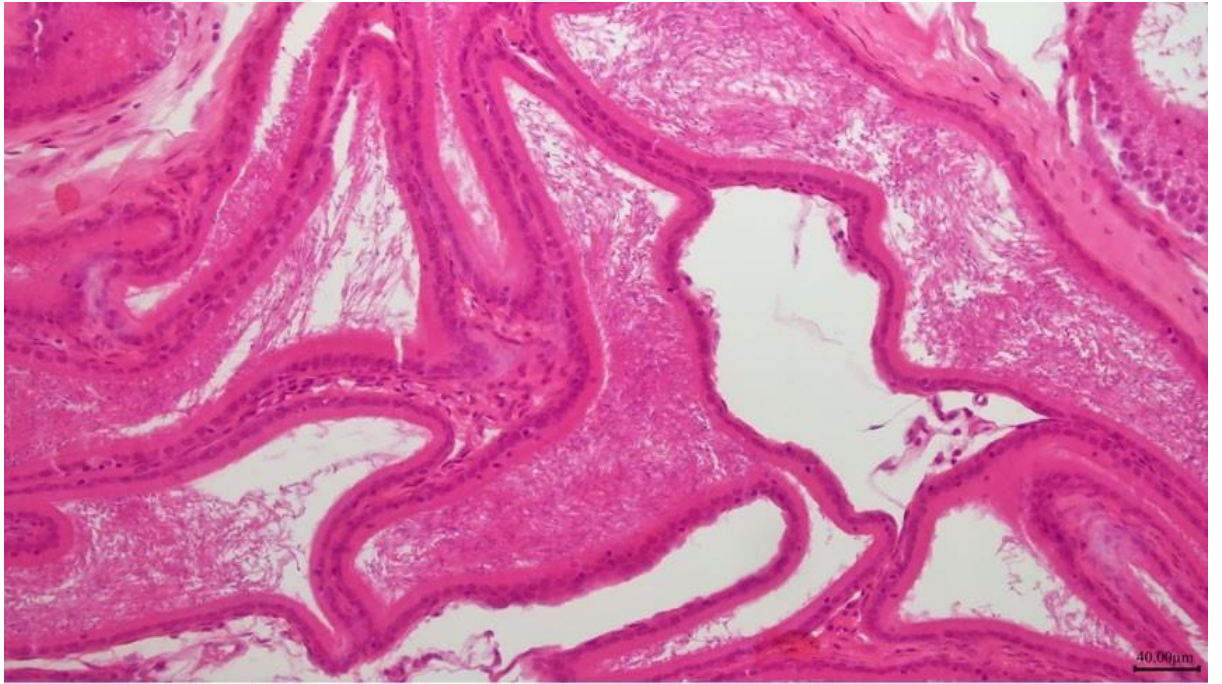
Resim 40: Gentamisin + Kurkumin grubu genel görünüm TUNEL (-) hücreler (yeşil ok) ve TUNEL (+) hücreler (sarı ok) (TUNEL X400)

4.2.5. Epididimis Dokusuna ait Hematoksilen & Eozin Boyama Bulguları

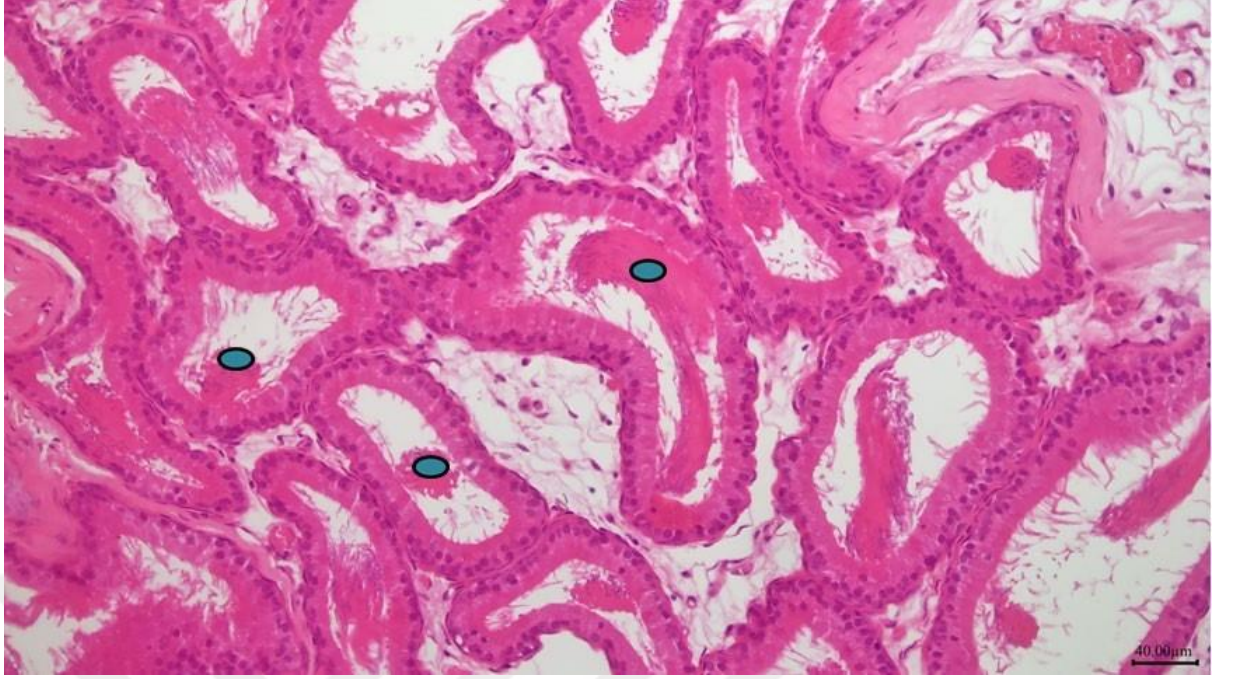
Gruplara ait epididimis doku kesitlerine bakıldığında K grubu ile CRM grubunda normal tübül yapısı izlendi. GEN grubunda kısmi olarak yer yer tübüllerdeki spermatozoa miktarında azalma izlendi.



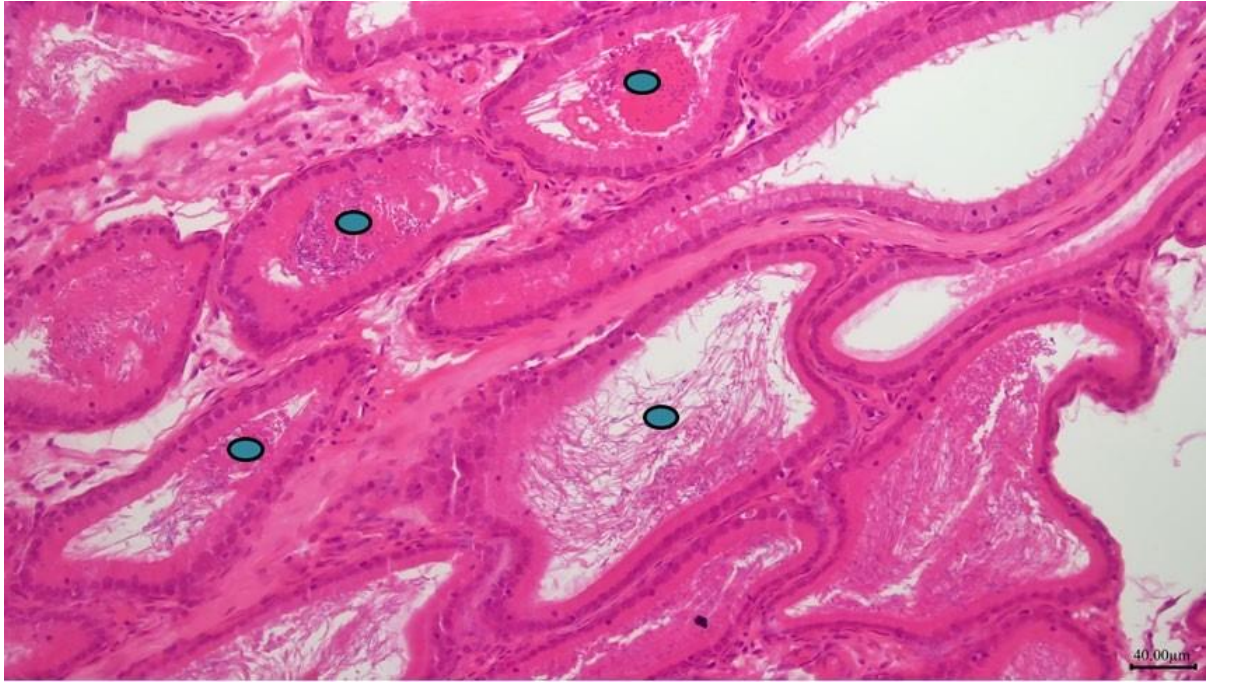
Resim 41: Kontrol grubuna ait epididimis dokusunda normal tübül yapısı (Hematoksilen&Eozin X200).



Resim 42: Kurkumin grubuna ait epididimis dokusunda normal tübül yapısı (Hematoksilen&Eozin X200).



Resim 43: Gentamisin grubuna ait epididimis dokusunda tübüllerde azalmış spermatozoa görüntüsü (mavi daire) (Hematoksilen&Eozin X200).



Resim 44: Gentamisin + Kurkumin grubuna ait epididimis dokusunda tübüllerde artmış spermatozoa görüntüsü (mavi daire) (Hematoksilen&Eozin X200).

4.3. Sperm Analiz Bulguları

4.3.1. Toplam Sperm Sayısı, Motilite ve Vitalite Bulguları

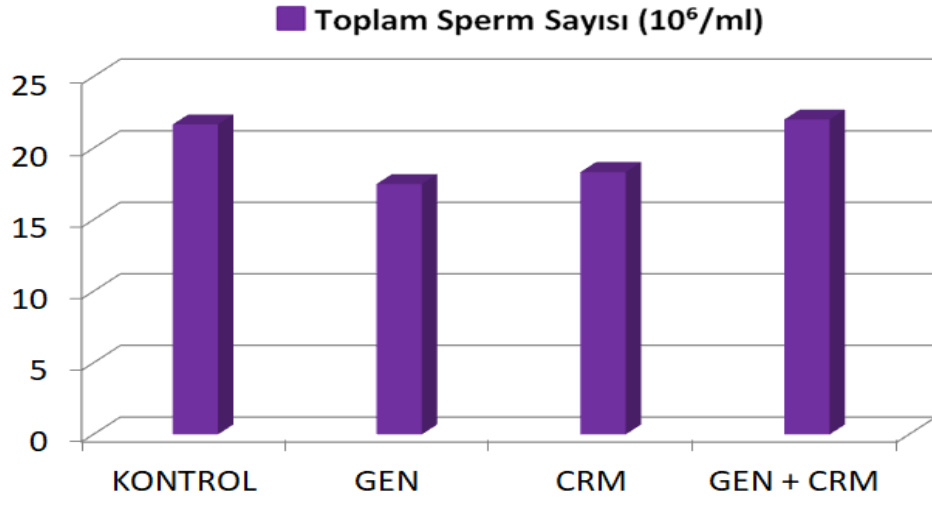
Sperm analiz bulgularında toplam sperm sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Sperm motilite sonuçlarında K grubuna kıyasla GEN grubunda azalma olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi. CRM ve GEN+CRM gruplarında GEN grubuna göre artış görüldü ve bu artış her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sperm canlılık analizinde GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi.

