



T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ORTAK DOKTORA PROGRAMI

SIÇANLARDA PRENATAL DÖNEMDE UYGULANAN
İMATİNİBİN TESTİS GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

ZEHRA TOPAL SUZAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. LEVENT TÜMKAYA

DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2020

ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Zehra TOPAL SUZAN'ın hazırladığı “Sıçanlarda prenatal dönemde uygulanan imatinibin testis gelişimi üzerine etkisi” başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26.10.2020

Prof. Dr. Levent TMKAYA

(Danışman)

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Prof. Dr. Hseyin Avni UYDU

Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE

Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ

Sağlık Bilimleri Enstits'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstit Ynetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hseyin Avni UYDU
Enstit Mdr

BEYAN

Bu tez çalışmasının Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28.09.2020

Zehra TOPAL SUZAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tüm desteğini sağlayan ve yol gösteren saygıdeğer danışman hocam ve Histoloji ve Embriyoloji AD Başkanımız Prof. Dr. Levent TÜMKAYA' ya, Histoloji ve Embriyoloji AD hocalarından değerli yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE' ye, tezimin biyokimyasal analizlerinde tüm desteklerini sağlayan Tıbbi Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU ve değerli dostum Dr. Öğr. Üyesi Mehtap ATAOK hocama, Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL ve anabilim dalı hocaları Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM, Dr. Öğr. Üyesi Hatice Sevim NALKIRAN hocalarıma, Histoloji ve Embriyoloji AD öğretim elemanları olan Arş. Gör. Dr. Hacer SEVİNÇ, Arş. Gör. Dr. Tuğba ÇELİK SAMANCI' ya, Uzm. Dr. Seda ÇINAR' a, Arş. Gör. Burcu DELİBAŞ' a, manevi desteklerini esirmeyen dostum Öğr. Gör. Erva RAKICI, Öğr. Gör. Nebahat AYDOĞAN EJDİR, Öğr. Gör. Sibel KARAKAŞ, Arş. Gör. Eda YILMAZ KUTLU ve Arş. Gör. Esra PINARBAŞ' a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu akademik yolculuğumda bana her zaman sonsuz desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen aileme, eşime ve tezimin her aşamasını benimle yaşayan oğlum Sarp Ali SUZAN' a sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Bu doktora tezini TDK-2017-825 numaralı proje kodu ile Doktora Tez Projesi olarak destekleyen RTEÜ-BAP birimine teşekkür ederim.

Zehra TOPAL SUZAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi	4
2.3. Testis Fizyolojisi	4
2.3.1. Kan-Testis Bariyeri	4
2.3.2. Testosteron	5
2.4. Testis Histolojisi	6
2.4.1. Seminifer Tübül	7
2.4.1.1. Sertoli Hücreleri	8
2.4.1.2. Spermatogonyumlar	9
2.4.1.3. Spermatozitler	9
2.4.1.4. Spermatidler	10
2.4.1.5. Spermin Yapısı	10
2.4.2. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücresi	12
2.4.3. Sperm Morfolojisi, Sayımı ve Makler Kamarası	12
2.5. Histon ve Protamin	13
2.6. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü	15
2.7. C-Kit	16
2.8. İmatinib	17

2.8.1. İmatinibin Etki Mekanizması ve Farmakokinetik Özellikleri	17
2.8.2. İmatinibin Gebelikte Kullanımı	19
2.8.3. İmatinibin Üreme Sistemi Üzerine Etkisi	20
2.9. Oksidatif Stres	20
2.10. Hücresel Redoks Döngüsü	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Deney Hayvanlarının Temini, Barınması ve Bakımı	22
3.2. Çalışmada Oluşturulan Gruplar ve Deneyin Yapılışı	22
3.2.1. Prenatal Dönem	24
3.2.2. Postnatal Dönem	24
3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Numunelerin Toplanması	24
3.4. Histolojik Analizler	25
3.4.1. Tespit Solüsyonlarının Hazırlanması	25
3.4.2. Doku Takibi	25
3.4.3. Kesit Alınması	26
3.4.4. Sperm Numunelerinin Elde Edilmesi ve Sayımı	27
3.4.5. Hematoksilen ve Eozin Boyama	27
3.4.6. İmmünohistokimyasal (İHC) Boyama	29
3.4.7. Terminal deoksinükleotid transferaz dUTP Nik End Labeling (TUNEL) Metodu	31
3.5. Moleküler Analizler	33
3.5.1. mRNA İzolasyonu	33
3.5.2. c-DNA Sentezi	34
3.5.3. Real Time PCR	35
3.6. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler	36
3.6.1. Doku Homojenizasyonu	36
3.6.2. TBARS Tayini	36
3.6.2.1. Deneyin Yapılışı	36
3.6.2.2. Standart Çözeltiler	37
3.6.3. Toplam TiyoL Miktarının Tayini	37
3.6.4. Testosteron Ölçümü	39
3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi	39

4. BULGULAR	40
4.1. Histopatolojik Bulgular	40
4.1.1. Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama Bulguları	40
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	42
4.2.1. Semikantitatif Bulgular	42
4.2.2. Anti-c-kit Antikor Boyama Bulguları	42
4.2.3. Anti-PDGF Antikor Boyama Bulguları	44
4.2.4. Anti-8-OHdG Antikor Boyama Bulguları	46
4.3. TUNEL Analiz Bulguları	48
4.4. Sperm Sayımı Bulguları	50
4.5. Biyokimyasal Analiz Bulguları	50
4.5.1. TBARS Analiz Bulguları	50
4.5.2. Toplam Tiyo Analiz Bulguları	51
4.5.3. Testosteron Analiz Bulguları	52
4.6. Real Time Analiz Bulguları	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR	65
EKLER	77
EK 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Belgesi	78
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Histolojik analizlerde kullanılan kimyasallar	25
Tablo 2.	Doku takibinde kullanılan tespit solüsyonlarının hazırlanması	25
Tablo 3.	Histolojik doku takibi	26
Tablo 4.	Hematoksilen ve eozin boyama prosedürü	28
Tablo 5.	Histopatolojik testis hasarı skörlama (Johnsen sköru)	29
Tablo 6.	İHC boyama prosedürü	30
Tablo 7.	İmmunohistokimyasal pozitivite derecelendirme metodu	31
Tablo 8.	TUNEL boyama prosedürü	31
Tablo 9.	cDNA sentezinde kullanılan malzemeler	34
Tablo 10.	Real-Time PCR reaksiyonunda kullanılan karışımı ve miktarları	35
Tablo 11.	Real Time PCR sıcaklık koşulları	36
Tablo 12.	Johnsen skörlama bulguları	40
Tablo 13.	Semikantitatif bulgu sonuçları	42
Tablo 14.	Toplam sperm sayısı bulguları	50
Tablo 15.	TBARS testis dokusu ve serum analiz bulguları	51
Tablo 16.	Toplam tiyol testis dokusu ve serum analiz bulguları	52
Tablo 17.	Testosteron analiz bulguları	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Erkek üreme sisteminin komponentlerini gösteren şematik diyagram	6
Şekil 2.	İnsan testisinin sagittal kesiti	7
Şekil 3.	İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi	8
Şekil 4.	İnsan spermatozoonun diyagramı	11
Şekil 5.	İmatinibin kimyasal yapısı	18
Şekil 6.	Doku ve serum TBARS standart grafiği	37
Şekil 7.	Doku toplam tiyol tayini standart grafiği	38
Şekil 8.	Serum toplam tiyol tayini standart grafiği	38
Şekil 9.	Kontrol ve İmatinib-20, İmatinib-40, İmatinib-60 gruplarının testis dokularındaki protamin (PRM1) ekspresyonu.	53
Şekil 10.	Kontrol ve İmatinib-20, İmatinib-40, İmatinib-60 gruplarının testis dokularındaki histon (sHist1A1) ekspresyonu	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Östrus evresindeki epitel hücrelerin görünümü.	23
Resim 2.	Koitus sonrası smear testiyle belirlenen sperm ve epitel hücreleri.	23
Resim 3.	H&E ile boyanmış testis dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.	41
Resim 4.	İHC yöntemi ile c-kit primer antikoruna uygulanmış testis dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.	43
Resim 5.	İHC yöntemi ile PDGF primer antikoruna uygulanmış testis dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.	45
Resim 6.	İHC yöntemi ile 8-OHdG primer antikoruna uygulanmış testis dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.	47
Resim 7.	Testis dokusuna ait kesitlerinde apoptotik hücreler belirlemek için kullanılan TUNEL yönteminin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.	49

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AD	Anabilim Dalı
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
CYP	Sitokrom
c-DNA	Tamamlayıcı DNA
DHT	Dihidrotestosteron
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dT	Deoksitidil
DTNB	Ditiyobis 2 nitrobenzoik asit
FSH	Folikül Stimüle edici Hormon
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GGSG	Oksitlenmiş glutatyon
GİST	Gastrointestinal Tümör
GSH	İndirgenmiş glutatyon
H&E	Hematoksilen ve Eozin
İHC	İmmünohistokimyasal boyama
i.p.	İntraperitoneal
KL	Kit Ligandı
KML	Kronik Myeloid Lösemi
MDA	Malondialdehid
MIF	Müller-İnhibe edici Faktör
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
TKİ	Triozin Kinaz İnhibitörü
n	Haploid kromozom
p	Hata katsayısı
PBS	Fosfat Buffer Solüsyonu
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PDGFR	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PDGFR-α	PDGF reseptörü- α
PDGFR-β	PDGF reseptörü- β
pH	Hidrojenin iyonik gücü
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RTEÜ	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
rPCR	Real time Polymerase Chain Reaction
SCF	Kök Hücre Faktörü
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TBA	Tiobarbitürik asit
TBARS	Thiobarbituric acide reactive substance
TdT	Terminal deoksinükleotidil Transferaz
TUNEL	Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
2n	Diploid kromozom
4n	Tetraploid kromozom
8-OHdG	8-Hidroksideoguanozin

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
°C	Santigrad derece
dk	Dakika
g	Gravity
gr	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
pg	Pikogram
sa	Saat

sn	Saniye
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
&	Ve

Formüller

K^{+}	Potasyum
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
-SH	Sülfiril grubu
Na_2HPO_4	Sodyum Monohidrojen Fosfat

ÖZET

Sıçanlarda Prenatal Dönemde Uygulanan İmatinibin Testis Gelişimi Üzerine Etkisi

Sıçanlarda prenatal dönemde imatinibe maruziyetin testis gelişimi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda kullanılan 15 adet Sprague Dawley cinsi gebe sıçanlar 5 gruba ayrıldı; kontrol grubu, prenatal 1-8. Günlerde imatinib uygulanan İmatinib-20 (20 mg/kg), İmatinib-40 (40 mg/kg), İmatinib-60 (60 mg/kg) ve İmatinib-80 (80 mg/kg) grupları olarak belirlendi. Tüm çalışma gruplarına doğum öncesi 1-8. günlerde intraperitoneal imatinib verildiğinde gebelik devam etmesine rağmen, İmatinib-80 grubunda gebeliğin devam etmediği görüldü. Postnatal 60. günde yavru erkek sıçanlar sakrifiye edildi. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için testis dokusu alınarak tespit solüsyonlarında takip edildi, ince kesitler alınarak boyamalar yapıldı ve uygun alanlar fotoğraflanarak değerlendirildi. Epididimal sıvıda sperm sayımı yapıldı. Biyokimyasal analizlerde kullanılan serum ve testis örnekleri uygun koşullarda muhafaza edildi ve moleküler analizlerde doku örneklerinden mRNA izole edildi. Tüm istatistiksel veriler değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analizler TUNEL, anti-8-OHdG, anti-c-kit ve anti-PDGF boyaması pozitiflik skorlaması açısından gruplar arasında fark olmadığını gösterdi. İmatinib-20 grubunda kontrol grubuna göre toplam sperm sayısında anlamlı azalma tespit edilirken ($p=0,001$), İmatinib-60 grubunda sperm sayısı İmatinib-20 grubuna göre daha yüksekti ($p=0,01$). TBARS seviyesinin ölçümlerinde ilaç İmatinib-20 grubunda testis ($p=0,014$) ve serumda ($p=0,003$) oksidatif stresi artırırken, İmatinib-60 grubunda dokuda azalmaya neden oldu ($p=0,027$). Tiyol ölçümleri İmatinib-60 grubunda testis ($p=0,080$) ve serumda ($p=0,000$) azalma olduğunu gösterirken, İmatinib-40 grubunda serum ölçümlerinde artış gözlemlendi ($p=0,005$). Testosteron seviyesi ölçümlerinde kontrol grubuna kıyasla İmatinib-20 grubu ($p=0,039$) ve İmatinib-60 gruplarında ($p=0,007$) anlamlı bir artış görülürken, İmatinib-40 grubundaki azalma anlamlı değildi. Moleküler düzeydeki analizler, testis dokusunda protamin ve histon ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığını ortaya koydu. Sonuç olarak, imatinibe prenatal dönemde maruziyetin testis dokusunda histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açabileceğini, ancak spermiogenez sırasında germ hücrelerinin nükleer olgunlaşmasında olumsuz bir etki olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İmatinib, C-kit, PDGF, testis, TUNEL, sıçan

ABSTRACT

The effect of imatinib administered in the prenatal period on testis development in rats

It was aimed to investigate the effects of imatinib exposure on testicular development during prenatal period in rats. Fifteen pregnant Sprague Dawley rats used in our study were divided into 5 groups; control group, prenatal 1-8. Imatinib-20 (20 mg/kg), Imatinib-40 (40 mg/kg), Imatinib-60 (60 mg/kg) and Imatinib-80 (80 mg/kg) groups were defined as imatinib on days. Prenatal 1-8. Although pregnancy continued when imatinib was given intraperitoneally on days, it was observed that the pregnancy did not continue in the imatinib-80 group. On the postnatal 60th day, young male rats were sacrificed. For histopathological and immunohistochemical analysis, testicular tissue was taken and followed in fixation solutions, staining was done by taking thin sections, and appropriate areas were photographed and evaluated. Sperm count was made in epididymal fluid. Serum and testis samples used in biochemical analysis were kept under suitable conditions and mRNA was isolated from tissue samples in molecular analyzes. All statistical data were evaluated. Immunohistochemical analysis, TUNEL, c-kit and PDGF staining revealed no difference between the groups in terms of positivity scoring. A significant decrease was detected in total sperm counts in the Imatinib-20 group compared to the control group ($p = 0,001$), but the sperm count was higher in the Imatinib-60 group than in the Imatinib-20 group ($p = 0,01$). In the measurement of TBARS level, the drug in the Imatinib-20 group increased oxidative stress in the testis ($p = 0.014$) and serum ($p = 0.003$), while in the Imatinib-60 group it caused a decrease in tissue ($p = 0.027$). Thiol measurements revealed a decrease in the testis ($p = 0,080$) and serum ($p = 0.000$) in the Imatinib-60 group, while an increase in serum measurements was observed in the Imatinib-40 group ($p = 0.005$). Testosterone level measurements were significantly increased in Imatinib-20 group ($p = 0.039$) and Imatinib-60 groups ($p = 0.007$) compared to the control group, while the decrease in Imatinib-40 group was not significant. Molecular-level analyzes revealed that there was no statistically significant difference between the groups in terms of protamine and histone expression levels in testicular tissue. In conclusion, it has been shown that exposure to imatinib during prenatal period may cause histopathological and biochemical changes in testicular tissue, but there is no negative effect on nuclear maturation of germ cells during spermiogenesis.