Tablo 24: Deney sonu grupların toplam sperm sayısı, motilite ve vitalite bulguları

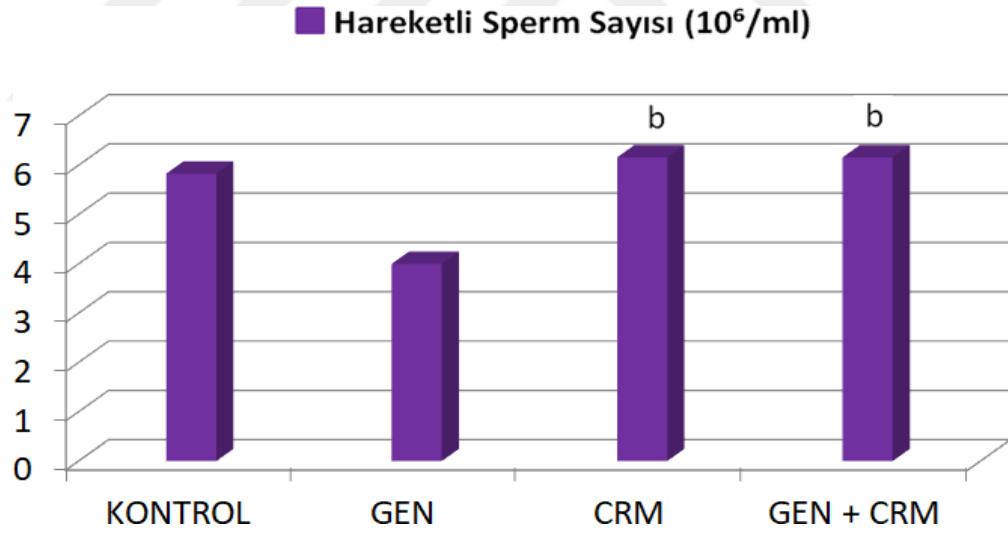
GRUP	Toplam Sperm Sayısı (10 ⁶ /ml)	Hareketli Sperm Sayısı (10 ⁶ /ml)	Canlı Sperm Yüzdesi (%)
KONTROL Ort±SD	21,66 ± 6,62	5,83 ± 2,92	58,66 ± 10,93
GEN Ort±SD	17,50 ± 5,16	4,00 ± 0,63	30,33 ± 8,23 ^a
CRM Ort±SD	18,33 ± 4,63	6,16 ± 2,13 ^b	66,50 ± 8,43 ^b
GEN+CRM Ort±SD	22,00 ± 2,60	6,16 ± 1,16 ^b	54,33 ± 10,30 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



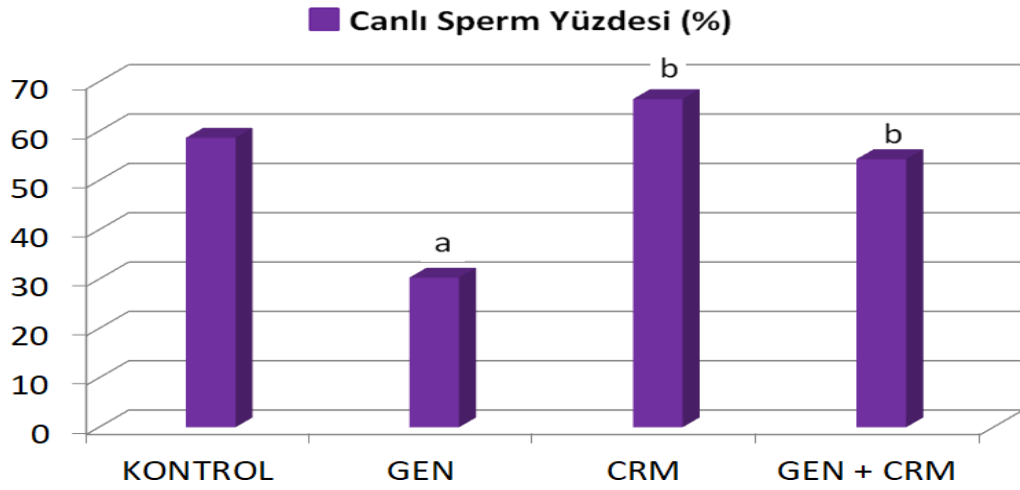
Şekil 32: Deney sonu grupların toplam sperm sayısı değerleri



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 33: Deney sonu grupların hareketli sperm sayısı değerleri



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 34: Deney sonu grupların canlı sperm yüzdeleri

4.3.2. Teratozoospermik İndeks

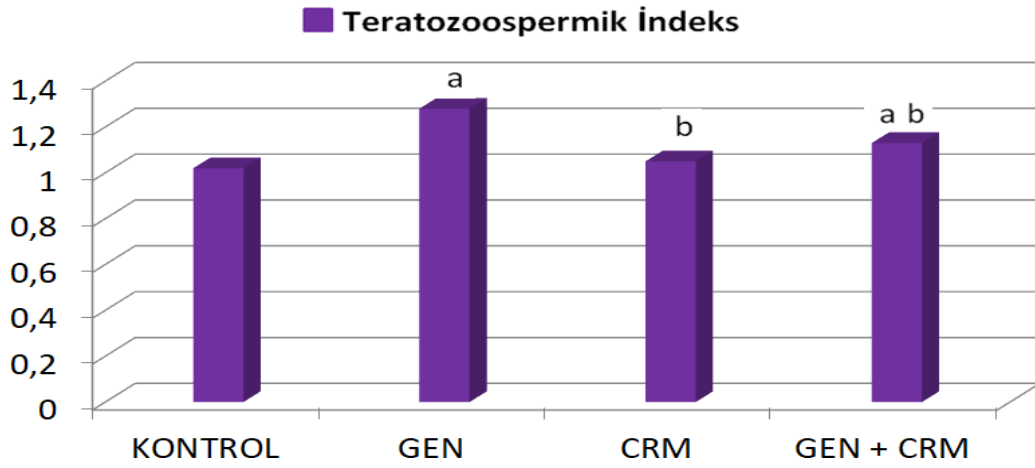
K grubu ile CRM grubuna ait teratozoospermik indekslerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. K grubuna kıyasla GEN grubunda daha belirgin olmak üzere GEN ve GEN+CRM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda GEN grubuna göre teratozoospermik indekste istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlendi.

Tablo 25: Deney sonu grupların teratozoospermik indeksleri

GRUP	Teratozoospermik İndeks
KONTROL Ort±SD	1,02 ± 0,01
GEN Ort±SD	1,28 ± 0,05 ^a
CRM Ort±SD	1,05 ± 0,03 ^b
GEN+CRM Ort±SD	1,13 ± 0,01 ^{ab}

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

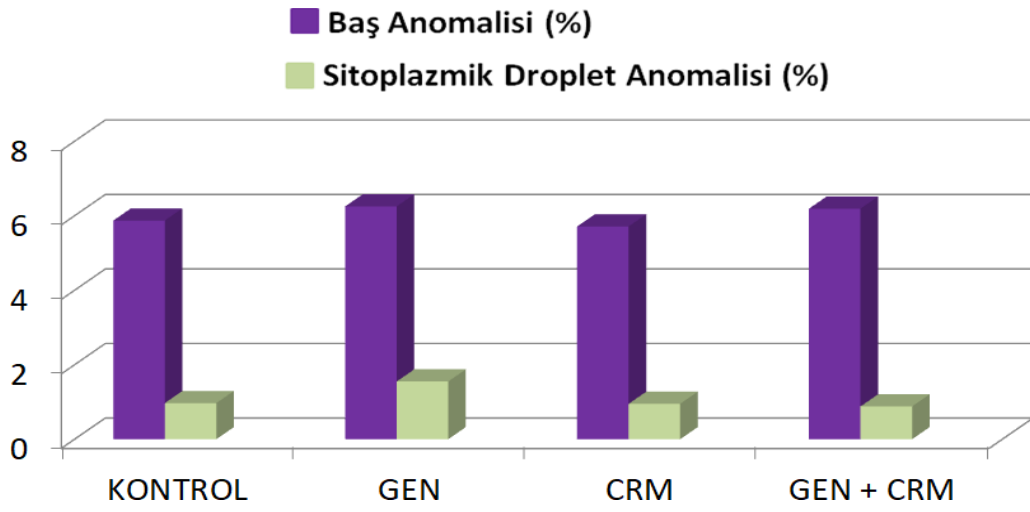
Şekil 35: Deney sonu grupların teratozoospermik indeksleri

4.3.3. Baş, Boyun, Sitoplazmik Droplet ve Kuyruk Değerlendirmeleri

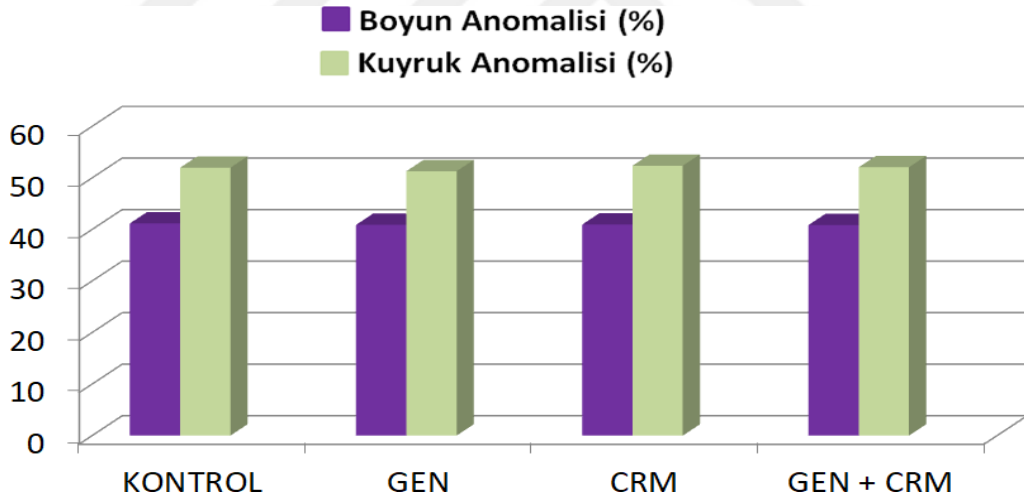
Gruplar baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk açısından tek tek değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 26: Deney sonu grupların baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk anomali yüzdeleri

GRUP	Baş Anomalisi (%)	Boyun Anomalisi (%)	Sitoplazmik Droplet Anomalisi (%)	Kuyruk Anomalisi (%)
KONTROL Ort±SD	5,87 ± 0,84	41,17 ± 1,01	0,97 ± 0,60	51,97 ± 1,60
GEN Ort±SD	6,25± 1,06	40,89 ± 1,60	1,55 ± 1,21	51,29 ± 0,86
CRM Ort±SD	5,71 ±0,84	40,96 ±0,89	0,95 ± 0,02	52,36 ± 1,33
GEN+CRM Ort±SD	6,19 ± 0,76	40,86 ± 0,68	0,88 ± 0,01	52,06 ± 0,94



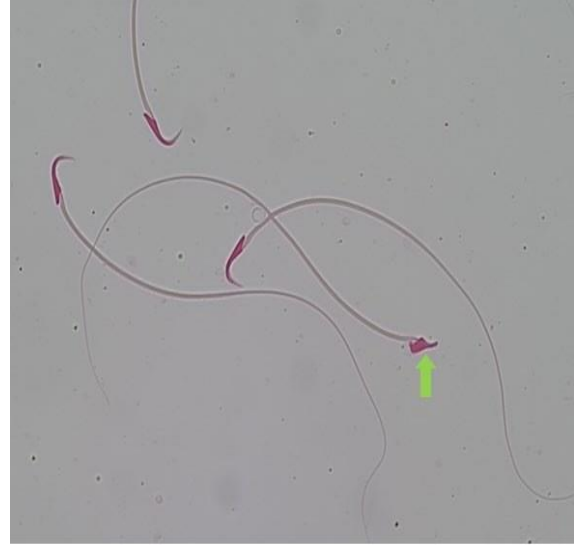
Şekil 36: Deney sonu grupların baş ve sitoplazmik droplet anomali yüzdeleri



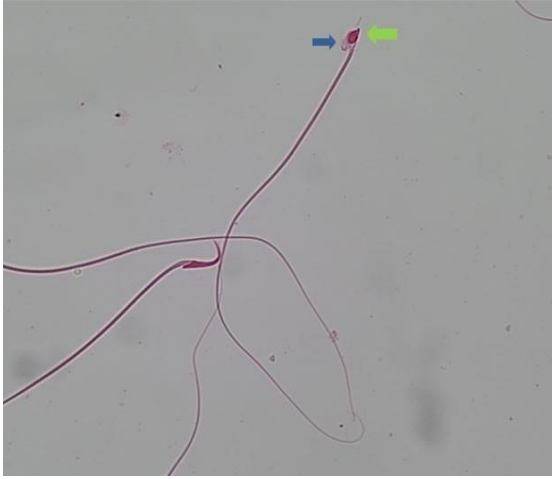
Şekil 37: Deney sonu grupların boyun ve kuyruk anomali yüzdeleri



Resim 45: Boyun anomalisi (mor ok)



Resim 46: Baş anomalisi (yeşil ok)



Resim 47: Baş anomalisi (yeşil ok)
sitoplazmik droplet (mavi ok)



Resim 48: Kuyruk anomalileri (sarı ok)

4.4. Biyokimyasal Bulgular

4.4.1. Doku MDA Seviyeleri

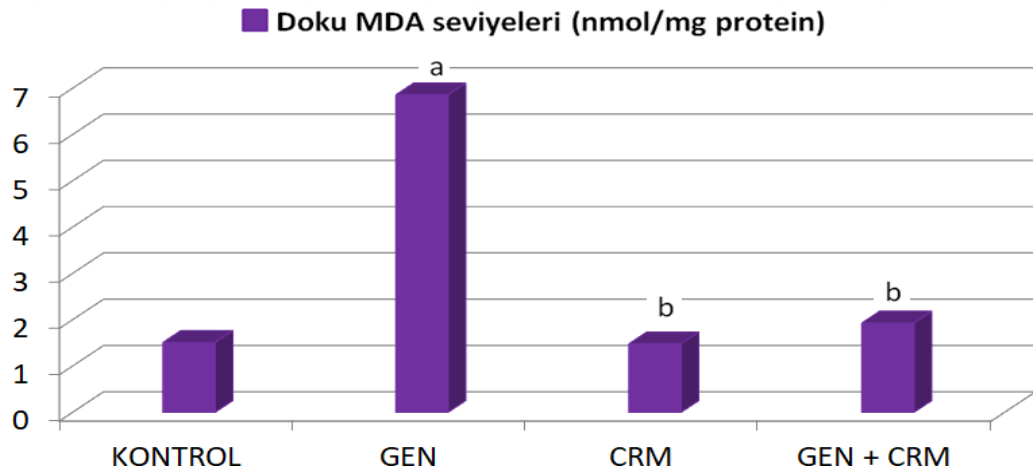
Doku MDA seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi.

Tablo 27: Deney sonu grupların doku MDA seviyeleri

GRUP	Doku MDA seviyeleri (nmol/mg protein)
KONTROL Ort±SD	1,51 ± 0,10
GEN Ort±SD	6,86 ± 1,29 ^a
CRM Ort±SD	1,48 ± 0,24 ^b
GEN+CRM Ort±SD	1,93 ± 0,62 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

Şekil 38: Deney sonu grupların doku MDA seviyeleri

4.4.2. Doku SOD Seviyeleri

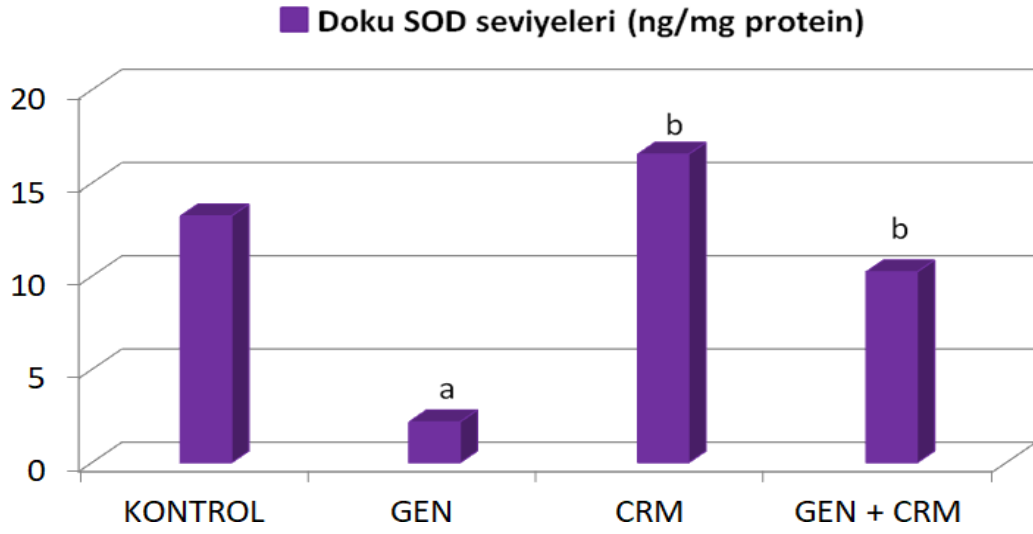
Doku SOD seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi.

Tablo 28: Deney sonu grupların doku SOD seviyeleri

GRUP	Doku SOD seviyeleri (ng/mg protein)
KONTROL Ort±SD	13,24 ± 5,60
GEN Ort±SD	2,19 ± 2,05 ^a
CRM Ort±SD	16,55 ± 6,26 ^b
GEN+CRM Ort±SD	10,24 ± 4,11 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 39: Deney sonu grupların doku SOD seviyeleri

4.4.3. Doku GPX Seviyeleri

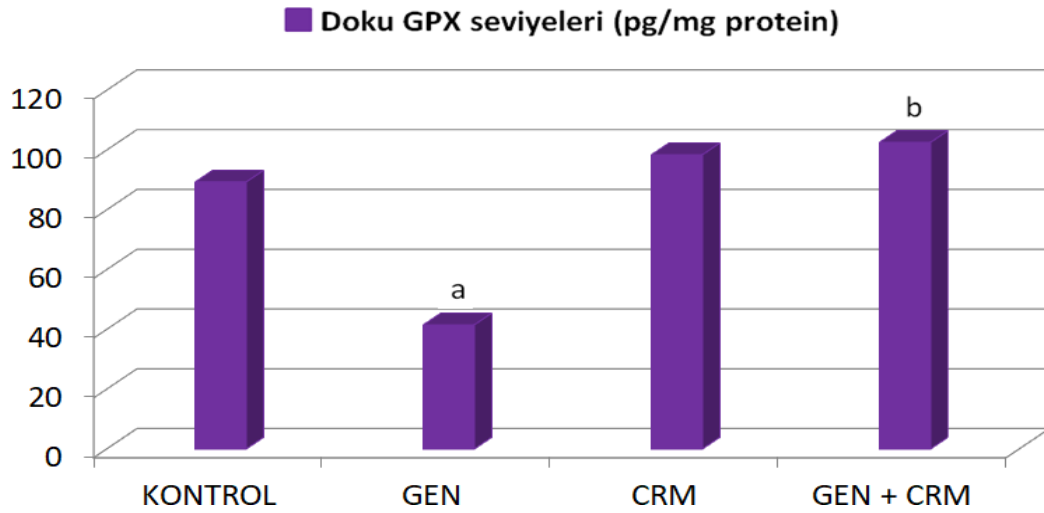
Doku GPX seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi.

Tablo 29: Deney sonu grupların doku GPX seviyeleri

GRUP	Doku GPX seviyeleri (pg/mg protein)
KONTROL Ort±SD	89,30 ± 31,71
GEN Ort±SD	41,49 ± 7,48 ^a
CRM Ort±SD	98,40 ± 45,02
GEN+CRM Ort±SD	102,54 ± 24,30 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

Şekil 40: Deney sonu grupların doku GPX seviyeleri

4.4.4. Doku GSH Seviyeleri

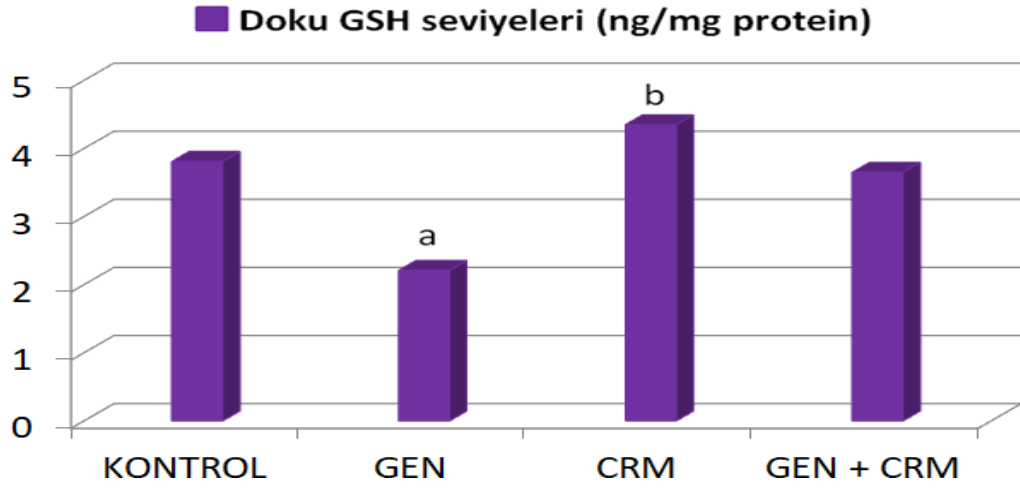
Doku GSH seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre GSH seviyelerinde artış olmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 30: Deney sonu grupların doku GSH seviyeleri

GRUP	Doku GSH seviyeleri (ng/mg protein)
KONTROL Ort±SD	3,81 ± 1,00
GEN Ort±SD	2,21 ± 1,16 ^a
CRM Ort±SD	4,35 ± 1,48 ^b
GEN+CRM Ort±SD	3,65 ± 1,12

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 41: Deney sonu grupların doku GSH seviyeleri

4.4.5. Doku 8-OHdG seviyeleri

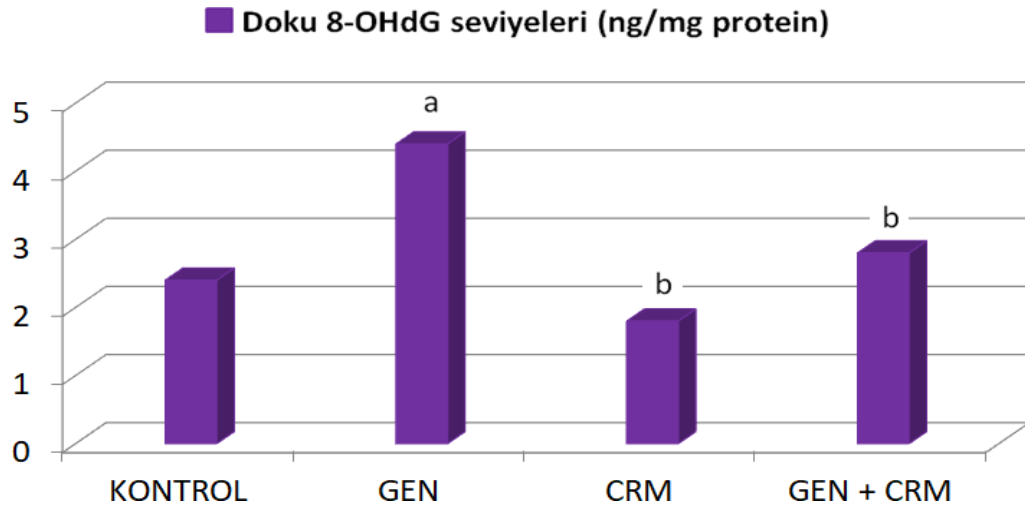
Doku 8-OHdG seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre 8-OHdG seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oldu.