Keywords: Imatinib, C-kit, PDGF, testis, TUNEL, rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML) hastalığının yıllık insidansının yüzbinde 1.5 vaka olduğu bildirilmektedir (Vishal vd., 2020). Gebelik esnasında da KML hastalığının görülme sıklığının yüzbinde 0.6-2 olduğu belirtilmektedir (Pallavee vd., 2019). Buna rağmen üreme çağındaki birçok KML hastası çocuk sahibi olmak istemektedir (Apperley, 2009). Bu durum da üreme çağında tedavi gören kadınların gebelik döneminde ilaç kullanımının fetüs üzerinde teratojenik etkilere neden olabileceği endişesini artırmaktadır (Pallavee vd., 2019). KML ve gastrointestinal tümörlerin (GİST) tedavisinde kullanılan imatinib, trioizin kinaz (TKİ) inhibitörüdür, c-kit ve platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptör (PDGFR) kinazlarını hedef almaktadır (Iqbal ve Iqbal, 2014; Iram vd., 2016).

C-kit ligandı olan kök hücre faktörü (SCF) çok sayıda sinyal yolağını etkin hale getirerek kemotaksi, proliferasyon, diferensiasyon ve hayatta kalım gibi olaylarda görev almaktadır (Rönstrand, 2004). Manova ve Bachvarova (1991) c-kit 'in primordial germ hücrelerinde ve germ hücrelerinin göç yolu boyunca bazı hücrelerden eksprese edildiğini, bunun yanında göç esnasında hücrelerin seçilmesi ve muhafaza edilmesinde rol oynayarak bir yön işareti sağlayabileceğini bildirmektedirler (Manova ve Bachvarova, 1991). SCF/c-kit sistemi hem sağlıklı hemde onkolojik koşullarda erkek ve dişi üreme sisteminde eksprese edilerek sağ kalım ve apoptoza etki etmektedir (Figueira vd., 2017).

Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve ligandlarının hem fetal testiste hem de yetişkin testiste salgılandığı bilinmektedir (Basciani vd., 2002). Gnessi vd. (2000) yaptığı çalışmada PDGF-A'nın yetişkin Leydig hücrelerinin gelişiminde görev aldığını ve bu hücrelerde PDGFR- α projenitörlerinden köken aldığını bildirmiştir (Gnessi vd., 2000). Erken postnatal dönemde de PDGF'nin reseptörü olan PDGFR- β 'nın germ hücrelerinin gelişim yollarında önemli rol oynadığı literatürde gösterilmektedir (Basciani 2008). Sadece testiste değil aynı zamanda epididimisin gelişiminin evrelerinde PDGF'lerin rol oynadığı bildirilmektedir (Basciani vd., 2004).

İmatinibin BCL-ABL, PDGF, c-kit TKİ olduğu ve bu reseptörlerin hem dişi hemde erkek üreme sisteminde görev aldığı bilinmektedir (Carlier vd., 2017). Adölesan hastalarda iki yıl boyunca uygulanan imatinibin testis fonksiyonlarında bir bozulmaya neden olmadığı bildirilmiş, çalışmanın juvenil ratlarda uygulamasının TKİ' lerinin yine inhibisyon etkisi göstermediğini tespit edilmiştir (Tauer vd., 2014). Chang vd. (2017) imatinib ile tedavi edilen erkek KML hastalarının semeninde, plazma değerlerine benzer miktarda imatinib

bulunduğunu bunun sonucunda imatinibin kan-testis bariyerini aştığını söylemişlerdir; buna rağmen üreme organlarının yapısında ve testosteron gibi üreme hormonlarının seviyesinde bir değişime neden olmadığını tespit etmişlerdir (Chang vd., 2017). Bununla birlikte prepubertal dönemde imatinibe başlayan çocuklar puberte dönemine geldiklerinde yaşıtlarına göre boy bakımından büyümede geride kaldıkları fakat postpubertal dönemde ise büyümeyi yakaladıkları tespit edilmiştir (Boddu vd., 2019).

Literatürde imatinibin erkek üreme sistemi üzerinde yapılan çalışmalardaki etkileri yer alırken, prenatal dönemde imatinib maruziyetinin testis dokusundaki etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamız prenatal dönemde imatinibe maruz kalan sıçanların testis dokusu üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyetini, ovumun döllemesinde rol oynayan spermin taşıdığı seks kromozomu belirlemesine rağmen intrauterin dönemin 7. haftasına kadar dişi ve erkek üreme sisteminde morfolojik bir değişiklik görülmemektedir. Her iki üreme sisteminin gelişimi mezodermal epitel ve bu epitelin altında bulunan embriyonik bir bağ dokusu olan mezenşimden köken almaktadır. Bu epitel ve mezenşim çoğalıp kalınlaşarak gonadal (genital) kabartıları (sırt) meydana getirmektedir. Gonadal kabartının epiteli çoğalarak primitif seks kordonları adı verilen yapıları oluşturmaktadır. Gonadal kabartı korteks ve medulla olarak iki kısımdan meydana gelmektedir. Seks kordonlarının içerisine 6. haftada, yolk kesesinde bulunan endodermal kökenli primordial germ hücreleri göç ederler ve burda bulunan mezenşim içerisine yerleşirler. Embriyodaki üreme sisteminin bu evreye kadar olan gelişimi erkek ve dişide fark göstermediğinden bu evredeki gonad, farklanmamış gonad olarak isimlendirilmektedir (Moore ve Persaud, 2002; Sadler, 2005; Moore ve Persaud, 2009).

Eğer embriyo XY seks kromozomlarını bulunduruyor ise embriyonun cinsiyeti erkektir. Y kromozomu üzerinde yer alan SRY geni, testis belirleyici faktörünü (TDF) bulundurmaktadır. TDF, farklanmamış gonadın testis yönünde büyüyüp gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörün varlığında primitif seks kordonları farklanmamış gonadın medullasının iç kısımlarına kadar büyümeye başlamaktadır. İleri evrede bu kordonlar, medullanın derinliklerinde bir araya gelerek anastomozlaşırlar ve rete testisi meydana getirirler. Fibröz bağ dokusundan oluşan tunika albugineanın gelişimiyle primitif seks kordonlarının yüzey epiteliyle olan ilişkisi kaybolmaktadır. Tunika albuginea ile çevrili olan testis gelişiminin devamında mezoörşiyum adı verilen mezenter yapısı ile asılı durmaktadır. Primitif seks kordonları seminifer tübül, tübüli rekti ve rete testis olarak farklanmaktadır. Seminifer tübüllerin içerisinde germ hücreleri haricinde, yüzey epitelinden gelişen ve Müller-inhibe edici faktör (MIF) salgılayan Sertoli hücreleri adı verilen hücreler de yer almaktadır (Moore ve Persaud, 2002; Sadler, 2005; Moore ve Persaud, 2009; Dudek, 2016).

Seminifer tübüllerin oluşumundan sonra gonadal kabartının mezenşiminde Leydig (intersitisyel) hücreleri olarak bilinen hücreler görülmektedir. Leydig hücreleri gelişimin 8. haftasından itibaren testosteron adı verilen hormonu üretmeye başlamaktadır ve bu hormon

üreme kanalları ve dış genital organların gelişiminde doğrudan rol almaktadır (Moore ve Persaud, 2002; Sadler, 2005).

Puberte evresine kadar seminifer tübül içerisinde germ hücresi olarak sadece spermatogonyum bulunurken, bunun yanında tübülde mezenşimal kökenli Sertoli hücresi de bulunmaktadır ve tübül içerisinde lümen görülmemektedir. Rete testis, mezonefrik tübüllerden oluşan duktuli efferentes ile birleşmektedir. Bu kanallar epididimisi de oluşturan mezonefrik duktus ile de bağlantılıdır (Moore ve Persaud, 2002; Sadler, 2005; Moore ve Persaud, 2009).

2.2. Testis Anatomisi

Testisler, vücut boşluğunun dışında, skrotum adı verilen bir kesenin içerisinde yer almaktadırlar. Skrotum kesesi, testis ve *funiculus spermaticus*' un alt parçasını da içeren deriyle çevrili fibromüsküler bir kese yapısındadır (Sancak ve Cumhuriyet, 2004; Ross, 2011).

Testis bir çift halde bulunur ve erkek üreme hücrelerinin üretildiği organ olarak bilinmekte, şekli elips biçiminde ve skrotum kesesinde oblik yönelimli olarak bulunmaktadır. Testisi çevreleyen tunika vaginalis; visseral yaprak (*lamina visceralis*) ve pariyetal yaprak (*lamina parietalis*) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Visseral yaprak testisin ön yüzünü ve her iki yüzünü kaplarken, pariyetal yaprak arka kenarın medial ve lateral kısmında kendi üstünde kıvrılarak devam ettiği bilinmektedir (Sancak ve Cumhuriyet, 2004). Testis, rete testisin olduğu kısımda kalınlaşarak mediastinum testis yapısını oluşturan tunika albuginea adı verilen kalın ve fibröz bir tabakayla çevrelenmektedir (Kierszenbaum, 2006; Sancak ve Cumhuriyet, 2004). Bu tabakanın iç yüzeyini kaplayan bir damar ağı yapısında tunika vasküloza bulunmaktadır. Testis, aorta abdominalisin dalı olan sağ ve sol arteria testicularis, küçük venlerin birleşerek oluşturduğu venöz ağı oluşan plexus pampiniformis ve lenfatiklerden oluşan bir damar sistemiyle kanlanmaktadır (Sancak ve Cumhuriyet, 2004).

2.3. Testis Fizyolojisi

2.3.1. Kan-Testis Bariyeri

Seminifer tübüllerde yer alan Sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturan ana komponentlerdir. Bu hücrelerin bazal laminası arasında yer alan sıkı bağlantı kompleksleri bu bariyeri oluşturmaktadır (Barret vd., 2015). Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksleri, seminifer tübülü bazal ve adluminal olmak üzere iki kompartımana

bölmektedir (Kierszenbaum, 2006). Dolayısıyla bu bariyer hücrelerarası dokudan gelen büyük moleküllerin bazal kompartmandan, adluminal kompartmana ve tübül lümenine geçişini engellemektedir (Barret vd., 2015). Bu engelleme, tübül içerisinde bulunan spermatosit ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan, plazma proteinlerinden ve dolaşımdaki antikorlardan korumaktadır (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011). Ayrıca kan-testis bariyerinin yapısı epitelin iyon, aminoasit, karbohidrat ve protein yapısı bakımından fizyolojik bir kompartman oluşması açısından oldukça gereklidir. Bu yüzden tübül lümeni ve devamındaki boşaltım kanallarındaki sıvının yapısı testisteki lenften ve kan plazmasından farklılık göstermektedir (Ross, 2011). Fakat kan-testis bariyerinden steroidlerin ve bazı proteinlerin geçebildiği bilinmektedir. Lümen sıvısında az miktarda protein ve glukoz bulunurken, çok miktarda androjen, östrojen, K^+ , inozitol glumatik ve aspartik asit içerdiği bilinmektedir (Barret vd., 2015). Tübül içerisine giren androjenler, Sertoli hücrelerindeki androjen bağlayıcı proteinler (ABP) sayesinde testosteronun lümen içerisine girişine izin verilmektedir (Ross, 2011). Sertoli hücrelerinden sentezlenen inhibin hormonu, folikül sitümüle edici hormon (FSH)'ın salgısını baskılamaktadır. Bu olayın tam tersine aktivin hormonu ise FSH'ın salgılanmasını uyarmaktadır (Barret vd., 2015).

2.3.2. Testosteron

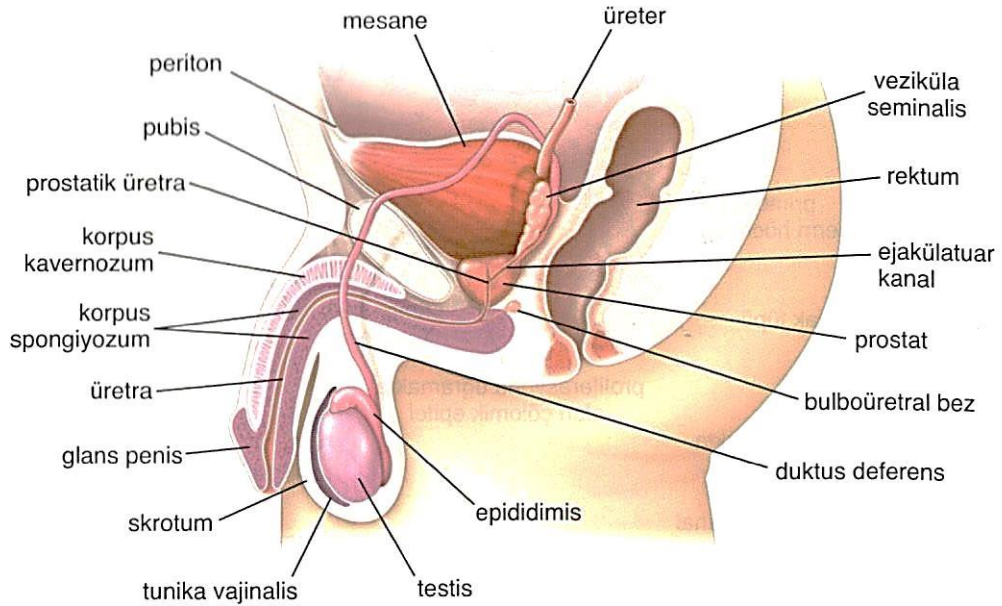
Testiste üretilen başlıca hormonlardan biri testosterondur. Testosteron, 19 karbon içermektedir ve intersitisyel alanda bulunan Leydig hücrelerindeki kolesterolden üretilmektedir. Plazmada bulunan testosteronun büyük bir kısmı proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır; %65'i gonadal steroid-bağlayıcı globulin (seks steroidi-bağlayıcı globulin) olarak bilinen bir β -globuline, %33'ü ise albumine bağlandığı bildirilmektedir (Barret vd., 2015). Testosteronun büyük bir kısmı hedef organlarda (prostat bezi, erkek fetusta dış genital organlar) dihidrotestosterona (DHT) dönüştüğü bilinmektedir. Vucüt içerisindeki testosteronun dokularda fiks olmayan kısmı karaciğer tarafından androsteron ve dehidroepiandrosterona dönüştürülerek, glukuronidler veya sülfatlarla bağlı hale getirildiği ve safra içinde sindirim kanalıyla ya da idrarla böbreklerden atıldığı belirtilmektedir (Guyton ve Hall, 2007).

Embriyolojik dönemde testosteron-reseptör kompleksi, Wolf kanalının ve erkek iç üreme organlarının oluşmasında gerekli olurken; dış erkek üreme organlarının oluşması için de DHT-reseptör komplekslerinin gerekli olduğu bilinmektedir. Ayrıca DHT-reseptör kompleksi ergenlik çağında erkeklerde kıllanma, saç yapısındaki temporal gerileme,

prostat ve penisin büyümesinde de rol aldığı bildirilmektedir (Barret vd., 2015). Testosteron erkek vücudundaki kılların büyümesi ve dağılımı, ses kalınlaşması, deri kalınlığının artması ve sivilce oluşumu, protein içeriğinin ve kas gelişiminin artırılması, kemiklerin büyümesi ve kalsiyumun depolanmasının artışı, bazal metabolizma hızının yükselmesi gibi birçok metabolik aktivitede önemli rol oynamaktadır (Guyton ve Hall, 2007).

2.4. Testis Histolojisi

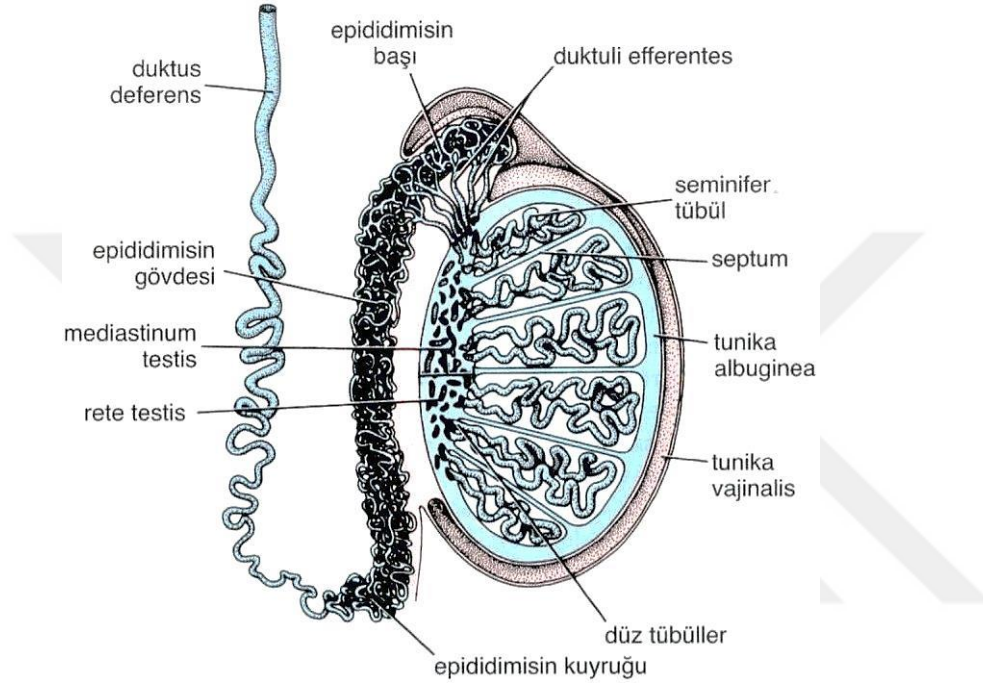
Testisler, vücut boşluğunun dışında bulunan skrotum kesesi adı verilen yapının içerisinde bulunmaktadır. Skrotum kesesi, testis sıcaklığının, vücut ısısından 2-3°C daha düşük olmasını sağlamaktadır. Vücut ısısından daha düşük olan bu sıcaklık farkı spermatogenezin devamı açısından oldukça önemlidir (Eroschenko, 2011; Kierszenbaum, 2006). Testisler bu kese içerisinde spermatik kordon adı verilen kordon ile asılı halde bulunmaktadır, bu kordon spermatik arter, ven, vaz deferens ve lenfatikleri içermektedir (Kierszenbaum, 2006; Junqueira ve Carniero, 2003).



Şekil 1. Erkek üreme sisteminin komponentlerini gösteren şematik diyagram (Ross, 2011).

Organı dış kısmından sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea adı verilen kapsül sarmaktadır; tunika albugineanın iç kısmında kan damarlarından oluşan, bağ dokusu

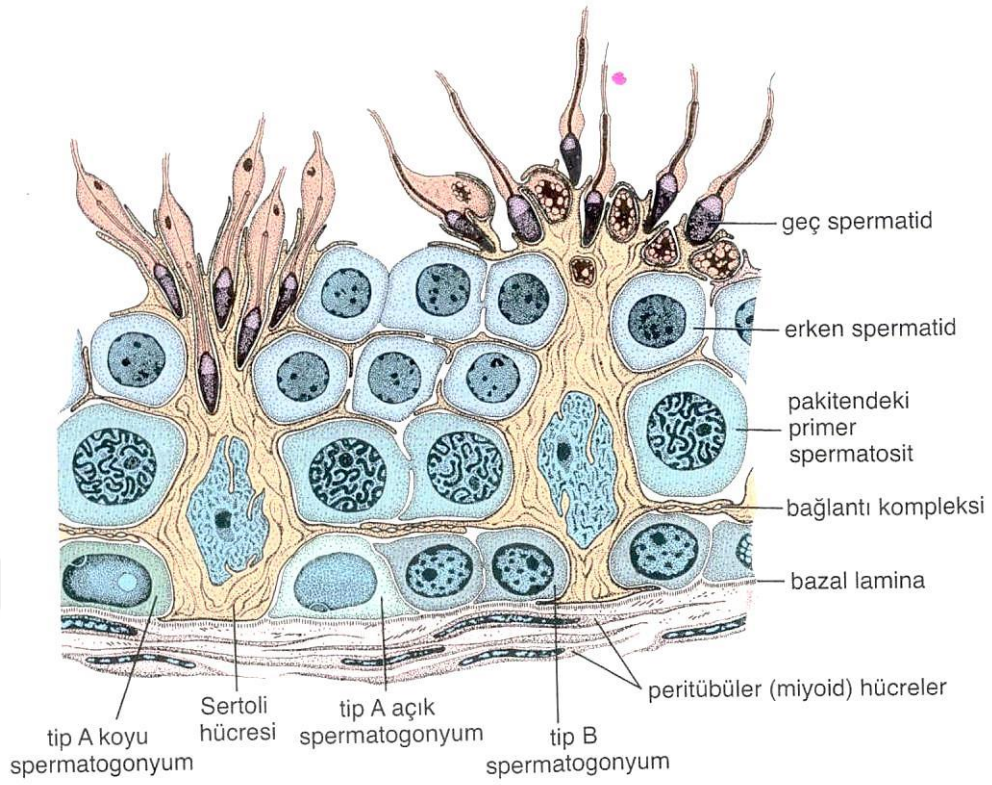
yapısında tunika vasküloza yer almaktadır (Ross, 2011). Kapsül yapısı testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir; buradan çıkan bağ dokusunun oluşturduğu septumlar (bölme) testisi yaklaşık 250 lobüle ayırmaktadır. Her bir lobülde 1 ila 4 adet seminifer tübül bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2006; Junqueira ve Carniero 2003; Eroschenko, 2011; Ross, 2011) .



Şekil 2. İnsan testisinin sagittal kesiti (Ross, 2011).

2.4.1. Seminifer Tübül

Seminifer tübülün epiteli, spermatogenezde görevli germ hücreleri ve desteklik sağlayan Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011). Ayrıca tübülü saran bir bazal membran, kasılabilir özellikteki myoid hücresi, peritübüler bağ dokusu olarak bilinen lamina propria ve kollajen lifler de seminifer tübülün yapısında yer almaktadır (Ross, 2011).



Şekil 3. İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi (Ross, 2011).

2.4.1.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, spermatogonyumların arasında yer alan prizmatik şekilli hücrelerdir ve tübülün bazalinden lümenine kadar ulaşan uzantılara sahiptirler (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011). Sertoli hücresinin çekirdeği heterokromatin görünümündedir ve sitoplazmasında çok sayıda düz endoplazmik retikulum, mitokondri, gelişmiş Golgi aygıtı ve granüllü endoplazmik retikulum görülmektedir (Junqueira ve Carniero 2003; Kierszenbaum 2006). Ayrıca sitoplazmasında inklüzyon cisimcikleri de denilen Charcot-Böttcher cisimcikleri de bulunmaktadır ve bu cisimciklerin görevleri henüz tam olarak bilinmemektedir (Ross, 2011).

Bazal laminada yer alan bu hücreler arasında zonula okludenslerin oluşturduğu sıkı bağlantı komplekslerinin olduğu bilinmektedir. Bu sıkı bağlantılar seminifer tübülün epitelini adluminal ve bazal kompartıman olmak üzere iki kısma ayırmaktadır ve kan-testis bariyeri oluşturarak kandaki immün sistem elemanlarından germ hücrelerini korumaktadır (Junqueira ve Carniero, 2003; Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011). Bazal kompartımanda spermatogonyumlar bulunmakta, adluminal kompartımanda ise

spermatositler, spermatidler ve sperm hücreleri yer almaktadır (Junqueira ve Carniero, 2003).

Bunların yanı sıra Sertoli hücrelerinin germ hücrelerine desteklik sağlaması, residüel cisimcik gibi yapıların fagosite edilmesi, testosteron ve DHT gibi hormonları ABP aracılığıyla lümen içerisine alımı, MIF ve inhibin üretimi görevleri arasındadır (Junqueira ve Carniero, 2003; Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011).

2.4.1.2. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar tübülün bazalinde yer alan spermatogonyal kök hücrelerden oluşmaktadırlar. Bu hücreler insan dokusuna ait preparatlarda tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum olmak üzere iki çeşit hücre olarak görülmektedir (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011).

Tip A spermatogonyumlar, çekirdek görünümüne göre tip A koyu ve tip A açık olarak sınıflandırılmaktadır. Tip A koyu spermatogonyumların, kök hücre işlevinde olduğu ve bölünerek tip A açık spermatogonyumları meydana getirdiği belirtilmektedir. Tip B spermatogonyumlar, tip A spermatogonyumlardan oluşmaktadır ve mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatositleri üretmektedirler (Ross, 2011).

2.4.1.3. Spermatositler

Spermatogonyumlardan meydana gelen primer spermatositler 44+XY kromozom sayısına sahiptir. Mayoz bölünme öncesi DNA'sını iki katına çıkararak 4n DNA miktarına ulaşmaktadır. Primer spermatosit birinci mayoz bölünme sonucu iki adet sekonder spermatositi meydana getirmektedir. Bu bölünme sonucunda sekonder spermatositin DNA miktarı 2n'e düşmektedir. Sekonder spermatositte hızlı bir şekilde ikinci mayoz bölünme geçirerek n (haploid) sayıda genetik materyal içeren 2 adet spermatidi meydana getirmektedir (Junqueira ve Carniero, 2003).

Bu bölünme evreleri arasında dört kromatid yapısında yani tetrad yapıda görülen homolog kromozom çiftleri arasında genetik materyalin değişimi gerçekleşmektedir. Bu olaya crossing-over denilmektedir ve bu olay sonucu meydana gelen spermatidler genetik açıdan birbirlerinden farklılık göstermektedirler (Ross, 2011).

2.4.1.4. Spermatidler

Bu evredeki germ hücreleri 22+X veya 22+Y kromozoma sahip haploid spermatidlerdir ve başka bölünme geçirmezler. Spermatidler, sperm hücrelerine dönüşmek için bir dizi farklılaşma evrelerinden geçmektedirler (Ross, 2011). Bu evrelerden ilki oluşan spermatidlerin sitoplazmasındaki çok sayıda proakrozomal granüllerin Golgi aygıtında toplanmasıyla görülmektedir. Daha sonra bu granüller tek bir vezikül haline gelerek akrozomal vezikülü meydana getirmektedir. Bu vezikülün oluşumu aynı zamanda spermin kutbunu da belirlemektedir. Bu evrede sentriyoller akrozomun karşısına göç ederek plazma membranına yakın bölgede konumlanırlar, bu evreye Golgi fazı denilmektedir. Sentriyollerin yerleşimiyle kuyruk yapısında yer alan (9+2) mikrotübül şeklindeki aksoneminde oluşumu başlatılmaktadır (Ross, 2011; Junqueira ve Carniero, 2003). Daha sonra oluşan vezikül, nükleusun ön kısmına konumlanarak, bir kep şekli alır, bu evreye kep fazı adı verilmiştir (Ross, 2011).