Tablo 31: Deney sonu grupların doku 8-OHdG seviyeleri

GRUP	Doku 8-OHdG seviyeleri (ng/mg protein)
KONTROL Ort±SD	1,46 ± 0,76
GEN Ort±SD	5,20 ± 1,87 ^a
CRM Ort±SD	1,62 ± 0,26 ^b
GEN+CRM Ort±SD	1,62 ± 0,85 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

Şekil 42: Deney sonu grupların doku 8-OHdG seviyeleri

4.4.6. Doku TNF- α seviyeleri

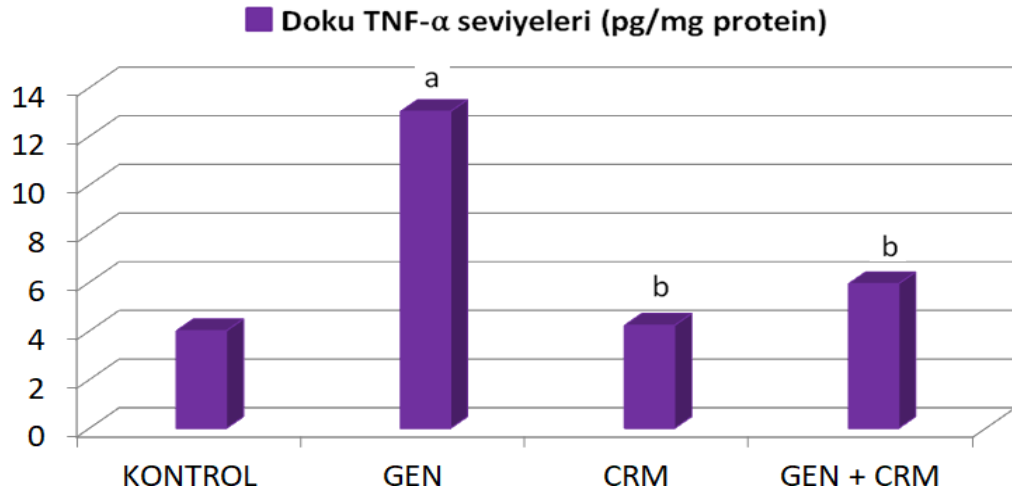
Doku TNF- α seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oldu.

Tablo 32: Deney sonu grupların doku TNF- α seviyeleri

GRUP	Doku TNF- α seviyeleri (pg/mg protein)
KONTROL Ort $\pm$ SD	4,01 $\pm$ 1,62
GEN Ort $\pm$ SD	13,02 $\pm$ 9,80 ^a
CRM Ort $\pm$ SD	4,23 $\pm$ 1,46 ^b
GEN+CRM Ort $\pm$ SD	5,94 $\pm$ 4,87 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 43: Deney sonu grupların doku TNF- α seviyeleri

4.4.7. Doku MPO seviyeleri

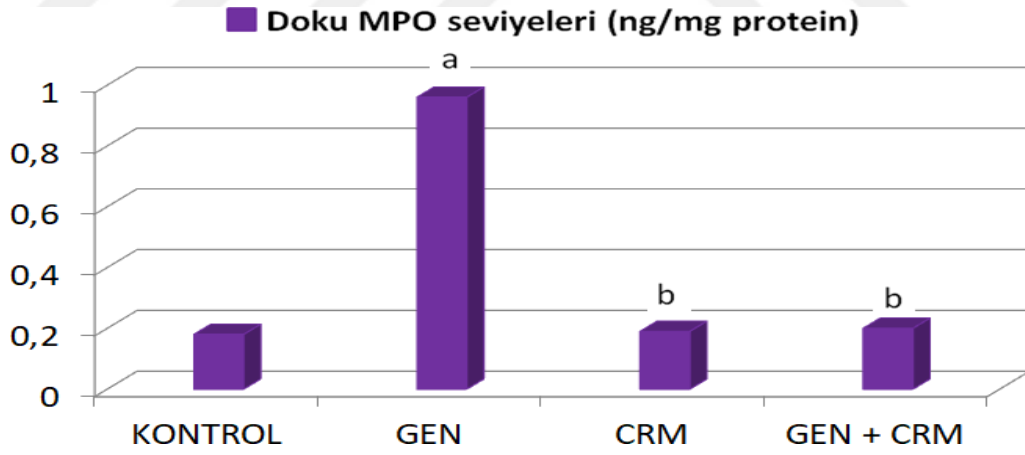
Doku MPO seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre MPO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oldu.

Tablo 33: Deney sonu grupların doku MPO seviyeleri

GRUP	Doku MPO seviyeleri (ng/mg protein)
KONTROL Ort±SD	0,18 ± 0,09
GEN Ort±SD	0,96 ± 0,56 ^a
CRM Ort±SD	0,19 ± 0,10 ^b
GEN+CRM Ort±SD	0,20 ± 0,08 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

Şekil 44: Deney sonu grupların doku MPO seviyeleri

4.4.8. Doku Kaspaz-3 seviyeleri

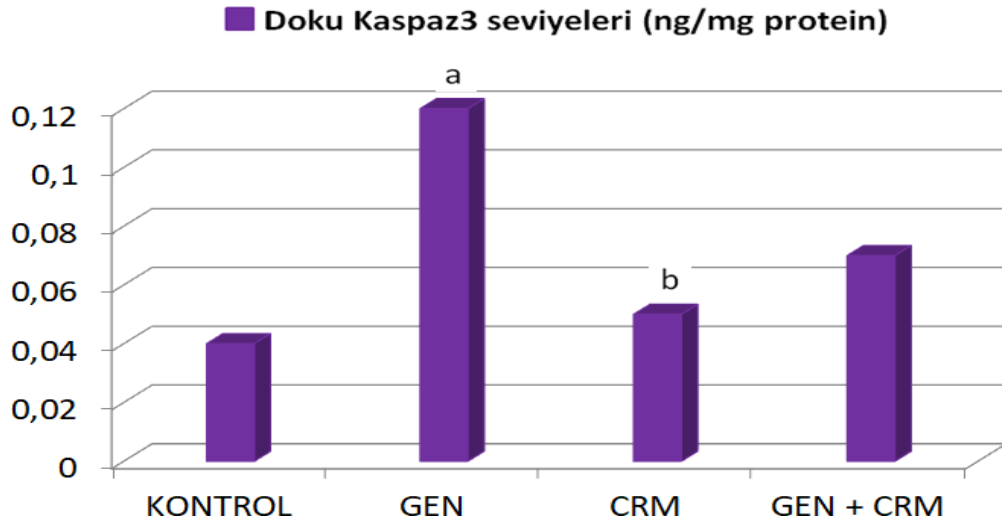
Doku Kaspaz-3 seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre Kaspaz-3 seviyelerinde azalma oldu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 34: Deney sonu grupların doku Kaspaz-3 seviyeleri

GRUP	Doku Kaspaz-3 seviyeleri (ng/mg protein)
KONTROL Ort±SD	0,04 ± 0,01
GEN Ort±SD	0,12 ± 0,03 ^a
CRM Ort±SD	0,05 ± 0,01 ^b
GEN+CRM Ort±SD	0,07 ± 0,04

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 45: Deney sonu grupların doku Kaspaz3 seviyeleri

4.4.9. Doku TOS seviyeleri

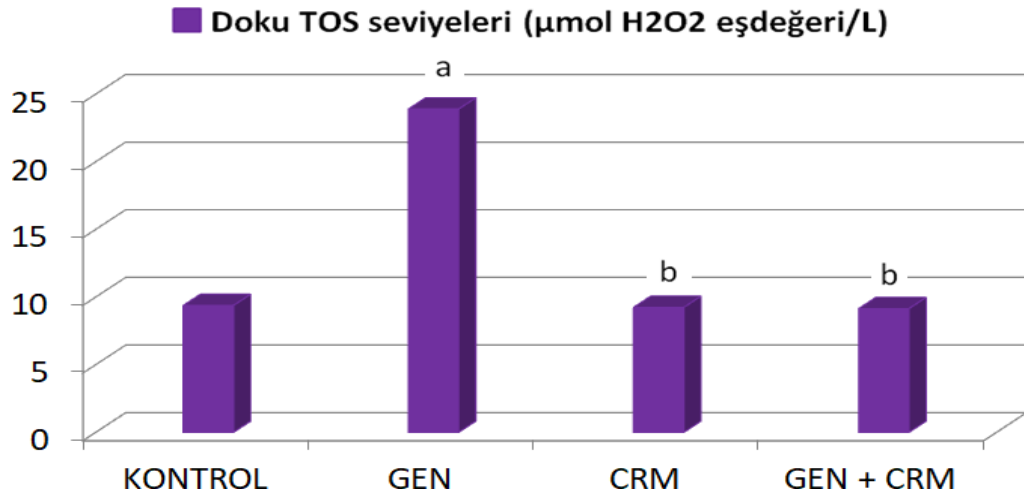
Doku TOS seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre TOS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oldu.

Tablo 35: Deney sonu grupların doku TOS seviyeleri

GRUP	Doku TOS seviyeleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L)
KONTROL Ort $\pm$ SD	9,37 $\pm$ 0,75
GEN Ort $\pm$ SD	23,89 $\pm$ 12,22 ^a
CRM Ort $\pm$ SD	9,23 $\pm$ 1,51 ^b
GEN+CRM Ort $\pm$ SD	9,14 $\pm$ 1,69 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 46: Deney sonu grupların doku TOS seviyeleri

4.4.10. Doku TAS seviyeleri

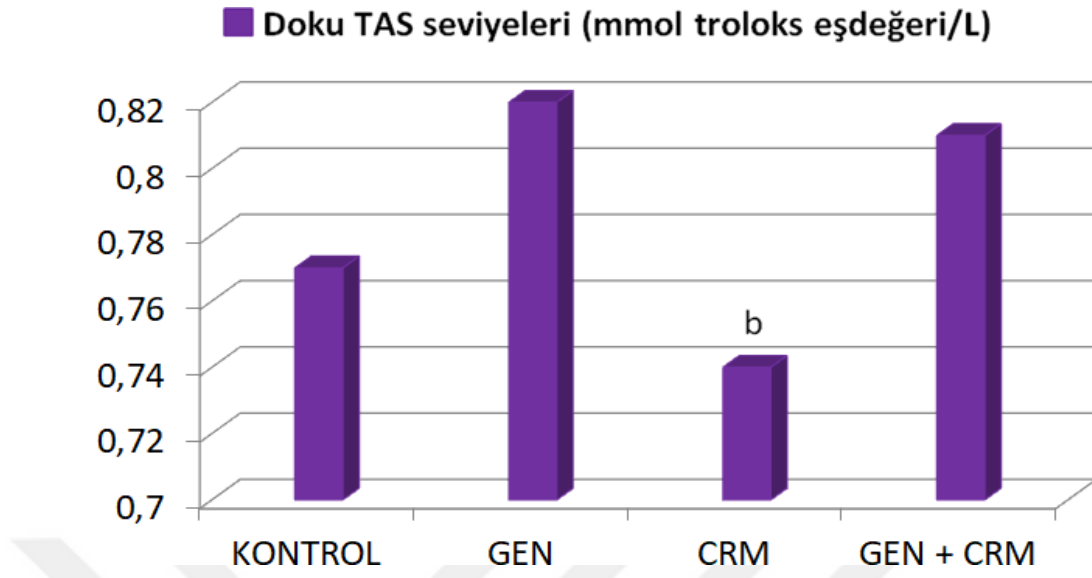
Doku TAS seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise TAS seviyeleri GEN grubuna yakın seyretti.