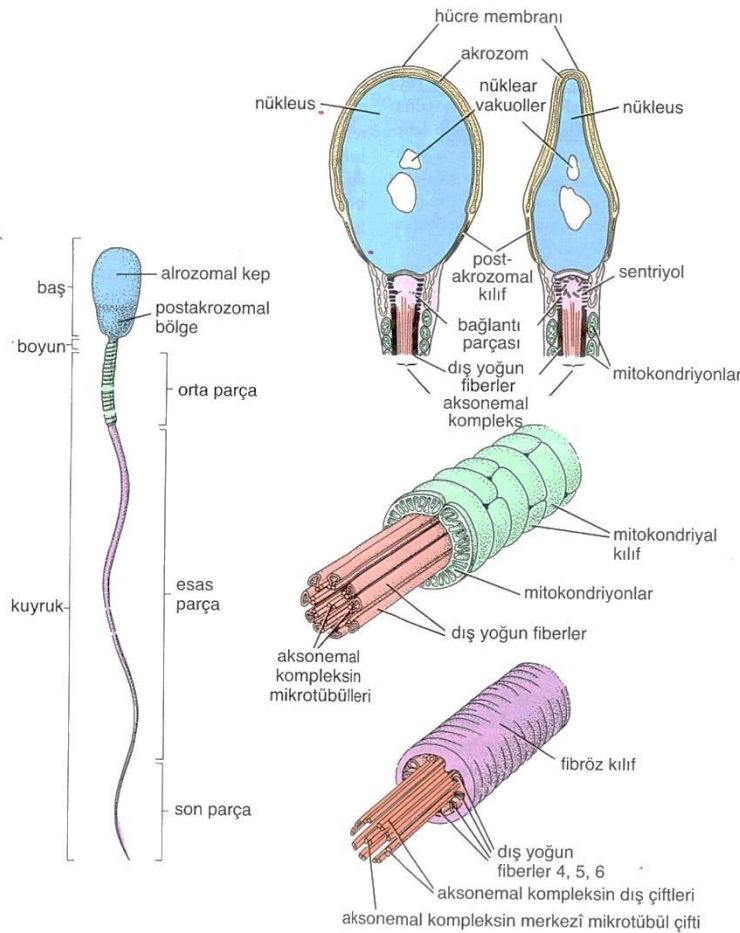
Sonraki evre akrozom fazı olarak bilinmektedir, bu faz da spermatidin nükleusu yoğunlaşır, şekli yassı hale gelmektedir. Akrozom nükleusu sarmaya devam etmektedir ve arka kısmından uzanan yapı manşeti oluşturmaktadır. Aksonem düzleminde mitokondrilerin göçü de bu fazda izlenmektedir. Flagellum olarak sperm kuyruğu büyümeye devam etmektedir, aksonemin 9+2 mikrotübül yapısı kuyruk içerisine doğru uzamaktadır. Mitokondriler boyun kısmına doğru yerleşmektedir. Kuyruk yapısının orta parçası, esas parçası ve son parçası da oluşmaya başlamaktadır (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011).

Son evre olan olgunlaşma (maturasyon) evresinde, kuyruktaki sitoplazma artıklarını Sertoli hücreleri fagosite etmektedir. Olgun spermler, Sertoli hücresi ve spermatid bağlantılarının ortadan kalkmasıyla lümene bırakılırlar, bu olaya spermiyasyon adı verilmektedir (Junqueira ve Carniero, 2003; Ross, 2011).

2.4.1.5. Spermin Yapısı

Olgun (matür) bir sperm yapısında baş kısmı, kuyruk kısmı ve baş ile kuyruğu birbirine bağlayan bir bağlantı parçasından (boyun) meydana gelmektedir. Spermin baş kısmında nükleusu saran akrozom bulunmaktadır. Akrozom spermin, korona radyata ve zona pellusida yapılarını eritebilir özellikte çok sayıda enzim içermektedir. Bu enzimler; hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz, akrozin ve tripsin enzimine benzer proteaz gibi enzimlerdir (Junqueira ve Carniero, 2003; Ross, 2011).

Bağlantı parçası diğer bir adıyla boyun dar bir kısmı temsil eder ve bu kısımda bir çift sentriyol bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2006). Kuyruk ise orta parça, esas parça ve son parçadan oluşmaktadır. Kuyruğun orta parçasında spermin hareketi için gerekli enerjiyi sağlayan mitokondriler sarmal şekilde sarılmıştır. Bu sarmal yapısı içerisinde (9+2) mikrotübül yapısı içeren aksonem ve kuyruk boyunca longitudinal olarak uzanan dokuz adet kolon yapısı gösteren dış yoğun liflerde bulunmaktadır. Bu mitokondriyal sarmalın son parçası annulus olarak isimlendirilmektedir ve orta parça bu kısımla sonlanmaktadır (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011). Esas parça ise aksonem ve yedi yoğun lif tarafından sarılmakta ve fibröz kılıf bulunmaktadır. Yedi yoğun lif ve fibröz kılıf, sperm hareketine de olanak sağlayan keratin proteinini içermektedir. Kuyruğun son parçası, sadece aksonemi bulunduran kısa bir parçadır (Kierszenbaum, 2006).



Şekil 4. İnsan spermatozoonun diyagramı (Ross, 2011).

Seminifer tübüllerde oluşan ve lümene bırakılan sperm hücreleri hareket kazanabilmeleri için epididimise ileilmektedir. Burada spermler hareket yeteneğini kazanmalarının yanı sıra ileri maturasyon özelliklerini de gösterirler (Ross, 2011).

2.4.2. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücresi

Seminifer tübüller arasında kalan, içerisinde bağ dokusu hücreleri, Leydig hücreleri, kan ve lenf damarlarını da kapsayan bölgeye intersitisyel doku denilmektedir (Junqueira ve Carniero, 2003). Bu alanda bulunan Leydig hücreleri, büyük poligonal şekillidir ve sitoplazmaları eozinofilik boyanmaktadır. Leydig hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıkları, lipofuksin pigmenti ve Reinke kristalleri olarak adlandırılan çubuk şeklindeki yapılar izlenmektedir. Steroid salgılayan hücrelerin tipik özelliği de olan düz tübüler kristalı mitokondriler ve çok gelişmiş düz endoplazmik retikulum Leydig hücrelerinde de görülmektedir (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011).

Leydig hücreleri, hem embriyoda hem de postnatal hayatta testosteron hormonunu salgılamaktadır. Bu hormon erkek üreme sisteminin gelişimi ve devamlılığı açısından hayati öneme sahiptir. Embriyoda gonadların gelişimi, pubertede sperm üretiminin başlatılması, ikincil seks özelliklerinin kazandırılması ve üreme sistemine ait bezlerin gelişiminde rol almaktadır. İnsanların yetişkinlik döneminde, spermatogenez ve testosteron hormonunun salgılanmasının devamlılığı açısından da Leydig hücresi önemli işleve sahiptir (Ross, 2011).

2.4.3. Sperm Morfolojisi, Sayımı ve Makler Kamarası

Dünya Sağlık  rg t  (DSÖ) (2010)' a göre insan sperminin morfolojisinin normal olarak değerlendirilmesinde baş ve kuyruğun normal yapıda görülmesi gerekmektedir. Spermin baş kısmı şeklinin normal oval görünümde olması ve akrozomonun sperm başının yaklaşık %40 ila 70'ini kaplamasının normal değerlerde olduğu belirtilmektedir. Akrozom bölgesinde büyük veya ikiden fazla küçük vakuol içermemesi ve bu vakuollerin sperm başının 1/5'inden fazla yer kaplamaması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca kuyruk bölgesinin orta parçasında aşırı miktarlarda sitoplazma artığının bulunmaması, bu parçanın spermin baş kısmı kadar bir uzunlukta ve aynı eksende uzanması vurgulanmıştır. Ana parça kısmının da kuyruk boyunca aynı kalınlıkta olması ve kuyruğun kırılmamasının beklenildiği belirtilmiştir (WHO, 2010).

Morfolojik anomalilerin değerlendirilmesinde:

- çift başlı sperm görülmesi,
- baş kısmının büyük veya küçük olması,
- şeklinin ovalden farklı görünümü ve vakuollerin bulunması,
- kuyruğun orta parçasının baş kısmına bağlanmasında anormal görünüm, aşırı derece de incelme/kıvrılma,
- kuyruğun ana parçasında kırılmalar, keskin açılı bükülmeler ve kıvrılmalar, sitoplazma artıklarının birikimi gibi özelliklerin olmaması DSÖ (2010) tarafından belirtilmiştir (WHO, 2010).

Spermin sayımında çeşitli sayım kamaraları kullanılmaktadır. Bunlardan biri de Makler (1978)'in geliştirdiği Makler sayım kamarasıdır. Makler sayım kamarasının, spermin sayımına ve hareketine olanak verdiği belirtilmektedir. Bu kamaranın orta kısmında sayım çemberi, bu çemberin içerisinde kareler bulunmaktadır. Sperm süspansiyonu damlatıldıktan sonra kamaranın yuvarlak cam kapağı kapatılmaktadır. Sayım kamarasıyla ışık mikroskobunun x20'lik objektifinin yardımıyla sperm görülebilmektir. Kamarada tüm spermlerin görüldüğü tek bir odak alanı bulunmaktadır ve 10µm'lik derinliği sayesinde spermler yüzeilmekte, hareketleri kısıtlanmamaktadır. Diğer sayım kamaralarının aksine dilüsyon gerektirmediğinden sayım işleminin pratikliğine dikkat çekilmiştir (Makler, 1978).

Makler geliştirdiği sayım kamarasında 0,1 x 0,1 mm boyutlarında toplam 100 adet kare bulunduğunu ve bu karelerden çizgi hattındaki 10 karede sayılan sperm sayısının mililitredeki, milyon sperm sayısını verdiğini bildirmektedir (Makler, 1980).

2.5. Histon ve Protamin

Hücrelerin kalıtım materyali olan deoksiribo nükleik asit (DNA), histon adı verilen proteinlerle sarılıp paketlenerek kromatini meydana getirmektedir. Histonun H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 farklı tipi olduğu belirtilmektedir (Luger vd., 1997). Somatik hücrelerde kromatinin yeniden modellenmesi transkripsiyonel aktivasyon ve susturma olaylarıyla gerçekleştirilmekteyken, spermatogenezde ise haploid yapıdaki genetik materyalin mayoz bölünmesi ve DNA'nın kompakt hale getirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Mayoz bölünme ile sinapsis ve homolog kromozomların rekombinasyonun tamamlanmasından sonra gen transkripsiyonunda artış olurken, spermin baş kısmında bulunan haploid genomun hücre çekirdeğinin %5'i kadar bir alana

sıkıştırıldığı belirtilmektedir. Histonlarla protaminlerin yer değişerek yeniden paketlenmesi olayında, haploid erkek genomu oldukça özelleşerek, kromatin yapısı çörek şeklini alır ve bilinen klasik kromatin görünümünden farklı bir biçimde paketlenmektedir (Sassone-Corsi, 2002).

Ökaryot hücrelere ait DNA yapısı kromatin içinde sıkılaştırılarak katlanmıştır fakat katlanma sonrası DNA replikasyon, transkripsiyon ve DNA onarımı gibi önemli işlevlerini sürdürebilecek şekilde aktiftir. Paketleme işleminin birimi nükleozom olarak adlandırılır, DNA iplikçisi histon H2A, H2B, H3 ve H4'ü içeren histon oktamere sarılır ve bu sarılma işleminde 147 baz DNA çiftinin sarıldığı ifade edilmektedir (Biterge ve Schneider, 2014, Tessarz ve Kousarides, 2014). Histonların N- veya C- terminal kuyruklarından kovalent olarak değiştirilebilen küçük bazik proteinler olarak tanımlanmıştır (Biterge ve Schneider, 2014).

Ingles ve Dixon (1967)'a göre protaminler, spermilerin çekirdeklerinde bulunan temel nükleer proteinlerdendir ve arjininden zengin bir yapıdadır; asidik aminoasitlerin kalıntıları ise az miktarda içermektedir. Protamin ve histonun fosforile olduğunu ve testis gelişiminde olgun sperm hücresi haline gelen hücrelerdeki protamin, serin kalıntılarının %74'ünün fosforile olduğunu bildirilmektedirler (Ingles ve Dixon, 1967).

Balhorn vd. (1984) protaminlerin spermatogenezde DNA'da sentezlendiğini ve depolandığını, histon ve histona benzer proteinlerle yer değiştirerek DNA'yı sıkılaştırdığını ve genetik açıdan inaktif hale getirdiğini söylemektedirler. Ayrıca fare testisinde geç spermatid evresinde iki ayrı protamin varyantını ve dört farklı değişim proteinini saptadıklarını belirtmişlerdir (Balhorn vd., 1984). Arjinin ve sisteinden zengin bu protein, DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinleriyle yer değiştirdiği ve DNA'yı kompaktlaştırdığı bilinmektedir. Memelilerde bu değişimin direkt olarak olmadığı, histon-protamin proteinlerinin değişiminde geçiş (transition) proteinlerinin görev aldığı belirtilmektedir (Braun, 2001).

İnsan spermatogenezinde histonların çoğu protaminle yer değiştirerek, DNA'yı sıkı ve transkripsiyonel olarak inaktif hale getirdiği ve geriye kalan histonların da yüksek ölçüde asetillendiği bildirilmektedir. Histon asetil transferaz enzimleri, lizin kalıntıları asetilasyonunu sağlayarak kromatinin genişlemesi ve transkripsiyonel olarak aktif olmasına neden olduğu bildirilmektedir. Bunun aksine histon deasetilazları ise kromatinin sıkılaşmasına ve transkripsiyonel olarak inaktif olmasını sağladığı bildirilmektedir.

Haploid sayıda kromozom içeren spermin sitoplazması oldukça azdır ve kromatinin yapısında hem nükleohiston hem de nükleoprotamin içermektedir. İnsana ait spermin yapısındaki histonların yaklaşık %85'inin protamine dönüştüğü, geriye kalan kısmının epigenetik modifikasyonlara uğradığı belirtilmektedir. Spermin oositi döllemesinden sonra sperme ait çekirdek pronükleusu oluşturulurken, DNA'ya sarılı protaminler uzaklaştırılır ve yerine tekrar histon proteinleri getirildiği bilinmektedir (Schagdarsurengin vd., 2012). Histon proteinin protamine dönüşümünün yol açtığı kromatin kompaksiyonun sperm motilitesi açısından önemli olduğu, sperm genomunun oksidasyona ve spermin dışı üreme sisteminde karşılaşabileceği zararlı moleküllere karşı koruduğu belirtilmektedir (Güneş vd., 2016).

2.6. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PDGF, PDGF-vasküler endotelial büyüme faktörü (PDGF-VEGF) ailesinin bir üyesi olduğu bilinmektedir. PDGF'lerin üç boyutlu yapısına bakıldığında VEGF'lerle benzerlik gösterdiği, fakat aminoasit sekans benzerliği göstermemesine rağmen glikoprotein hormonlarının, sinir büyüme faktörünün ve transforme edici büyüme faktörü β 'nin yapılarıyla da benzerlik göstermektedir. Bu moleküllerin hem homodimerik hem de heterodimerik formları bulunmaktadır. Uzun yıllardır PDGF-A ve PDGF-B olarak adlandırılan PDGF polipeptidleri bilinmekteyken, son yıllarda PDGF-C ve PDGF-D tanımlanmıştır. Prenatal dönemde PDGF-A ve PDGF-B'nin ana kaynağının Sertoli hücresi olduğunu, PDGF reseptörü- α (PDGFR- α) ve PDGF reseptörü- β (PDGFR- β) reseptörlerini eksprese eden hücrelerin ise testiküler korddan kaynaklandığı belirtilmektedir. Postnatal dönemin hemen başında ise yine benzer olarak PDGF-A ve PDGF-B Sertoli hücresinde görülmekteken, PDGFR- α ve PDGFR- β reseptörlerinin myoid hücrelerde immünopozitivite verdiği bildirilmiştir. Puberte evresinde minimal düzeyde olarak postnatal yaşamın başında belirtilen bölgelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Fakat yetişkinlik dönemine gelindiğinde ise PDGF-A, PDGF-B, PDGFR- α ve PDGFR- β 'nin sadece Leydig hücresinde pozitiflik gösterdiği belirtilmiştir. PDGF-A puberte öncesinde zayıf da olsa interstisyel alanda görülmektedir. PDGF ligandlarının hücrel kökenleri gelişim dönemlerine ve hayvan türlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sıçan ve fare türlerinde doğumdan puberteye kadar PDGF ligandının kaynağı Sertoli hücresi iken sıçanlarda yetişkinlik döneminde PDGF-A ve PDGF-B'nin üretimi Sertoli hücresinden Leydig hücresine geçmektedir (Mariani vd., 2002).

PDGF'nin, peritübüler myoid hücresi (PMH) için kemoatraktant olduğu ve bu hücrelerde kasılabilirliği, protein sentezini, ekstraselüler matriksin üretimini ve çoğalmasını uyardığı belirtilmektedir. PDGF-B-PDGFR- β 'nin etkileşiminin, testis gelişimi sırasında myoid hücre öncüllerinin tübüller arası alandan peritübüler alana göçmesinde ve çoğalmasında ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Mariani, 2002). PDGF-A-PDGFR- α 'nın etkileşimi de yetişkin Leydig hücrelerinin öncüllerinin gelişimini teşvik ettiği ifade edilmektedir (Gnessi vd., 2000; Mariani vd., 2002).

PDGF'nin, hücre çoğalması ve hücrelerin sağ kalımının düzenlenmesi, anjiyogenez, hücre göçü, membran katlanması, aktin filaman sisteminin yeniden düzenlenmesiyle hücre iskeletinin yenilenmesi; proteoglikan, glikozaminoglikan, kollajen gibi majör bağ doku yapılarının sentezinin uyarılması gibi çeşitli biyolojik olayların sinyal yolağında rol aldığı belirtilmektedir. PDGF-A geni susturulmuş farelerde oligodendrositlerin sayısının azalmasına bağlı olarak dismiyelinizasyon ve motor anomalileri görüldüğü bildirilmiştir. Yine PDGF-A eksikliğinde akciğer alveollerinde düz kas hücreleri kaybı, deride mezenşimal defekt sonucu anormal saç yapısı ve sindirim kanalı mukoza astarında anomaliler görülmüştür. Yine PDGF-B ve PDGFR- β eksikliği görülen farelerde böbreklerde ciddi gelişim bozukluklarına, hematolojik ve kardiyovasküler anomalilere rastlanılmıştır ve prenatal dönem 17-19. günlerde ölümler meydana gelmiştir (Basciani vd., 2010).

2.7. C-Kit

C-kit'in, PDGFR- α ve PDGFR- β ile aynı aileden olan 150 kDa ağırlığında bir tirozin kinaz reseptörü olduğu belirtilmektedir. Bu reseptör ailesinin hücre dışındaki bölgesinin immünoglobülin benzeri domainlerden düzenlendiği, ligand tanıma ve bağlanma kısmına bağlı olduğu belirtilmektedir. Transmembran bölgesi, reseptörü plazma membranına kısa bir aminoasit kısmı ile bağlamaktadır. Hücre içindeki kısmı ise, aynı kökenli ligandlar tarafından taşınan sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan reseptörlerin kinaz domaini içermektedir (Sette vd., 2000).

Manova vd. (1993)'nin yaptığı bir çalışmada prenatal dönem ve postnatal dönemin erken safhasında c-kit ligandının (KL) sentezi Sertoli hücrelerinde yapıldığı, perinatal testiste baskın olarak KL-1'in sentezlendiği belirtilmektedir. Böylece çözünebilir formdaki KL'nin, Leydig hücresine ulaştırıldığı ve yüksek seviyelerde c-kit üretildiği söylenmektedir. Orth vd. (1996) ise yenidoğan testisinde germ hücrelerinde c-kit

ekspresyonunu göstermişlerdir ve c-kit reseptörlerinin germ hücrelerine göç ettiklerini belirtmişlerdir.

C-kit' in tip III tirozin kinaz reseptörü olduğu ve SCF diğer bilinen isimleriyle kit ligandına bağlandığı bilinmektedir (Figueira vd., 2017; Cardoso vd., 2017). SCF/c-kit sisteminin testis, prostat, ovaryum ve endometrium gibi dişi ve erkek üreme sistemindeki organlarda eksprese edildiği, embriyolojik dönemde hücrelerin hayatta kalması, çoğalması, göçü ve farklılaşmasında rol aldığı ifade edilmektedir. Seminifer tübüllerde SCF ekspresyonun, Sertoli hücresinin membranında olduğu bildirilmiştir. C-kit'in ise, germ hattındaki hücrelerde üretildiği, spermatogenezin erken evrelerinde görev aldığı ve mayoz bölünme aşamasında kesilerek yerini tr-kit'e bıraktığı belirtilmektedir. Tr-kit'in ise haploid hücrelerin sitoplazmasında, epididimiste depolanan sperm hücrelerinin subakrozomal ve ekvatoryal bölgesinde bulunduğu ve spermin hareketliliğinde rolü olduğu öne sürülmektedir. Sertoli hücresi ve germ hücreleri arasındaki SCF/c-kit iletişiminin germ hücrelerinin hayatta kalmasında önemli bir rolü olduğu ve bu iletişimin hücreleri apoptozdan koruyan önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, c-kit reseptörünün testosteron üretimini sağlayan Leydig hücresinde tespitinden sonra SCF/c-kit'in steroidojenik aktivitesini uyardığı öne sürülmüştür. SCF/c-kit dişi üreme sisteminde de sentezlendiği belirtilmiştir; c-kit oositlerde eksprese edilirken, SCF'de granüloza hücrelerinde üretilmektedir. SCF, folikül gelişiminde potansiyel bir uyarıcı olarak bilinmektedir (Figueira vd., 2017).

2.8. İmatinib

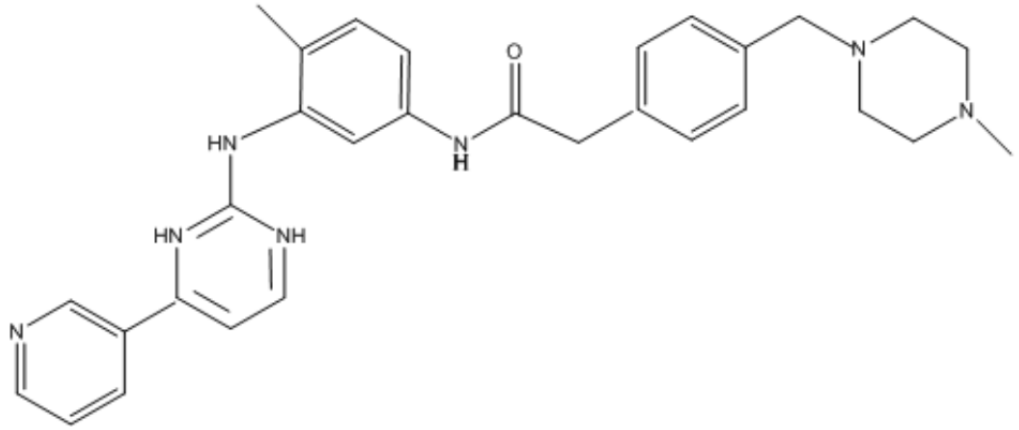
2.8.1. İmatinibin Etki Mekanizması ve Farmakokinetik Özellikleri

İmatinib, TKİ olarak bilinmektedir. İmatinibin, 2-fenil amino primidin türevidir olduğu (Vetto, 2009) ve proteinlere özgü triozin kinazları inhibe ettiği bildirilmektedir. Protein kinazlar, protein serin-treonin kinaz ve protein tirozin kinazlar olmak üzere iki alt sınıftan oluşmaktadır (Iram vd., 2016). Triozin kinazların, adenozin tri fosfattan (ATP) aldığı fosforu triozin aminoasidine ileten enzim oldukları ifade edilmektedir (Tuğlu ve Melli, 2012). Bu enzimlerin biyolojik sistemlerde proliferasyon, büyüme, metabolizma, iç ve dış uyarıcı etkenlere karşı apoptozun oluşmasında önemli rol oynadıkları belirtilmiştir (Tuğlu ve Melli, 2012; Iqbal ve Iqbal, 2014).

İmatinib, 1990'lı yıllarda Nicholas Lydon isimli biyokimyacı tarafından geliştirilmiştir (Tuğlu ve Melli, 2012; Iqbal ve Iqbal, 2014; Iram vd., 2016). Hedefe özgü

olan bu ilacın, Tip II TKİ sınıfında olduğu belirtilmektedir (Tuğlu ve Melli, 2012). Bu ilaç KML tedavisinde önemli bir adım olarak kabul edilmektedir, 1998 yılında ilk defa klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmış ve 2001 yılının mayıs ayında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay alınmıştır (Iqbal ve Iqbal, 2014). Daha sonra imatinib GİST tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır (Iram vd., 2016).

İmatinibin IUPAC ismi 4-(4-METHYL-piperazin-1-ylmethyl)-N-[4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide; N-(4-methyl-3-[[4-(pyrimidin-3yl)pyrimidin-2-yl]amino}phenyl)-4-[(4- methylpiperazin-1-yl)methyl]benzamide; alpha (4-methyl-1-piperazinyl)-3'-((4-(3-pyridyl)-2-pyrimidinyl)amino)-ptoluidide olarak düzenlenmiştir (Iram vd., 2016).



Şekil 5. İmatinibin kimyasal yapısı (Iram vd., 2016).

İmatinib c- kit, PDGF, ABL ve BCR-ABL aktivitesini engelleyen bir TKİ olarak işlev göstermektedir. Triozin kinazların ATP'ye bağlanan aktif bir bölgesi olduğu ve imatinibin de bu bağlanma bölgesine bağlanarak bu kinaz aktivitesini azalttığı bildirilmektedir (Vetto, 2009; Iqbal ve Iqbal, 2014). Bu olaylar lösemogenezin sinyal yolağında devam eden basamakların kapatılmasıyla (switch-off) sonuçlanmaktadır (Iqbal ve Iqbal, 2014). İmatinib sadece kanser hücrelerinde değil aynı zamanda sağlıklı

hücrelerinde triozin aktivitesini engellemektedir fakat bu inhibiyonu tolere edecek çok sayıda farklı triozin kinazlar bulunduğu bilinmektedir (Iram vd., 2016).

Bu ilaç vücuda alındıktan sonra karaciğerde sitokrom (CYP) P450 sistemi tarafından metabolize edilmektedir, bu enzimler CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19'dur. Bu enzimlerin varlığı imatinibin plazma konsantrasyonu sabitliği açısından büyük öneme sahiptir (Tuğlu ve Melli, 2012). İmatinibin aktif metaboliti N-demetil-piperazindir ve yarılanma ömürleri imatinib için 18 saat, metaboliti için ise 40 saat olduğu belirtilmektedir. İmatinibin dozajının 25 mg-1000 mg arasında değiştiği ve tekrarlayan doza bağlı olarak farmakokinetik etkisinin değişmediği, günde bir kez alımında ilacın kararlı halinde 1.5-3 kat birikim olduğu bildirilmiştir (Iram vd., 2016). İlacın atılımının büyük ölçüde gayta ve safra yoluyla, az bir kısmının ise idrarla atıldığı bilinmektedir (Tuğlu ve Melli, 2012).