Tablo 36: Deney sonu grupların doku TAS seviyeleri

GRUP	Doku TAS seviyeleri (mmol troloks eşdeğeri/L)
KONTROL Ort±SD	0,77 ± 0,05
GEN Ort±SD	0,82 ± 0,02
CRM Ort±SD	0,74 ± 0,07 ^b
GEN+CRM Ort±SD	0,81 ± 0,04

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı $p < 0,05$

Şekil 47: Deney sonu grupların doku TAS seviyeleri

4.4.11. Doku OSI seviyeleri

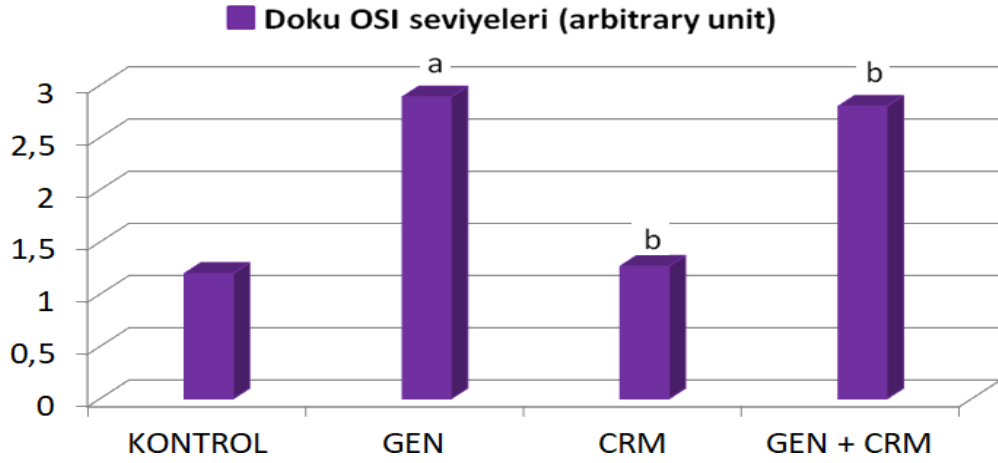
Doku OSI seviyelerine bakıldığında GEN grubunda K ve CRM gruplarına kıyasla bir artış görüldü. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre OSI seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oldu.

Tablo 37: Deney sonu grupların doku OSI seviyeleri

GRUP	Doku OSI seviyeleri (arbitrary unit)
KONTROL Ort±SD	1,20 ± 0,08
GEN Ort±SD	2,89 ± 1,47 ^a
CRM Ort±SD	1,27 ± 0,32 ^b
GEN+CRM Ort±SD	1,11 ± 0,19 ^b

a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05



a: Kontrol grubuna göre anlamlı p<0,05

b: Gentamisin grubuna göre anlamlı p<0,05

Şekil 48: Deney sonu grupların doku OSI seviyeleri

5. TARTIŞMA

İnfertilite, korunmasız ilişkiye rağmen 12 ay içerisinde 35 yaş üstü kadınlarda ise 6 ay içerisinde gebelik oluşmaması durumudur (1). Erkek infertilitesi, infertilite olgularının yarısını oluşturmakta olup hormonal düzensizlikler, genetik sorunlar, fiziksel ve çevresel etmenler, ilaçlar gibi faktörler infertiliteye sebep olabilmektedir (3,88).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırma yoluyla GEN'in testis üzerindeki oksidatif stresi artırdığını ortaya koymuştur (36). Oksidatif stres anormal sperm fonksiyonu nedenleri arasında yer alır ve erkek infertilitesinde önemli bir yere sahiptir (89). GEN'in testiste apoptozu uyardığı, sperm hareketi bozukluklarına yol açtığını söyleyen çalışmalar da mevcuttur (90,91).

Curcuma longa Asya ve Afrika'da birçok ülkede uzun yıllardır baharat ve medikal alanda ilaç olarak kullanılan bir bitkidir. Curcuma longa'dan elde edilen CRM'de antiinflamatuvar, antioksidan etkileriyle geleneksel tıpta kullanılan bir ajandır (92, 93, 94, 95). Yapılan çalışmalar CRM'nin testis üzerinde antioksidan savunma mekanizmalarıyla toksisiteyi azalttığı biyokimyasal ve morfolojik bozukluklarda düzelmeye yol açtığını göstermiştir (96,97).

Yukarıdaki verilerden yola çıkılarak çalışmamızda GEN kullanımı ile oluşabilecek testis hasarına karşı antioksidan özelliği olan CRM'nin etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

Aly ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlar üzerinde 10 gün süren günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak GEN verdikleri çalışmada GEN'in vücut ağırlığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ancak testis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir azalma olduğunu görmüşlerdir (32).

Medhat Taha ve ark.larının yaptığı 30 erişkin erkek sıçana uygulanan ve 6 gün süren günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilen GEN çalışmasında vücut ağırlığında önemli bir değişiklik olmamasına karşın testis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir azalma olduğu rapor edilmiştir (36).

Karaman ve ark.larının 10 haftalık BALB/c cinsi farelere yaptığı 6 gün süren günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verdikleri GEN deneyinde hayvanların vücut ve testis ağırlıklarının ikisinde de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (33). Bizim çalışmamızda da GEN grubunda vücut ve testis ağırlığı açısından K grubuna göre bir azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışma bulgularımıza bakıldığında GEN grubunda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında ciddi bir azalma ve parankimal atrofi görülmemiştir. Testis ağırlığındaki azalmanın anlamlı düzeyde olmamasını bu durumla açıklamak mümkündür.

El-Wakf ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlarda yaptığı nitrat hasarına karşı oral yolla DMSO da çözündürülmüş CRM verildiği çalışmada testis ağırlığı ve testis/vücut ağırlığı indeksine bakılmıştır. Çıkan sonuca göre CRM'nin her iki parametrede de nitratın istatistiksel olarak oluşturduğu anlamlı azalmayı iyileştirdiği ve kontrol grubuna yakın değerler gözlemlendiği rapor edilmiştir (98). Bizim çalışmamızda da testis ağırlığı açısından GEN+CRM grubuyla K grubunda birbirine yakın değerler görülmüştür. Testis/vücut ağırlığı indeksi açısından bu çalışmayla örtüşen sonuçlar izlenmiştir.

Fetouh ve ark.larının gine domuzları üzerinde yaptıkları çalışmada hayvanlara 10 gün boyunca günlük 5 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak GEN; tedavi olarak ise propolis ve CRM ajanları verilmiştir. CRM ile tedavi edilen hayvanlara 10 gün boyunca günlük 10 mg/kg dozunda oral yolla CRM verilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında testiküler dokuda; mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül uzunluğu, total seminifer tübül yüzey alanı, total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı, total ve birim hacim başına düşen Leydig hücre sayıları hesaplanmış ve GEN grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma, CRM ile tedavi edilen grupta anlamlı bir artış görülmüştür (78).

Bizim çalışmamızda da mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül uzunluğu, total seminifer tübül yüzey alanı, total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı, GEN grubunda K grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Total ve birim hacim başına düşen Leydig hücre sayıları açısından bu çalışmada olduğu gibi bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu

durum Leydig hücreleriyle ilgili daha sağlıklı sonuçlara ulaşabilmek için Leydig hücre sayısına ek olarak serum/doku testosteron düzeylerine de bakılan çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmüştür. GEN+CRM grubunda ise Fetouh ve ark.larının çalışmasında olduğu gibi GEN grubuna göre mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül yüzey alanı, total ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısı açısından anlamlı bir artış gözlenmekte olup total seminifer tübül uzunluğundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Nouri ve ark.larının 24 gün boyunca intraperitoneal olarak günlük 5 mg/kg dozunda GEN uyguladıkları çalışmada spermatogenik seri hücrelerinde azalma, dejenerasyon görülmüştür (99).

Khaki A. ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlarda 40 gün boyunca günlük 5 mg/kg dozunda GEN verdiği çalışmada sperm sayısı, hareketliliği ve canlılığında azalma rapor edilmiştir (100).

Timmersans ve ark.larının 8 gün boyunca günlük 1,2 mg/kg gentamisin verdikleri çalışmada GEN'in spermatogonyal bölünmeyi durdurduğu ve primer spermatosit aşamasında mayoz bölünmeyi kesintiye uğrattığı görülmüştür (101).

Khaki A'nın aminoglikozidler ve florokinolonların sperm parametreleri ve erkek üreme dokusu üzerindeki olumsuz etkilerinin değerlendirildiği derleme çalışmasında GEN'in yüksek doz kullanımlarında günlük sperm üretimini olumsuz yönde etkilediği söylenmiştir (102).

Kim ve ark.larının 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek cinsi sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada sıçanlara 6 gün boyunca 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak GEN verilmiştir. Çalışmanın sonunda sperm; baş, boyun ve kuyruk yönünden morfolojik olarak incelenmiş ve kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca GEN'in neden olduğu toksisitenin erken spermatogenik hücrelerde yoğunlaşabileceğini rapor etmişlerdir (31).

Bizim çalışmamızda GEN grubunda K grubuna kıyasla toplam ve hareketli sperm sayılarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bunun dışında yukarıdaki çalışmalarda bahsedildiği gibi spermatogenetik seri hücrelerinden olan round yani erken spermatid miktarı, günlük sperm üretimi ve sperm canlılık yüzdelerinde anlamlı azalma gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda spermatogonal

bölünmenin kesilmesi ve spermatogenik duraksamanın, spermelerin hücre içindeki protein sentezinin azalmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (103).

Sperm morfolojisi açısından teratozoospermik indekste GEN grubunda K grubuna göre anlamlı bir fark görülmekte olup sperm anomali yüzdesi açısından ise Kim ve ark.larının çalışmasındaki gibi anlamlı bir fark görülmemiştir.

Jalili ve ark.larının 50 adet erkek fare üzerinde yaptıkları çalışmada 28 gün boyunca 10 mg/kg, 30 mg/kg, 60 mg/kg dozlarında CRM verdikleri çalışmada toplam sperm miktarı ve hareketli sperm açısından 10 mg/kg grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. 30 mg/kg verilen grupta herhangi bir fark gözlenmemiştir. 60 mg/kg verilen grupta ise hareketli sperm sayısı açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (104). Bizim çalışmamızda da hareketli sperm miktarı açısından GEN+CRM grubunda GEN grubuna göre anlamlı artış görülmüştür.

Sharma ve ark.larının 14 gün boyunca DMSO'da çözdürülmüş günlük 100 mg/kg dozunda CRM verdikleri çalışmada CRM grubu ile 14 gün boyunca sadece DMSO verilen grubun sperm anomali yüzdesi ve canlı sperm yüzdesi değerleri birbirine yakın bulunmuştur (93). Bizim çalışmamızda da CRM grubu ile GEN+CRM grubunda sperm anomali yüzdesi ve canlı sperm yüzdesi açısından K grubuna yakın değerler gözlenmiş olup bu çalışmayla örtüşen sonuçlar izlenmiştir.

Narayana ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlarda yaptığı çalışmada GEN 10 gün boyunca günlük 3 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında verilmiştir. Bu iki dozdan da ikişer grup olacak şekilde tasarlanmıştır. Tedaviden sonraki 1. günde her iki doz seviyesinden bir grup kurban edilmiştir. Her iki dozdan geri kalan diğer iki grupta tedaviden sonraki 35. günde kurban edilmiştir. Seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı ölçümlerinde 3 mg/kg verilen grupta 1. gün sonuçlarında da 35. gün sonuçlarında da kontrol grubuna göre herhangi bir fark gözlenmemiştir. 5 mg/kg verilen grupta ise 35. günde daha belirgin olmak üzere 1. günde ve 35. günde seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (105).

Cheraghi ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlarda alüminyum hasarına karşı 28 gün boyunca intraperitoneal yolla DMSO da çözdürülmüş CRM verdikleri

çalışmada seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları hasar grubunda anlamlı bir şekilde azalma gösterirken CRM ile tedavi edilen grupta iyileşme görülmüş olup kontrol grubuna yakın değerler izlenmiştir (72).

Bıyık ve ark.larının Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlarda yaptığı günlük 80 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak GEN verdikleri çalışmada seminifer tübül çapı açısından kontrole göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Germinal epitel kalınlığı ise kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (106). Bizim çalışmamızda ise Bıyık ve ark.larının çalışması gibi seminifer tübül çapı açısından GEN grubunda K grubuna göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Germinal epitel kalınlığı açısından da anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak germinal epitel kalınlığı/seminifer tübül çapı oranı yardımıyla birim tübül başına düşen germinal epitel kalınlığına bakıldığında GEN grubuna K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. GEN+CRM grubunda ise iyileşme gözlenmiş olup K grubuna yakın değerler izlenmiştir.