2.8.2. İmatinibin Gebelikte Kullanımı

Gebelik döneminde hastaların ilaç kullanması oldukça sınırlıdır. Gebelik döneminde imatinib kullanımında iskelet ve gastrointestinal sistemde konjenital anomalilere neden olabileceğinden imatinib kullanımı tavsiye edilmemektedir (Apperley, 2009). Çocuk sahibi olmak isteyen kadın KML hastalarının da hamilelik sırasında TKİ tedavisinin kesilmesinin güvenli olabileceği belirtilmektedir (Luskin, 2018). Ayrıca doğum kontrolü öncesi ve gebeliğin ilk trimesterde tedavinin kesilmesinin tercih edilebileceği fakat bu kesintinin hastalığın tedavisindeki etkilerinin tam olarak bilinmediği belirtilmektedir (Ali vd., 2009). İmatinib kullanan hastaların gebelikten korunması gerektiği, tedavi sırasında gebe kalan hastaların gebeliğe devam etmek istemesi durumunda ilaca ikinci trimestrede devam etmesinin erken evredeki riskleri artırmadığı gibi görüldüğü belirtilmektedir (Azim Jr. vd., 2010). KML tedavisinde gebeliğin klinik olarak zorluk oluşturduğu, kazara veya planlı gebelik durumlarında ebeveynlerin risk/fayda açısından bilgilendirilmesi gerektiği, alternatif tedaviler arasında yer alan interferon- α 'dan da kaçınılması gerektiği bildirilmektedir (Pye vd., 2008). İmatinib'in FDA'ya göre gebelik kategorisi D olduğundan bu ilacı kullanırken hamile kalan veya hamilelik sırasında bu ilacı kullanan kadın hastaların fetüse karşı oluşabilecek tehlikelerden haberdar edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Madabhavi vd., 2019).

2.8.3. İmatinibin Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

İmatinibin erkek ve dişi üreme sistemlerinde çok farklı etkilere sahip olduğu literatürde belirtilmiştir. Bir çalışmada imatinibin dişi üreme sisteminde primordiyal foliküllerin korunmasında rol oynadığı ifade edilmektedir (Gonfloni vd., 2009). Bunun aksine insan over örneklerinde yapılan bir çalışmada da imatinibin folikül rezervinde ve steroidojenik aktivitede azalma gibi sitotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Bildik vd., 2019). Başka bir çalışmada imatinib tedavisi gören erkek hastada oligospermiye neden olduğu bildirilmektedir (Seshadri vd., 2004).

2.9. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron türü olarak bilinmektedir; atom ve moleküllerin kimyasal reaktivitesini artırdığı bildirilmektedir (Betteridge, 2000). Moleküler oksijenin suya indirgenmesinde sırasıyla süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir (Sies, 1997). Süperoksit ve hidroksil radikalleri aşırı derecede kararsızken, hidrojen peroksit serbestçe yayılabilir ve uzun ömürlüdür (Finkel ve Holbrook, 2000). Oksijen radikalleri alkil ve peroksil radikalleri olarak oluşabilmektedir. X-ışınları, ultraviyole ışınlar gibi farklı radyasyon türleri, sitokinler, kemoterapotik ajanlar, hipertermi ve hatta büyüme faktörleri gibi faktörler oksidatif stresin artmasında rol oynamaktadır (Sies, 1997; Finkel ve Holbrook, 2000).

Oksidatif stres DNA, protein ve lipidlere saldırarak hücredeki kompleks mekanizmalara zarar verebildiği belirtilmektedir. ROT insan metabolizmasının bir parçası olduğu fakat fazla üretiminin doku hasarına neden olduğu ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra dokuda oluşan hasarın da ROT üretimine neden olduğu bildirilmektedir (Okezie vd., 1991).

8-Hidroksideguanozin (8-OHdG), oksidatif stresin DNA'da oluşturduğu hasarı belirten önemli bir biyomarkır olduğu ifade edilmektedir. ROT'un lipid peroksidasyonunun membranın çift tabakalı lipid yapısında oluşturduğu harabiyet, membrana bağlı reseptör ve enzimleri inaktive edebildiği ve doku geçirgenliğini artırdığı belirtilmektedir. Bunun sonucunda malondialdehid ve doymamış aldehydler gibi lipid peroksit ürünleri çoğu proteinini inaktive ettiği ve 4-Hidroksi-2-nonenal'in hücre içi glutasyonu tüketerek peroksit üretimini indüklediği bildirilmektedir. Bunların yanı sıra

ROT peptid zincirlerinin parçalanmasına, proteinlerin elektron yükünün değişmesine ve çapraz bağlanmasına, aminoasitlerin oksidasyonuna neden olduğu gösterilmektedir (Birben vd, 2012).

2.10. Hücresel Redoks Döngüsü

Tiyol içeren bileşiklerin hem biyokimyasal hem de farmakolojik reaksiyonlarda görev aldığı, disülfid bağlarının proteinlerin üçüncül yapısının belirlenmesinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmektedir. Sistein kalıntıları içeren bileşenlerin kolayca metabolize olduğu, geçiş metalleri tarafından oksitlendiği veya tiyol-disülfid değişimine katıldığı fakat hidrojen peroksitle (fizyolojik pH'da) direkt reaksiyona girmediği belirtilmektedir. Bir sistein içeren glutatyonun, protein olmayan tiyollerden en çok bulunanı ve çoğu hücrede milimolar düzeyinde olduğu; tiyoredoksin proteinin de antoksidan savunma, protein katlanması ve sinyal transdüksiyonunda görev aldığı ifade edilmektedir. Hücrenin strese tepki göstermesi durumunda tiyol içeriğinin değiştiği; hücreyi zararlı bileşenlerden korumak için ilk reaksiyonlarda tüketildiği ve disülfidin enzimatik indirgenmesi veya *de novo* senteziyle bunun mümkün olduğu belirtilmektedir (Dickinson ve Forman, 2002).

Glutatyonun bir tripeptid (L-gamma-glutamil-L-sisteinil-glisin) olduğu ve tüm memeli karaciğerinde yüksek oranda bulunduğu belirtilmektedir. İndirgenmiş tiyol formundaki glutatyon redüktaz hücre içi glutatyonun %98'ini tuttuğu bildirilmektedir. Glutatyon; endojen ve ekzojen kaynaklı ROT'lerinin detoksifikasyonunda, protein ve diğer moleküllerin disülfid bağlarının azaltılarak tiyol durumunun korunmasında, sisteinin depolanması ve organlar arası transferinde, lökotrien ve prostoglandin metabolizmasında, ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesinde, mikrotübüllerin modülasyonunda görev aldığı belirtilmektedir (De Leve ve Kaplowitz, 1990).

Glutatyondaki sülfidril gruplarının oksidatif hasara koruyuculuk sağladığı ve hücreler tarafından oksidatif strese karşı savunma sırasında hızlıca kullanılan hücre içi deposu olduğu ifade edilmektedir. Glutatyon indirgenmiş form (GSH) ve oksitlenmiş form (GGSG) olmak üzere iki formda bulunduğu, ROT'lara karşı savunmada glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerle etkileşimi kolaylaştırdığı bildirilmektedir. Erkek ve dişi üreme sisteminde görev alan bu antioksidan germ hücrelerinin korunmasında, döllenme süreci ve erken embriyo gelişiminde rol oynadığı; bunu yanı sıra oositlerin sitoplazmik ve nükleer maturasyonun değerlendirilmesinde biyokimyasal bir markır olabileceği belirtilmektedir (Luberda, 2005).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

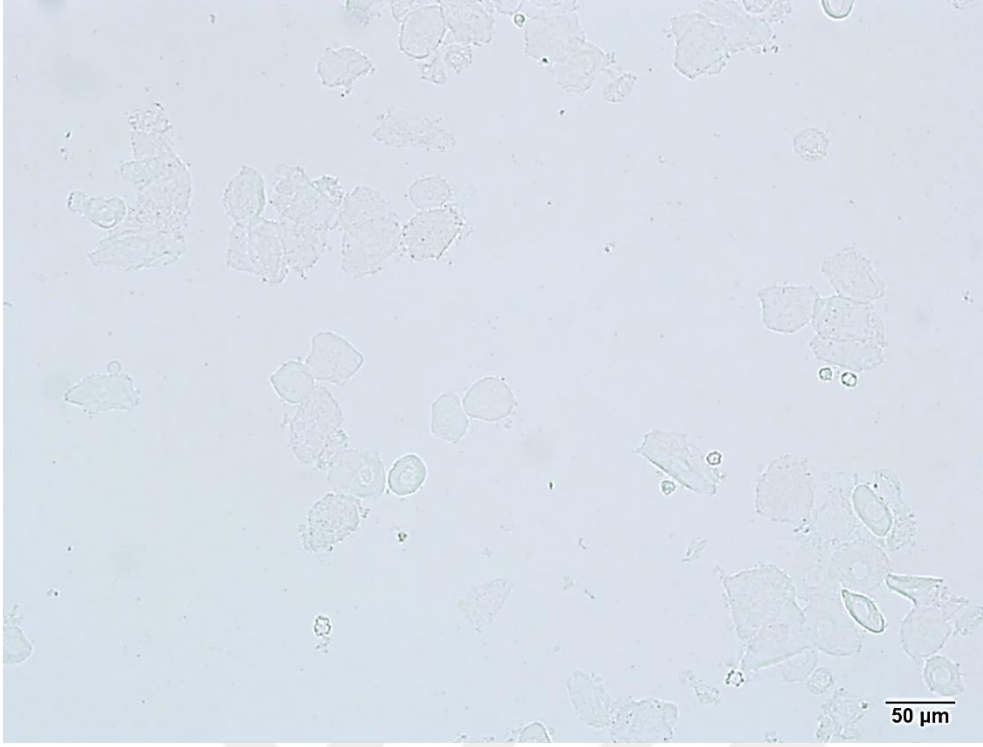
3.1. Deney Hayvanlarının Temini, Barınması ve Bakımı

Bu çalışmaya, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 2017/22 nolu karar ile onay alındı. Tez çalışmamız RTEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP, Rize, Türkiye) tarafından TDK-2017-825 numaralı proje kodu ile Doktora Tez Projesi olarak desteklendi ve deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve kitler temin edildi.

Çalışmamızda kullanılan tüm deney hayvanlarının tedarik edilmesi, bakımı, beslenmesi ve barınması RTEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Deney hayvanlarının bakımı ve yaşam alanının fiziksel şartlarının optimum seviyede tutulması merkezin veteriner hekim ve teknisyenleri gözetiminde sağlandı. Sıçanlar standart 12 saat aydınlık/karanlık ortamda sirkadiyen ritme uygun olarak, 22 ± 2 °C' de % 50-55 neme sahip ortamda, sınırsız musluk suyu ile beraber % 21 oranında protein içeren standart pellet yemler (Purina, Bayramoglu, Erzurum, Turkey) ile ad libitum olarak beslenmeleri sağlandı.

3.2. Çalışmada Oluşturulan Gruplar ve Deneyin Yapılışı

Deneyimizde 15 adet 14 haftalık 230-260 gr ağırlığında yetişkin Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Düzenli siklus gösteren dişi sıçanlara, serum fizyolojik ile vajinal yıkama yapıldı ve sürüntü örnek alındı. Her bir hayvan için steril kapta bulunan serum fizyolojik için farklı Pastör pipeti kullanıldı. Alınan sürüntü lam-lamel arasına kapatılarak mikroskop altında incelendi ve östrus evresi tayini yapıldı. Östrus safhasında bulunan dişi sıçanlar (Resim 1), 0. günde kabul edildi ve o gün içerisinde erkek sıçanlarla çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi gün tekrar vajinal yıkama yapıldı ve sperm görülen sıçanlar gebeliğin 1. gününde kabul edildi (Resim 2). Sperm görülen dişi sıçanlar rastgele olarak 5 gruba ayrıldı ve enjeksiyonlara başlandı. İmatinib (İmavec, Koçak Farma, Türkiye) her gün ayrı olarak apirojenik steril su içerisinde çözüldü ve intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.



Resim 1. Östrus evresindeki epitel hücrelerin görünümü (x200).



Resim 2. Koitus sonrası smear testiyle belirlenen sperm ve epitel hücreleri (x200).

3.2.1. Prenatal Dönem

Kontrol grubuna hiçbir işlem uygulanmadı. İmatinib verilen gruplara gebeliğin 1-8. günleri arasında sırasıyla 20 mg/kg (İmatinib-20 grubu), 40 mg/kg (İmatinib-40 grubu), 60 mg/kg (İmatinib-60 grubu), 80 mg/kg (İmatinib-80 grubu) i.p. olarak uygulandı. Enjeksiyonların bitiminde hayvanlara herhangi bir işlem uygulanmadı ve gebelik takibi yapıldı. 80mg/kg imatinib uygulanan hayvanlarda gebelik görülmemesi üzerine 2 defa deney tekrarı yapılmasına rağmen tekrar gebelik gözlenmedi.

3.2.2. Postnatal Dönem

Doğan yavru sıçanlar 21 gün anneleri tarafından beslendi, daha sonra cinsiyet tayini yapılarak ayrı kafeslere ayrıldı. Doğan yavru erkek sıçanlardan rastgele olarak gruplarına göre 8 adet erkek sıçan alındı. Yavru sıçanların her gün beslenmesi, su ihtiyacı ve kafes temizliği takip edildi. 32 adet erkek sıçan gruplarına göre ayrıldı ve 60. günde sakrifiye edildi.

3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Numunelerin Toplanması

Deney sonunda tüm sıçanlar ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (20 mg/mL) i.p. uygulamasından sonra uyutuldu. Karın boşluğuna girilerek her iki testis çıkartıldı. Her seferinde sol testis histolojik analizlerde kullanılmak üzere alındı. Testisler iki parçaya ayrıldı, bir parçası Bouin solüsyonunda, diğer parçası %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Sağ testis steril bistüri ile parçalandı ve bir miktar testis dokusu steril RNase/DNase içermeyen ependorflara alındı ve aynı gün içerisinde mRNA izolasyonu gerçekleştirildi. Testisin diğer kısmı ise ependorflara alınarak biyokimyasal işlemlerde kullanılmak üzere uygun koşullarda muhafaza edildi. Alınan kan örnekleri tüplere alındı ve santrifüj edilen serum ve doku örnekleri Tıbbi Biyokimya AD' daki soğutucularda saklandı.

3.4. Histolojik Analizler

Tablo 1. Histolojik analizlerde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka
Formaldehit	Sigma-Aldrich
%96 Etanol	Merck
%100 Absolü etanol	Merck
Ksilen	Merck
Parafin	Merck
Pikrik Asit	Sigma-Aldrich
Fosfat buffer solüsyonu (PBS)	Sigma-Aldrich
Hematoksilen	Merck
Eozin	Merck

3.4.1. Tespit Solüsyonlarının Hazırlanması

Testis dokusu iki ayrı fiksatifte takip edildi. Testisin bir yarısı immünohistokimyasal analizler için %10'luk formaldehid solüsyonunda, diğer yarısı histopatolojik analizler için Bouin solüsyonunda fikse edildi.

Tablo 2. Doku takibinde kullanılan tespit solüsyonlarının hazırlanması

Solüsyon/Madde	Kullanılan miktar
%10' luk formaldehid fiksatorünün hazırlanışı	10 mL formaldehid üzerine 90 mL distile su konularak 100 mL' ye tamamlanır.
Bouin fiksatorünün hazırlanışı	75 mL formaldehid, 75 mL doymuş pikrik asit çözeltisi ve 5 mL glasiyel asetik asit karıştırılır.

3.4.2.Doku Takibi

Dokuların histolojik takibi, kesit alınması ve boyanması RTEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (AD) laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Alınan testis dokuları Bouin ve %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra dokular Shandon Citadel 2000 (Thermo Scientific, Almanya) modeli otomatik doku takip cihazında

dehidratasyon, şeffaflandırma ve parafinde (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) bekleme aşamaları sırasıyla Tablo 3'deki işlem ve sürelerle takip edildi. Takibi biten dokular Leica (EG1150 H ve EG1150 C, Almanya) marka doku gömme cihazı ile parafin bloklara gömüldü.

Tablo 3. Histolojik doku takibi

Uygulanan İşlem	Solüsyon/Madde	Süre
Dehidratasyon*	%50 Etanol	1 sa15 dk
Dehidratasyon*	%60 Etanol	1 sa 30 dk
Dehidratasyon	%70 Etanol	1 sa 30 dk
Dehidratasyon	%80 Etanol	1 sa
Dehidratasyon	%96 Etanol	1 sa
Dehidratasyon	%100 Etanol (1)	1 sa 15 dk
Dehidratasyon	%100 Etanol (2)	1 sa 15 dk
Şeffaflandırma	Ksilen (1)	1 sa 30 dk
Şeffaflandırma	Ksilen (2)	1 sa
Parafinizasyon	Parafin (1)	1 sa
Parafinizasyon	Parafin (2)	3 sa 30 dk
Dokuların Bloklanması		

* Bouin ile takip edilen testislerde %70'lik alkol içerisinde pikrik asit çıkana kadar alkolü değiştirildi ve %70'lik alkolden takibe devam edildi.

3.4.3.Kesit Alınması

Parafin bloklara gömülen testis dokuları, mikrotom (Leica, RM2255) yardımıyla 30 µm'lik kesitlerle doku trimlendi, sonrasında 4-5 µm'lik kalınlıkta kesitler alındı. Alınan kesitler 37 °C'ye ayarlı ben mari (Leica, HI1210) içerisinde su üzerinde bırakıldı ve doku kırışıklıklarının açılması sağlandı. Tüm kesit alma işlemleri RTEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.4.4. Sperm Numunelerinin Elde Edilmesi ve Sayımı

Duktus epididimis petri içerisinde 1mL'lik steril fosfat buffer (PBS) solüsyonunda bistüri yardımıyla diseke edildi ve 35 °C'de 30 dk inkübe edildi. Makler sayım kamarasına pastör pipeti ile 1 damla sperm damlatıldı ve cam kapağı kapatıldı. Sayım kamarasının sayım yapılan alanında bulunan 10 mikrometre (μm) derinlikliği sayesinde spermlerin yüzmesi sağlandı. Sayım alanında bulunan 10 karede görülen sperm sayıldı; sayım karesinde bulunan ortalama sperm sayısı 10^6 ile çarpılarak sayısal veriler elde edildi.

3.4.5.Hematoksilen & Eozin Boyama

Lama alınan testis kesitlerin 56 °C'de olan etüvde parafinin eritilmesi sağlandı. Parafinin eritilmesi aşamasından sonra kesitler zembil ile doku boyama cihazına (Leica, ST5020 Multistainer Bath Array) yerleştirildi ve Tablo 4'deki prosedür uygulanarak boyandı.

Tablo 4. Hematoksilen & eozin boyama prosedürü

Uygulanan İşlem	Süre
Parafin eritme (cihazın sıcak haznesi)	5 dk
Ksilen (1)	3 dk
Ksilen (2)	3 dk
%100 Etanol	1 dk
%96 Etanol	2 dk
%90 Etanol	2 dk
%80 Etanol	2 dk
%70 Etanol	2 dk
Çeşme suyunda yıkama	5 dk
Distile suda yıkama	5 dk
Harris hematoksilen	1 dk
Çeşme suyunda yıkama	5 dk
Eozin G	8 dk 30 sn
Distile suda yıkama	15 sn
%70 Etanol	20 sn
%80 Etanol	15 sn
%90 Etanol	15 sn
%100 Etanol (1)	15 sn
%100 Etanol (2)	15 sn
Ksilen (1)	10 dk
Ksilen (2)	10 dk
Entellan ile kapama	

Rutin hematoksilen & eozin boyanan preparatlara histopatolojik testis hasarı skorlama (Johnsen skoru) uygulandı (Tablo 5).

Tablo 5. Histopatolojik testis hasarı skorlama (Johnsen skoru)

Skor Puanı	Açıklama
	Germ hücreleri ve spermatogenezin tamamen yokluğu.
1	Germ hücresi yoktur fakat Sertoli hücresi bulunur.
2	Sadece spermatogonyum bulunur.
3	Sadece birkaç (<5) spermatozoon mevcut ve spermatid veya spermatozoa bulunmaz.
4	Spermatozoon ve spermatid yoktur fakat birkaç veya daha fazla spermatosit bulunur.
5	Spermatozoon yoktur ve sadece birkaç spermatid (<5-10) bulunur.
6	Spermatozoon yoktur fakat birçok spermatid bulunur.
7	Sadece birkaç spermatozoon (<5-10) bulunur.
8	Birçok spermatozoon bulunur fakat germinal epitelde belirgin dökülme veya bozulmayla lümen düzensizdir.
9	Birçok spermatozoon ile spermatogenez eksiksizdir. Düzgün kalınlıkta düzenlenmiş germinal epitel lümenden ayrılır.
10	

3.4.6. İmmünohistokimyasal (İHC) Boyama

İHC boyama için Mouse and Rabbit Spesific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab64264, Abcam, USA) kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak Tablo 6'daki işlemler uygulandı. Primer antikor basamağında üretici protokölüne uygun dilüsyonlarda antikor kullanıldı. Çalışmamızda Anti-PDGF antibody (ab198874, Abcam, USA), Anti c-kit antibody (ab115801, Abcam, USA) ve Anti-8OHdG (ab10802) antikorları kullanıldı.

Tablo 6. İHC boyama prosedürü

Uygulanan İşlem	Süre
Parafin eritme	15 dk
Ksilen (1)	5 dk
Ksilen (2)	5 dk
%100 Etanol	5 dk
%96 Etanol	5 dk
%90 Etanol	5 dk
%80 Etanol	5 dk
%70 Etanol	5 dk
Distile suda yıkama	5 dk
Hidrojen peroksit	10 dk
Phospat Buffer Solüsyonu (PBS)	2 kere yıkama
Antigen retrieval	Antikor üreticisinin önerdiği yöntem
PBS	3 kere yıkama
Protein blok	10 dk
PBS	1 kere yıkama
Primer antikor	Üretici önerisine uygun inkübasyon süresi
PBS	4 kere yıkama
Biotinylated Goat Anti-Polyvalent	Oda ısısında 10 dk inkübasyon
PBS	4 kere yıkama
Streptoavidin peroksidaz	Oda ısısında 10 dk inkübasyon
PBS	4 kere yıkama
30 µl DAB kromojen+ 1.5 ml DAB Substrat	Oda ısısında 1-10 dk inkübasyon
PBS	4 kere yıkama
Hematoksilen	3 dk
Çeşme suyu ile yıkama	5 dk
%70 Etanol	5 dk
%80 Etanol	5 dk
%90 Etanol	5 dk
%100 Etanol (1)	5 dk
%100 Etanol (2)	5 dk
Ksilen (1)	5 dk
Ksilen (2)	5 dk
Entellan ile kapatma	

Boyanan tüm kesitlerin görüntülenmesi, incelemesi ve fotoğraflarının çekilmesi RTEÜ Histoloji ve Embriyoloji AD Araştırma Laboratuvarındaki Olympus DP72 kamera ataçmanlı (Olympus, Tokyo, Japonya) Olympus trioküler BX51 TF (Olympus, Tokyo, Japonya) marka mikroskopta yapıldı. İmmünohistokimyasal boyanan dokulara Tablo 7.'deki immunohistokimyasal pozitivite derecelendirme metodu uygulandı.

Tablo 7. İmmünohistokimyasal pozitivite derecelendirme metodu

Skor	Yüzde
0	% 5' den az
1	% 6-25 arası
2	% 26-50 arası
3	% 50'de fazla

3.4.7. Terminal deoksinükleotid transferaz dUTP Nik End Labeling (TUNEL)

Metodu

TUNEL metodu için Abcam marka *In situ* Apoptosis Detection Kit (ab206386, Abcam, USA) kullanıldı. Kit protokolü Tablo 8'deki ve aşağıdaki işlemlere göre uygulandı.

Tablo 8. TUNEL boyama prosedürü

Uygulanan İşlem	Süre
Parafin eritme	15 dk
Ksilen (1)	5 dk
Ksilen (2)	5 dk
%100 Etanol (1)	5 dk
%100 Etanol (2)	5 dk
%90 Etanol	3 dk
%80 Etanol	3 dk
%70 Etanol	3 dk

1. PBS’de 5 dk bekletildi, daha sonra lamdaki dokunun etrafı dikkatlice kurulandı ve hidrofobik kalemle doku etrafı çevrildi.
2. Proteinaz K dilüsyonu: Proteinaz K, 1:100 oranında distile su ile dilüe edildi ve doku başına 100 µL konuldu, oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.
3. PBS’de 5 dk bekletildi, daha sonra lamdaki dokunun etrafı dikkatlice kurulandı.
4. Peroksidaz dilüsyonu: %30’luk H₂O₂ 1:10 oranında metanolle dilüe edildi ve doku başına 100 µL konuldu, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
5. PBS’ de 5 dk bekletildi, daha sonra lamdaki dokunun etrafı dikkatlice kurulandı.
6. Doku başına 100 µL Terminal deoksinükleotidil Transferaz (TdT) dengeleme solüsyonu doku başına 100 µL konuldu ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
7. TdT Labeling Reaksiyon Karışımı: TdT enzim tüpünden doku başına kullanılacak miktar temiz bir ependorfa alındı ve santrifüjlendi. Doku başına 1 µL TdT enzim ve 39 µL TdT Labeling reaksiyon karışımı konuldu ve buz üzerinde karıştırıldı. Nemli ortamda 37°C’ de 1.5 saat inkübe edildi.
8. PBS’de 5 dk bekletildi, daha sonra lamdaki dokunun etrafı dikkatlice kurulandı.
9. Durdurma tamponu solüsyonundan doku başına 100 µL konuldu, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
10. PBS’de 5 dk bekletildi, daha sonra lamdaki dokunun etrafı dikkatlice kurulandı.
11. Engelleme tamponu solüsyonundan doku başına 100 µL konuldu, oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
12. 25X Konjuge solüsyonu 1:25 oranında engelleme tamponu ile buz üzerinde dilüe edildi ve doku başına 100 µL konuldu, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
13. PBS’de 5 dk bekletildi, daha sonra lamdaki dokunun etrafı dikkatlice kurulandı.
14. DAB solüsyon 1, DAB solüsyon 2 ile doku başına 100 µL olacak şekilde 1: 30 dilüe edildi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
15. Distile su ile yıkama yapıldı.
16. Metil green boya ile doku başına 100 µL olacak şekilde boya eklendi, oda sıcaklığında 1-3 dk inkübe edildi.