Medhat Taha ve ark.larının 30 tane erişkin erkek sıçana günlük 100 mg/kg gentamisinini 6 gün boyunca intraperitoneal olarak uyguladığı çalışmada kontrol grubuna göre GEN grubunda anlamlı derecede germinal epitelde ayrılma görülmüştür. Ayrıca seminifer tübüller Modifiye Johnsen skorlamasıyla değerlendirilmiş ve yine GEN grubunda kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmiştir (36).

Elsawah ve ark.larının GEN'in erkek üreme sistemindeki etkilerini araştırdığı çalışmada 14 gün boyunca günlük 18,25 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak sıçanlara uygulanan GEN sonucunda germinal epitel hücrelerinde değişken derecede dejeneratif değişiklikler ve interstisyel alanda ödem izlenmiştir (107).

Artıran ve ark.larının Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlarla yaptığı çalışmada sıçanlara 14 gün boyunca günlük 5 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak GEN verilmiştir. Çalışmanın sonunda GEN grubunda interstisyel alanda şiddetli derecede ödem, spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve germinal epitelde ayrılmalar gözlenmiştir (35).

Kılınç ve ark.larının 18 tane Wistar cinsi erkek sıçana metotreksat hasarına karşı 14 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda CRM verdikleri çalışmada hasar

grubunda gözlenen germinal epitelde ayrılma durumunun CRM ile tedavi edilen grupta anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (59).

Wei ve ark.larının 60 tane Sprague Dawley cinsi erkek sıçanla yaptığı çalışmada sıçanlar 3 gruba ayrılarak kontrol grubu dışındaki diğer iki grupta yer alan sıçanların sol testislerine torsiyon detorsiyon uygulaması yapılmıştır. Tedavi grubuna detorsiyonla birlikte kuyruk veni yoluyla 200 mg/kg dozunda CRM verilmiştir. Çalışma sonunda bakılan Modifiye Johnsen skor parametrelerinde CRM verilen tedavi grubunda hasar grubuna göre skorda anlamlı bir iyileşme gözlenmiş olup tedavi grubundaki sıçanların sol testis ve sağ testisleri kendi içinde değerlendirildiğinde ise sol testis skorlarında sağ testis skorlarına göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (108).

Coşkun ve ark.larının 60 erkek fare üzerinde nikotin hasarına karşı CRM'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada 14 ve 28 gün boyunca günlük 0,4 mg/kg dozunda nikotin ve 200 mg/kg CRM verdikleri iki grupta interstisyel alanda ödem açısından CRM verilmeyen gruplara göre anlamlı derecede azalma izlenmiş normale yakın değerler gözlenmiştir (96).

Bizim çalışmamızda da germinal epitelde ayrılma parametresi açısından yukarıdaki çalışmalarda bahsedildiği gibi GEN grubunda anlamlı derecede bir artış görülmüştür. GEN+CRM grubunda ise anlamlı bir azalma gözlenmiştir. GEN grubunda yine yukarıda bahsedilen çalışmalardaki gibi interstisyel alanda ödem ve Modifiye Johnsen skoru parametreleri açısından K grubuna göre anlamlı bir şekilde hasar görülmüş olup CRM grubunda K grubuna göre yakın değerler izlenmiştir. GEN+CRM grubunda ise K grubuna göre interstisyel alanda ödem ve Modifiye Johnsen skorunda iyileşme görülememiştir. CRM'nin daha yüksek dozlarda kullanıldığı çalışmalara kıyasla bizim çalışmamızda bu parametrelerde iyileşme olmaması çeşitli yüksek dozlarda ileri çalışmaların yapılmasının uygun olacağını düşündürmüştür.

Zahedi ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlara günlük 50 mg/kg GEN verdikleri çalışmada GEN'in testis üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, bizim çalışma sonuçlarımızla örtüşecek şekilde GEN grubunda, kontrol

grubuna göre TUNEL pozitif hücrelerin anlamlı bir şekilde arttığı rapor edilmiştir (91).

Cheraghi ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlarda alüminyum hasarına karşı 28 gün boyunca intraperitoneal yolla DMSO da çözdürülmüş CRM verdikleri çalışmada TUNEL boyama sonuçlarına bakıldığında tedavi grubunda hasar grubuna kıyasla apoptotik hücrelerde anlamlı derecede azalma izlenmiştir (72).

Kanter ve ark.larının 24 tane erkek sıçan üzerinde streptozosin ile oluşturdukları diyabet modelinde streptozosin enjeksiyonundan 3 gün önce başlanıp 8 hafta boyunca sıçanlara DMSO'da çözdürülmüş günlük 100 mg/kg dozunda CRM uygulanmıştır. TUNEL immünohistokimyasal boyamanın da yapıldığı çalışmada CRM ile tedavi edilen grupta diyabetik gruba göre anlamlı derecede azalma gözlenmiştir (109).

Bizim çalışmamızda da yukarıdaki çalışmalarda bahsedildiği gibi GEN grubunda K grubuna göre apoptotik hücrelerde anlamlı bir artış görülmüştür. GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna göre apoptotik hücrelerde azalma gözlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Medhat Taha ve ark.larının erkek sıçanlara 100 mg/kg GEN'i 6 gün boyunca intraperitoneal olarak uyguladığı çalışma ve Artıran ve ark.larının yaptıkları 14 gün boyunca günlük 5 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak sıçanlara GEN verdikleri çalışmada Periyodik Asit-Schiff boyama sonuçlarında GEN grubunda kontrol grubuna göre bazal membranda düzensizlik gözlenmiştir (35,36).

El hafez ve ark.ları kriptorşitizm modeli oluşturdukları sıçanlara tedavi olarak DMSO'da çözdürülmüş 80 mg/kg CRM vermişlerdir. Periyodik Asit-Schiff boyamanın da yapıldığı çalışmada kriptorşitizm yapılan grupta bazal membranda düzensizlik görülmüştür. CRM ile tedavi edilen grupta ise bulgulara düzelme gözlenmiştir (110).

Mercantepe ve ark.larının sisplatinin testis hasarı üzerine CRM'nin etkilerinin araştırıldığı çalışmada sisplatin enjeksiyonundan 24 saat önce başlanarak DMSO içinde çözdürülmüş CRM günlük 100 mg/kg dozunda yedi gün boyunca verilmiştir. Yapılan Periyodik Asit-Schiff boyama sonuçlarında sisplatin grubunda bazal laminada görülen dejenerasyonların CRM grubunda azaldığı izlenmiştir (111).

Abdelhaffez ve ark.larının Wistar cinsi erkek sıçanlara 10 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verdikleri GEN'in Masson trikrom boyama kesitlerinde interstisyel alanda ve tunica albugineada kollajen miktarında artışa; Periyodik Asit-Schiff boyamada ise bazal membranda hasara yol açtığı görülmüştür (112).

Mohamed ve ark.larının testis üzerinde GEN hasarı oluşturdukları modelde 30 tane erkek sıçana 2 hafta boyunca günlük 80 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak GEN verilmiştir. Daha sonra GEN uygulanan sıçanlar üç gruba ayrılıp 2. hafta, 6. hafta ve 10. haftada sakrifiye edilmiştir. Bulgulara bakıldığında 10. haftada daha belirgin olmak üzere interstisyel alanda bağ doku artışı, fibrozis, tübüllerde düzensizlikler görülmüştür (113).

İlbey ve ark.larının sisplatin hasarına karşı CRM'nin etkilerinin araştırıldığı çalışmada CRM mısır yağında çözülüp günlük 200 mg/kg dozunda oral olarak 10 gün boyunca verilmiştir. Çalışmanın sonunda bakılan testiküler fibroziste tedavi alan grupta hasar grubunda görülen perivasküler fibroziste iyileşme görülmüştür (114).

Elsadawi ve ark.larının yaptığı fluoksetinin testis hasarına karşı CRM'nin etkilerinin araştırıldığı çalışmada günlük 150 mg/kg dozunda CRM distile suda çözülerek oral gavaj yoluyla verilmiştir. Fluoksetin grubunda tunica albuginea ve perivasküler bağ dokuda kollajen artışı izlenmiştir. CRM ile tedavi edilen grupta ise iyileşme görülüp kollajen lifinde azalma görülmüştür (115).

Bizim çalışmamızda da yukarıda bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi GEN grubunda tunica albuginea kalınlığında K grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Periyodik Asit-Schiff boyama sonuçlarında da GEN grubunda bazal membranda anlamlı düzeyde hasar gözlenmiş olup GEN+CRM grubunda iyileşme gözlenmiştir. İnterstisyel alanda bağ dokusu açısından GEN grubunda K grubuna kıyasla artış olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Biyokimyasal parametrelere bakıldığında Aly ve ark.larının yaptığı çalışmada GEN'in testiküler dokuda MDA, kaspaz-3 seviyesini anlamlı derecede arttırdığı; SOD, GPX ve GSH düzeylerini ise anlamlı derecede azalttığı görülmüştür (32).

Kim ve ark.ları yaptıkları çalışmada GEN'in MDA seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırdığını, GSH seviyelerini ise anlamlı derecede azalttığını rapor etmişlerdir (31).

Medhat Taha ve ark.larının yaptığı çalışmada, testiküler dokuda GEN'in MDA ve TNF- α seviyelerini anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür. SOD ve GPX seviyelerini ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttığı gözlenmiştir. Kaspaz-3 üzerine yapılan immünohistokimyasal boyamada GEN grubunda yaygın ve belirgin kaspaz-3 ekspresyonuna sahip spermatogenik hücrelerin olduğu görülmüştür (36).

Abdelhaffez ve ark.larının yaptığı çalışmada GEN'in testiküler dokuda TOS ve OSI seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırdığı, TAS seviyelerini ise anlamlı derecede azalttığı görülmüştür (112).

Mohammed ve ark.ları, 7 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uyguladıkları GEN'in böbrek dokusu üzerinde yaptığı oksidatif stres ve DNA hasarını araştırmak üzere bir çalışma tasarlamışlardır. Sonuçlara bakıldığında GEN'in GPX seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Çalışmada MDA ve 8-OHdG parametreleri için yapılan immünohistokimyasal boyamada GEN grubunda anlamlı düzeyde belirgin MDA ve 8-OHdG ekspresyonuna sahip hücrelerin olduğu görülmüştür (116).

Kolgazi ve ark.larının GEN'in nefrotoksisite etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada 7 gün boyunca günlük 80 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlara GEN uygulamışlardır. Çalışmada GEN grubunun MPO ve MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. GSH seviyeleri ise anlamlı derecede azalmıştır (117).

Oğuztürk ve ark.larının testis dokusunda kadmiyum hasarına karşı CRM'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada 3 gün boyunca günlük 100 mg/kg dozunda CRM uygulamışlardır. Testis dokusunda bakılan biyokimyasal parametrelerde SOD ve GSH seviyelerinde kontrol grubuyla sadece CRM uygulanan grupta yakın değerler görüldüğü izlenmiştir. Doku GPX seviyesi ise kontrol grubuna göre artmıştır. Tedavi grubunda hasar grubuna göre SOD, GSH ve GPX düzeylerinde artış görülmüştür (118).

Abarikwu ve ark.larının yaptığı mısır yağında çözündürülmüş günlük 100 mg/kg dozunda CRM'nin 30 gün boyunca uygulandığı çalışmada testis dokusunda çeşitli biyokimyasal parametrelere bakılmıştır. Bakılan parametrelerde CRM ile tedavi edilen grupta testiküler SOD, GPX ve GSH seviyelerinde hasar grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Doku MDA seviyesinde de kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür (119).

Mercantepe ve ark.larının yaptığı çalışmada kaspaz-3 ve 8-OHdG için yapılan immünohistokimya boyama sonuçlarında hasar grubuna kıyasla CRM ile tedavi edilen grupta ekspresyonda anlamlı derecede azalma gözlenmiştir (111).

Akomolafe ve ark.larının siklofosamid hasarına karşı CRM'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada 14 gün boyunca DMSO'da çözündürülmüş 20 mg/kg dozunda CRM sıçanlara uygulanmıştır. Testis dokusunda bakılan MDA, TNF- α , kaspaz 3 ve MPO seviyelerinde hasar grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür (120).

Yılmaz ve ark.ları testis kanser modeli oluşturdıkları Balb/C cinsi farelere iki farklı grup olacak şekilde 10 gün boyunca günlük 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozunda CRM intraperitoneal olarak uygulamışlardır. Çalışmada tedavi gruplarında SOD, GSH, TAS seviyelerinde; hiçbir uygulama yapılmayan kanserli farelere göre doza bağımlı olarak anlamlı derecede artış görülmüştür. TOS ve TNF- α seviyelerinde hasar grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür. OSI seviyesinde ise hasar grubuna kıyasla 50 mg/kg verilen grupta anlamlı bir azalma görülmüştür (121).

Bizim çalışmamızda da yukarıda bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi GEN grubunda K grubuna kıyasla MDA, 8-OHdG, TNF- α , MPO, Kaspaz-3, TOS, OSI parametrelerinde anlamlı artış; SOD, GPX ve GSH düzeylerinde anlamlı azalma gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalar dokuların GEN tedavisinden sonra doku katalaz etkinliğindeki azalmadan dolayı üretilen H₂O₂'i ortadan kaldıramadığını ve biriken H₂O₂'nin SOD'un inaktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir (6). Bu nedenlerle GEN grubunda SOD'un azalması süperoksit iyonlarının devamlı üretilmesine sebep olabilir. Hücreler fazla miktarda ortaya çıkan ROS düzeylerini azaltmak adına çeşitli antioksidan mekanizmalar kullanır (84). GEN grubundaki TAS seviyelerinin diğer gruplara göre artmasının sebebi aşırı üretilen ROS olabilir.

GEN+CRM grubunda ise GEN grubuna kıyasla MDA, 8-OHdG, TNF- α , MPO, TOS, OSI seviyelerinde anlamlı azalma; SOD, GPX seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. GSH seviyelerinde ise GEN+CRM grubunda, GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da artış görülmüştür.

Kaspaz-3 seviyelerine bakıldığında GEN grubuna göre GEN+CRM grubunda azalma görülmüştür ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum immünohistokimyasal boyama sonuçlarında çıkan apoptotik indeksle de örtüşmektedir. Apoptoz ve oksidatif hasarın oluşmasında gentamisin etken olduğu bildirilmiştir (122). Bizim çalışmamızda 8-OHdG'nin GEN grubunda yüksek çıkması hasarlı DNA'nın varlığını göstermesi açısından değerlidir. DNA hasarının açıklanması için farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. Oksidatif stres, anormal kromatin paketleme ve apoptozis en çok üzerinde çalışılan konulardır (123).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre GEN'in testis dokusunda spermatogenezde aksamalara neden olduğu, hücreler arası ve hücre-bazal membran bütünlüğünde bozulmalara yol açtığı, oksidatif stresi ise arttırdığı görülmüştür. Tedavi ajanı olarak uygulanan CRM'nin ise histopatolojik ve biyokimyasal olarak iyileşmelere yol açtığı gözlenmiştir. Ancak bu iyileştirici etkinin daha iyi değerlendirilebilmesi için farklı doz ve süreler ile yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sıçanlarda gentamisin ile oluşturulan deneysel testis hasarı üzerine kurkuminin etkileri isimli çalışmada istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlara bakıldığında;

Gentamisin grubunda kontrol grubuna kıyasla;

1. Mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül uzunluğu, total seminifer tübül yüzey alanında azalma,
2. Total Sertoli hücre sayısı ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısında azalma,
3. Total round spermatid sayısı, günlük sperm üretimi, gram başına düşen günlük sperm üretiminde azalma,
4. Germinal epitelde ayrılmada artış,
5. Modifiye Johnsen skorunda azalma,
6. Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı oranında azalma,
7. İnterstisyel alanda ödem,
8. Tunica albuginea kalınlığında artış,
9. Bazal membranda hasar,
10. Apoptotik indekste artış,
11. Canlı sperm yüzdesinde azalma,
12. Teratozoospermik indekste artış,
13. Doku MDA, 8-OHdG, TNF- α , MPO, Kaspaz-3, TOS, OSI seviyelerinde artış,
14. Doku SOD, GPX, GSH seviyelerinde azalma gözlenmiştir.

Antioksidan ajan olarak kurkuminin verildiği tedavi grubunda gentamisin grubuna kıyasla;

1. Mutlak seminifer tübül hacmi, total seminifer tübül yüzey alanında artış,

2. Total Sertoli hücre sayısı ve gram başına düşen Sertoli hücre sayısında korunma,

3. Total round spermatid sayısı, günlük sperm üretimi, gram başına düşen günlük sperm üretiminde artış,

4. Germinal epitelde görülen ayrılmada azalma,

5. Germinal Epitel Kalınlığı/Seminifer Tübül Çapı oranında artış,

6. Bazal membran hasarında iyileşme,

7. Canlı sperm yüzdesinde ve hareketli sperm miktarında artış,

8. Teratozoospermik indekste azalma,

9. Doku MDA, 8-OHdG, TNF- α , MPO, TOS, OSI seviyelerinde azalma,

10. Doku SOD, GPX seviyelerinde artış gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda;

Kurkuminin iyileştirici etkisinin daha iyi değerlendirilmesi için farklı doz ve sürelerde başka çalışmalar da yapılabilir.

İstatistiksel olarak daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak için deneyde kullanılan hayvan sayısı arttırılabilir.

Seminifer tübül hücreleri ve Leydig hücrelerinin daha iyi değerlendirilmesi için o hücrelere özgü immünohistokimyasal boyamalar yapılabilir.

Bağ dokusunda artış, bazal membran hasarı daha nicel yöntemlerle incelenebilir.

Epididimis dokusunda da oksidatif stres ve apoptotik indeks bakılabilir.

Elektron mikroskopik çalışmayla hücreler arası bağlantılar, kan-testis bariyeri incelenebilir.

Dokularda araştırılan oksidatif ve antioksidatif stres parametreleri, apoptotik indeks belirteçleri genişletilebilir, yapılacak olan çalışmaya hormon parametreleri de eklenebilir.

7.KAYNAKLAR

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;103(6):e44-e50.
2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care [published correction appears in Hum Reprod. 2007 Oct;22(10):2800]. *Hum Reprod*. 2007;22(6):1506-1512.
3. Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl*. 2006;8(2):143-157.
4. King K, Chan PJ, Patton WC, King A. Antibiotics: effect on cryopreserved-thawed human sperm motility in vitro. *Fertil Steril*. 1997;67(6):1146-1151.
5. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(4):727-737.
6. Aly HAA, Hassan MH. Potential testicular toxicity of gentamicin in adult rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(1):362-367.
7. Khaki A, Novin MG, Khaki AA, Nouri M, Sanati E, Nikmanesh M (2008) Comparative study of the effects of gentamicin, neomycin, streptomycin and ofloxacin antibiotics on sperm parameters and testis apoptosis in rats. *Pak J Biol Sci* 11:1683–1689.
8. Demirel C, Turkoz D, Yazicioglu IM, Cokluk C. The Preventive Effect of Curcumin on the Experimental Rat Epidural Fibrosis Model. *World Neurosurg*. 2021;145:e141-e148.
9. Maiti P, Dunbar GL. Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1637. Published 2018 May 31.
10. Muratoğlu S, Akarca Dizakar OS, Keskin Aktan A, Ömeroğlu S, Akbulut KG. The protective role of melatonin and curcumin in the testis of young and aged rats. *Andrologia*. 2019;51(3):e13203.
11. Daverey A, Agrawal SK. Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Neuroscience*. 2016;333:92-103.
12. Karłowicz-Bodalska K, Han S, Freier J, Smolenski M, Bodalska A. Curcuma Longa As Medicinal Herb In The Treatment Of Diabet- Ic Complications. *Acta Pol Pharm*. 2017;74(2):605-610.
13. Farombi EO, Abarikwu SO, Adedara IA, Oyeyemi MO. Curcumin and kolaviron ameliorate di-n-butylphthalate-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007;100(1):43-48.
14. Schoenwolf, Larsen's Human Embryology 5. Edition. Elsevier Limited, Philadelphia; 2015 389-416

- 15.** Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 13. Edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA; 2015. 261-277
- 16.** Moore KL. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 10th edition. Elsevier, Philadelphia; 2016. 260-281
- 17.** Samuel Webster, Rhiannon de Wreede. Embryology at a Glance 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd, UK; 2016. 76-89
- 18.** Ronald W. Dudek, BRS Embryology. 6. Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, China, 2014. 180-191
- 19.** Arıncı K. Anatomi, 7. Edition. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2020. 322-337.
- 20.** Cochard L. Netter's Atlas of Human Embryology, Updated Edition. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. USA, 2012. 177-179.
- 21.** Moore KL. Clinically Oriented Anatomy 8. Edition. Wolters Kluwer, China, 2018. 1396-1411.
- 22.** Standring S. Gray's Anatomy, 41st Edition. Elsevier Limited, USA, 2016. 1272-1287
- 23.** Wineski L. Snell's Clinical Anatomy by Regions, 10. Edition. Wolters Kluwer, China, 2019. 1210-1114.
- 24.** Pawlina W, Ross MH. Male Reproductive System. In: Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. 6th ed. 2014. 784-803.
- 25.** Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviren Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 544
- 26.** Mescher, A. L. Junqueira's Basic Histology: text and atlas. 14th. ed. United States of America: McGraw-Hill; 2016. 439-451
- 27.** Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 3. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016. 333-350
- 28.** Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 14. Edition. McGraw-Hill Education: USA; 2018. 826-831
- 29.** Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Baskı. Pelikan Yayıncılık; Ankara; 2012. 233-241
- 30.** Dandan R. Brunton L. Goodman and Gilman'ın Farmakoloji ve Tedavi El kitabı, 2. Edition. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2017. 913-923
- 31.** Kim SH, Lee IC, Baek HS, et al. Melatonin prevents gentamicin-induced testicular toxicity and oxidative stress in rats. *Andrologia*. 2014;46(9):1032-1040.
- 32.** Aly H. Testicular toxicity of gentamicin in adult rats: Ameliorative effect of lycopene. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(11):1302-1313.
- 33.** Karaman M, Budak H, Çiftci M. Amoxicillin and gentamicin antibiotics treatment adversely influence the fertility and morphology through decreasing

the *Dazl* gene expression level and increasing the oxidative stress. *Arch Physiol Biochem.* 2019;125(5):447-455.

34. Zahedi A, Fathiazad F, Khaki A, Ahmadnejad B. Protective effect of ginger on gentamicin-induced apoptosis in testis of rats. *Adv Pharm Bull.* 2012;2(2):197-200.

35. Artıran M, Burukoğlu Dönmez D, Bayçu C, Yılmaz H. Gentamisin’le Testis Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda C Vitamininin Koruyucu Etkisi. Protective Effect of Vitamin C from Gentamicin Induced Testicular Damage in Rats. *Osmangazi Tıp Dergisi.* 2017;39(2):32-9.

36. Taha M, Elazab ST, Saati AA, et al. Zamzam Water Ameliorates Gentamicin-Induced Testicular Toxicity in a Rat Model via Targeting Sperm Parameters, Testicular Tissue Oxidative Insult, Inflammation, Apoptosis, and Pituitary-Gonadal Axis. *Toxics.* 2022;11(1):2. Published 2022 Dec 20.

37. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. Robbins Temel Patoloji. 10. baskı, Çeviren: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2020; 31-56.

38. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20180992. Published 2019 Jan 18.

39. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* 2016;13(3):031001. Published 2016 May 11.

40. Hall J. Tıbbi fizyoloji, 12. Edition. Nobel Tıp Kitabevleri, 2013; 40-41

41. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem.* 2022;69(4):1633-1645.

42. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji. 2. baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016. 83-87.

43. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* 2013;14:32. Published 2013 Jul 9.

44. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019;50(6):1352-1364.

45. Altınar, A., Atalay, H., & Bilal, T. (2018). Serbest Radikaller Ve Stres İle İlişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 51-55.

46. Kurtdele E, Pekcan M, Karagül H. Florun Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres ile İlişkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* Aralık 2018;13(3):373-379.

47. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Invest.* Kasım 2015;6(3):331-336.

48. Büyüksulu N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Clinical and Experimental Health Sciences.* Ekim 2015;5(3):197-203.

49. Chio IIC, Tuveson DA. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med*. 2017;23(5):411-429.
50. Gunes AE, Yılmaz O, Erbas C, Dagli SN, Celik H. High serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels predict DNA damage and aging in professional divers. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2021;67(11):1701-1705.
51. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*. 2017;84(10):1039-1052.
52. Yılmaz S, Sofuoğlu K, Delikara N, Çetinkaya T, Yılmaz E. Semende reaktif oksijen türevleri ve antioksidanlar. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*. Nisan 2008;39(3):131-135.
53. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Savran EŞ, Yılmaz B. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fak Derg*. 2019;26(3):362-9.
54. Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
55. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957-1997.
56. Kavas GÖ. Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fizyopatolojik Yaklaşım. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. Nisan 1994;47(4).
57. Scandolara TB, Panis C. Neutrophil traps, anti-myeloperoxidase antibodies and cancer: Are they linked?. *Immunol Lett*. 2020;221:33-38.
58. Buico A, Cassino C, Ravera M, Betta PG, Osella D. Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma. *Redox Rep*. 2009;14(3):125-131.
59. Kilinc L, Uz YH. Protective effects of curcumin against methotrexate-induced testicular damage in rats by suppression of the p38-MAPK and nuclear factor-kappa B pathways. *Clin Exp Reprod Med*. 2021;48(3):211-220.
60. Park JH, Lee BM, Kim HS. Potential protective roles of curcumin against cadmium-induced toxicity and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2021;24(3):95-118.
61. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*. 2003;9(1):161-168.
62. Barrajón-Catalán, E.; Funes, L.; Herranz-López, M.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.V.M. Differential absorption of curcuminoids between free and liposomal curcumin formulations. In *Curcumin: Clinical Uses, Health Effects and Potential Complications*; Martin, V., Ed.; Nova Publishers: Hauppauge, NY, USA, 2016; pp. 99–110

63. Begum AN, Jones MR, Lim GP, et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;326(1):196-208.
64. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, Samini F. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:223-229.
65. Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(13):2889-2895.
66. Aktas C, Kanter M, Erboğa M, Öztürk S. Anti-apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Toxicol Ind Health*. 2012;28(2):122-130.
67. Tvrdá E, Tušimová E, Kováčik A, et al. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Anim Reprod Sci*. 2016;172:10-20.
68. Yun JI, Gong SP, Song YH, Lee ST. Effects of combined antioxidant supplementation on human sperm motility and morphology during sperm manipulation in vitro. *Fertil Steril*. 2013;100(2):373-378.
69. Petruska, Peter; Capcarova, Marcela; and Sutovsky, Peter (2014) Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*: Vol. 38: No. 6, Article 9.
70. Bucak MN, Başpınar N, Tuncer PB, et al. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:102-109.
71. Naz RK. Can curcumin provide an ideal contraceptive?. *Mol Reprod Dev*. 2011;78(2):116-123.
72. Cheraghi E, Golkar A, Roshanaei K, Alani B. Aluminium-Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Alterations in Testicular Tissue and Sperm Quality in Wistar Rats: Ameliorative Effects of Curcumin. *Int J Fertil Steril*. 2017;11(3):166-175.
73. Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat*. 1982;165(1):13-25.
74. Sprando RL, Collins TF, Wiesenfeld P, et al. Testing the potential of flaxseed to affect spermatogenesis: morphometry. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(10):887-892.
75. Bielli A, Gastel MT, Pedrana G, et al. Influence of pre- and post-pubertal grazing regimes on adult testicular morphology in extensively reared Corriedale rams. *Anim Reprod Sci*. 2000;58(1-2):73-86.
76. William E. Berndtson, Methods for Quantifying Mammalian Spermatogenesis: a Review, *Journal of Animal Science*, Volume 44, Issue 5, May 1977, Pages 818–833
77. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946;94:239-247.

- 78.** Fetouh FA, Azab AES. Ameliorating effects of Curcumin and Propolis against the reproductive toxicity of gentamicin in adult male guinea pigs: quantitative analysis and morphological study. *Am J Life Sci.* 2014;2(3):138-149.
- 79.** Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:471-480.
- 80.** Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52(1):198-236.
- 81.** Castro AC, Berndtson WE, Cardoso FM. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(4):493-498.
- 82.** Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
- 83.** Kurus M, Bay Karabulut A, Taslidere E, Otlı O. Preventive effects of Resveratrol against azoxymethane-induced testis injury in rats. *Andrologia.* 2017;49(6):10.1111/and.12674.
- 84.** Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Kutlu Ö, Kahraman C. Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(3):229-235.
- 85.** WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6. Edition, 2021, 86.
- 86.** Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271-278.
- 87.** Demir S, Mentese A, Kucuk H, et al. Ethyl pyruvate attenuates cisplatin-induced ovarian injury in rats via activating Nrf2 pathway. *Drug Chem Toxicol.* 2024;47(2):218-226.
- 88.** Schlegel PN, Chang TS, Marshall FF. Antibiotics: potential hazards to male fertility. *Fertil Steril.* 1991;55(2):235-242.
- 89.** Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010;48(5):425-435.
- 90.** Keogh LM, Byrne PG, Silla AJ. The effect of gentamicin on sperm motility and bacterial abundance during chilled sperm storage in the Booroolong frog. *Gen Comp Endocrinol.* 2017;243:51-59.
- 91.** Zahedi A and Khaki A: Recovery effect of zingiber officinale on testis tissue after treatment with gentamicin in rats. *Journal of Medicinal Plant Research* 2014;8(6):288-291
- 92.** Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp.* 2009;24(3):273-281.

- 93.** Sharma P, Singh R. Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;84(4):378-384.
- 94.** Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 2005;223(2):181-190.
- 95.** Kalpana C, Menon VP. Modulatory effects of curcumin on lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(5):581-586.
- 96.** Coşkun G, Özgür H, Doran Ş, Polat S. Ameliorating effects of curcumin on nicotine-induced mice testes. *Turk J Med Sci.* 2016;46(2):549-560. Published 2016 Feb 17.
- 97.** Sakr, S.A., Mahran, H.A., & El-Deeb, M.M. (2013). Ameliorative effect of curcumin on fluoxetine-induced reproductive toxicity and oxidative stress in male albino rats. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 2, 29-35.
- 98.** El-Wakf AM, Elhabiby EM, El-kholy WM. Use of tumeric and curcumin to alleviate adverse reproductive outcomes of water nitrate pollution in male rats. *NatScis* 2011; 7(7): 229-239.
- 99.** Nouri M, Khaki A, Azar FF, Rashidi MR. The protective effects of carrot seed extract on spermatogenesis and cauda epididymal sperm reserves in gentamicin treated rats. *Cell J (Yakhteh)*, 2009, 11(3):327–333.
- 100.** Khaki A, Ghaffari NM, Khaki AA, Fathiazad F, Khabiri M and Hossinchi J: Ultrastructural study of gentamicin and ofloxacin effect on testis tissue in rats: light and transmission electron microscopy. *AJPP* 2009C; 3(4):105-9
- 101.** Timmermans L. Influence of antibiotics on spermatogenesis. *J Urol.* 1974;112(3):348-349.
- 102.** Khaki A. Assessment on the adverse effects of Aminoglycosides and Flouroquinolone on sperm parameters and male reproductive tissue: A systematic review. *Iran J Reprod Med.* 2015;13(3):125-134.
- 103.** Timmermans LM. Modifications in spermatogenesis following antibiotic therapy. *Acta Urologica Belgica.* 1989;57(1):35-46.
- 104.** Jalili, C.; Khani, F.; Salahshoor, M. R. & Roshankhah, S. Protective effect of curcumin against nicotine-induced damage on reproductive parameters in male mice. *Int. J. Morphol.*, 2014: 32(3):844-849

- 105.** Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):85-96.
- 106.** Biyik AF, Yulug E, Yenilmez E, Kutlu A, Alver A, Erdem S. Effects of quercetin on gentamicin-induced experimental testicular injury in rats. *Rom J Morphol Embryol.* 2024;65(1):69-80.
- 107.** Elsayah, H.K.; Kandiel, M.M.; Amin, A.A.; Mokhimar, H.M.; El Mahmoudy, A.M. Gentamicin and amikacin adversely affect male infertility indicated by pharmacological, andrological and pathological evidence. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2020;9,218.
- 108.** Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Curcumin attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Fertil Steril.* 2009;91(1):271-277.
- 109.** Kanter M, Aktas C, Erboga M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(9):1578-1585.
- 110.** Abd-El-Hafez MA, El-Shafee MD, Omar SH, Aburahma AA, Kamar SS. The ameliorative effect of curcumin on cryptorchid and non-cryptorchid testes in induced unilateral cryptorchidism in albino rat: histological evaluation. *Folia Morphol (Warsz).* 2021;80(3):596-604.
- 111.** Mercantepe T, Unal D, Tümkaya L, Yazici ZA. Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med.* 2018;15(4):3404-3412.
- 112.** Abdelhaffez, A.S.; Hussein, O.A.; Rateb, A.; Yousef, M.S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids confer protection against gentamicin-induced testicular injury: Novel insights into possible mechanisms. *J. Physiol. Pathophysiol.* 2019;10, 17–33.
- 113.** Mohamed S, ElHawary N, Mohamed S, et al. Effect of stem cell therapy on gentamicin induced testicular dysfunction in rats. *J Heal Med Inf.* 2017;8(3):1–8.
- 114.** Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod.* 2009;24(7):1717-1725.
- 115.** Elsedawi BF, Hussein Y, Sabry MA, Aziz JA. Effect of fluoxetine on the testes of adult albino rats and the possible protective role of curcumin. *Anat Sci Int.* 2021;96(2):187-196.
- 116.** Mohammed MA, Aboulhoda BE, Mahmoud RH. Vitamin D attenuates gentamicin-induced acute renal damage via prevention of oxidative stress and DNA damage. *Hum Exp Toxicol.* 2019;38(3):321-335.
- 117.** Kolgazi M, Arbak S, Alican I. The effect of alpha-melanocyte stimulating hormone on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2007;27(2):183-188.

- 118.** Oguzturk H, Ciftci O, Aydin M, Timurkaan N, Beytur A, Yilmaz F. Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. *Andrologia*. 2012;44(4):243-249.
- 119.** Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Alabi AF. Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:49-60.
- 120.** Akomolafe SF, Aluko BT. Protective effect of curcumin on fertility in cyclophosphamide exposed rats: Involvement of multiple pathways. *J Food Biochem*. 2020;44(1):e13095.
- 121.** Yilmaz S, Göçmen Y, Tokpınar A, Ateş Ş, Nisari M, Caniklioglu A, Öztekin Ü (September 1, 2020) Effect of Curcumin on Testis in Mice with Ehrlich Ascites Tumor. *New Trends in Medicine Sciences* 1 2 53–58.
- 122.** Hong SH, Park SK, Cho YS, Lee HS, Kim KR, Kim MG, et al. Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. *Hear Res*. 2006 Jan;211(1-2):46-53
- 123.** Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian Journal of Andrology*. 2008 Jan;10(1):134-45.