17. Boyanın fazlası akıtıldı ve absorbent mendil ile doku kurulandı.
18. %100'lük etanole 2-4 kez batırılıp çıkarıldı ve kurutuldu.
19. İkinci kez farklı %100'lük etanole 2-4 kez batırılıp çıkarıldı ve kurutuldu.
20. Ksilene 2-4 kez batırılıp çıkarıldı ve kurutuldu.
21. İkinci kez farklı bir ksilene 2-4 kez batırılıp çıkarıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.5.Moleküler Analizler

3.5.1. mRNA İzolasyonu

Testis dokusundan mRNA izolasyonu için Macherey Nagel marka mRNA izolasyon kiti (740955.50) kullanıldı. İzolasyon işlemi için kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki işlemler uygulandı:

- a) Alınan testis dokusu örnekleri homojenize edildi.
- b) Hücrelerin parçalanması: Dokuların üzerine 350 µL RA1 solusyonu ve 3,5 µL β-merkaptoetanol eklendi ve hızlıca vortekslendi.
- c) Lizat Filtrasyonu: Viskozitesi azalan filtrasyon, 2 mL'lik (rRNase, DNase içermeyen steril) toplama tüplerinin içine yerleştirilen Nükleospin[®] filtre üzerine eklendi ve 1 dk boyunca 11,000 g hızda santrifüj edildi.
- d) RNA bağlanmasının ayarlanması: Nükleospin[®] filtre çıkartıldı ve homojenize lizata 350 µL %70 alkol ilave edildi, pipet ile 5 defa al-ver yapıldı.
- e) RNA bağlanması: Nükleospin[®] RNA kolonuna lizat eklendi ve 11000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- f) Desalt silika membranı: Başka bir toplama tüpüne yerleştirilen kolonun üzerine 350 µL membran tuz giderme tamponu eklenerek 11,000 g hızda 1 dk santrifüj edildi.
- f) DNA hidrolizi: 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpünde 10 µL rDNase üzerine 90 µL RDNase için reaksiyon tamponu solüsyonu ilave edilerek DNase reaksiyon karışımı hazırlandı, bu karışımdan 95 µL alınarak kolonun üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- g) Yıkama ve silika membranın kurutulması: 1. yıkama işleminde kolonun üzerine 200 µl RAW2 tampon solüsyonu eklendi ve 11000 g'de santrifüj edildi. 2. yıkama işleminde başka bir toplama tüpüne konulan Nükleospin[®] RNA kolonunun üzerine 600 µL

RA3 tamponu eklendi ve 11 000 g hızda 30 sn santrifüj edildi. 3. yıkama işleminde toplama tüpü değiştirilen kolon üzerine 250 µL RA3 eklendi ve 11000 g hızda 2 dk santrifüjlendi.

h) RNA'nın ayrıştırılması: 1.5 mL' lik nükleaz içermeyen toplama tüpü içine yerleştirilen kolonun üzerine 60 µL RNase içermeyen su eklenerek 11000 g hızda 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen RNA – 80 °C' de muhafaza edildi.

3.5.2. cDNA Sentezi

Elde edilen mRNA'dan GoScript™ Reverse Transcription System (A5000, Promega, USA) kiti ile cDNA sentezi elde edildi. cDNA sentezinde kullanılan malzeme ve miktarları Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler

İçerik	Miktar (µL)
5X reaksiyon tamponu	4,0
MgCl ₂ (son konsantrasyonu 1,5-8 mM)	4,8
dNTP (0,5 mM)	1,0
Ribonükleaz inhibitörü (reaksiyon ortamında 20 U)	0,5
Reverse transkriptaz	1,0
Ultra saf steril su	3,7

Yapılan tüm pipetleme işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Sentez işleminde aşağıdaki işlemler uygulandı:

1) Elde edilen mRNA (en fazla 5 µg / reaksiyon), Primer Oligo (dT)₁₅ (en fazla 5 µg / reaksiyon) ve nükleaz içermeyen steril sudan oluşan karışım toplam hacimde 5 µL olarak hazırlandı. mRNA ve primerler 70 °C'de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra buz üzerinde soğutuldu.

2) Buz üzerinde revers transkripsiyon reaksiyon karışımı Tablo 9'da verilen malzeme ve miktarda toplam hacmi 15 µL olacak şekilde hazırlandı.

3) 15 µL revers transkripsiyon reaksiyon karışımı, hazırlanan 5 µL RNA ve primer karışımıyla toplam hacim 20 µL olacak şekilde birleştirildi ve 25 °C’de 5 dk bekletildi.

4) Daha sonra bu karışım 42 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sentezlenen cDNA’lar real time polimeraz zincir reaksiyonu (rPCR) işleminde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

3.5.3. Real Time PCR

Gen ekspresyonunun normalize edilmesinde house keeping geni olarak Rpl 19 kullanıldı (Rn00821265, Applied Bioscience, USA). Nükleer kalite markerleri olarak histon (Hist1A1, Rn00561384, Applied Bioscience, USA) ve protamin (Prm1, Rn02345725, Applied Bioscience, USA) primerlerinin ekspresyonlarının ölçümü için Light Cycler 480 II Roche (Light Cycler® 480 Instrument II) marka cihaz kullanıldı. Ortama konulan karışımdaki kimyasallar ve miktarları Tablo. 10’ da gösterildi.

Real time PCR işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi: 50 °C 2dk, 95 °C 10 dk, 40 cycle 95 °C 15 sn 60 °C 1 dk ve 72 °C 1 sn, 40 °C 30 sn basamakları uygulandı (Tablo 11). $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak katlanma değişimi (fold-change) hesaplaması yapıldı.

Tablo 10. Real-Time PCR reaksiyonunda kullanılan karışım ve miktarları

Kullanılan Malzemeler	Miktar (µL)
Rnase-Free su	6
2X TaqMan universal PCR MasterMix	10
20X Hist1A1 primer ve probu	1
20X Prm1 primer ve probu	1
20X Rpl 19 primer ve probu	1
cDNA örneği	2
Toplam hacim	21

Tablo 11. Real Time PCR sıcaklık koşulları

Real Time-PCR	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
UDG inkübasyonu	50	2 dk	1
AmpliTaq Gold, UP Enzim Aktivasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Uzama	60	1 dk	1
	72	1sn	
	40	30	

3.6. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler

3.6.1. Doku Homojenizasyonu

Doku homojenizasyonunda kullanılmak üzere 20 mM 1L sodyum fosfat ve 140 mM potasyum klorür kullanılarak pH'sı 7.4 olan homojenizasyon tamponu hazırlandı. Alınan her bir testis dokusundan 100 mg doku üzerine hazırlanan bu tampondan 1 mL eklenerek homojenize edildi ve homojenatlar daha sonra 800 g'de 10 dk 4 °C sıcaklıkta santrifüj edildi. Bu işlemler sonrasında elde ettiğimiz süpernatantlar ile Tiyobarbitürik asit reaktif susbstans (TBARS) ve toplam tiyol tayini yapıldı (Rojas vd., 2012).

3.6.2. TBARS Tayini

3.6.2.1. Deneyin Yapılışı

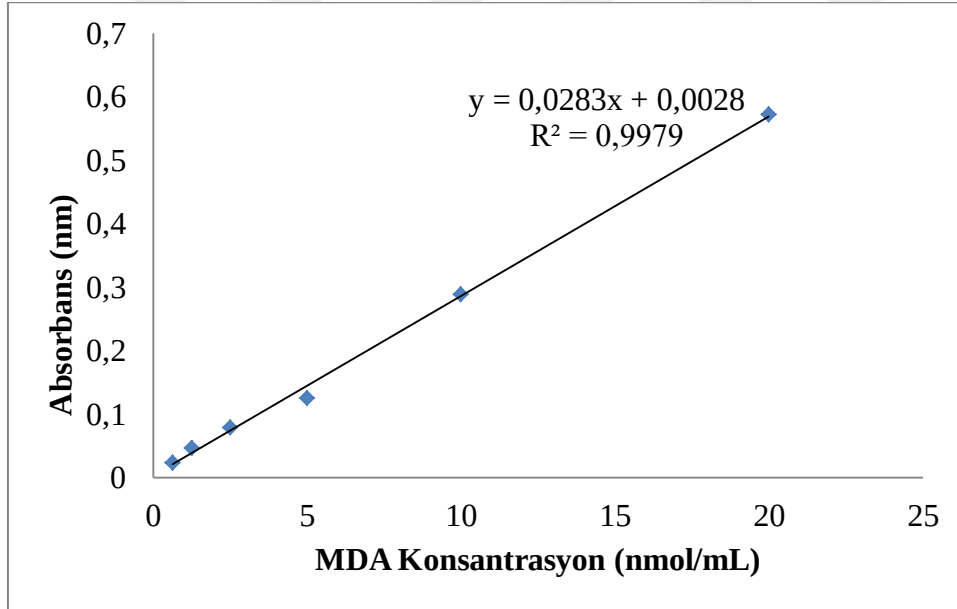
Serbest hidroksil radikallerinin son ürünü olan malondialhehid (MDA), lipid peroksidasyonun belirtecidir ve TBARS tayini ile ölçülmektedir (Rojas vd., 2012). TBARS tayini Ohkawa vd., (1979) yöntemine göre yapıldı. Her bir örnek için:

- 200 µL testis dokusu süpernatantı
- 50 µL %8.1 sodyum dodesilsülfat (SDS)
- 375 µL %20'lik asetik asit (Merck) (v/v), pH 3.5
- 375 µL %0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA) (Merck) alınarak ependorflara konuldu ve tüm solüsyonlardan verilen miktarlarda bir karışım hazırlandı ve vortekslendi.

Ependorflardaki doku örnekleri reaksiyon için sıcak su banyosunda (95 °C) 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 5 dk buzlu suda soğutuldu ve 750 g devirde 10 dk santrifüj edildi. Soğutulan örnekler 96 kuyucuktan oluşan plakalara pipetlendi ve 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. TBARS konsantrasyonu nmol/gr doku olarak hesaplandı (Rojas vd., 2012). TBARS standart grafiği çizildi.

3.6.2.2. Standart Çözeltiler

Standart eğrisi oluşturulmak üzere standart çözelti için 1,1,3,3-tetrametoksipropen kullanıldı. 82.5 µL 1,1,3,3-tetrametoksipropen ve 0.01 M 50 mL hidroklorik asit (HCl) (Merck) ile karıştırılarak bir çözelti elde edildi ve 50 °C sıcaklıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan bu ana stok çözeltilerden sırasıyla 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı (Rojas vd., 2012).



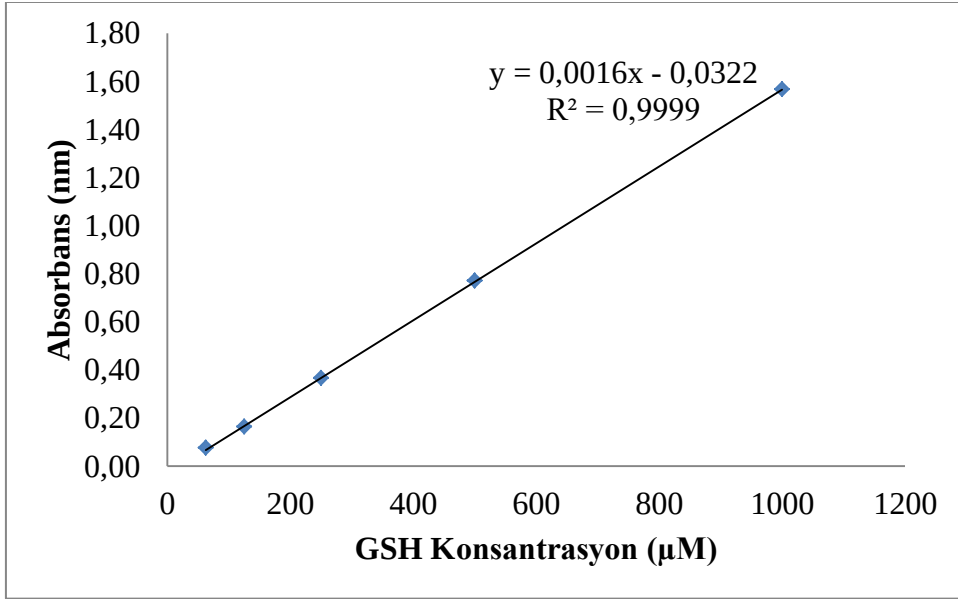
Şekil 6. Doku ve serum TBARS standart grafiği

3.6.3. Toplam Tiyol Miktarının Tayini

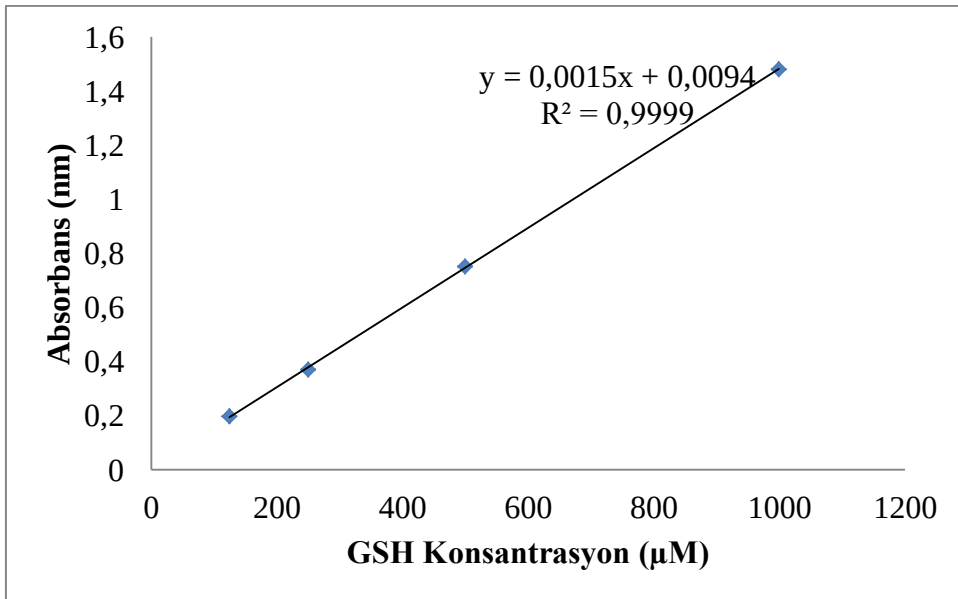
Testis dokusunda toplam tiyol tayini için Ellmann yöntemi kullanıldı (Ellmann, 1959). Dokuda Ellmann ayırıcı kullanılarak -SH grupları belirlendi. Bu analiz için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- Ellmann ayırıcı hazırlandı: 4 mg Ditiyobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB) (Alfa aesar), %1'lik sodyum sitrat çözeltisi içinde çözüldü.

- 250 µL doku süpernatantı üzerine 1000 µL 3M Na₂HPO₄ ve 250 µL DTNB çözeltisi eklenerek vortekslendi.
- 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Veriler 1000 µM- 62.5 µM aralığındaki standart çözeltiler kullanılarak standart grafiği oluşturuldu ve sonuçlar nmol/gr doku olarak verildi.



Şekil 7. Doku toplam tiyol tayini standart grafiği



Şekil 8. Serum toplam tiyol tayini standart grafiği

3.6.4. Testosteron Ölçümü

Serum örnekleri hazırlanan standart ve reaktiflerle 96'lık ELISA kiti (CEA458Ge, 96 test, USCN, USA) kit protokolüne uygun olarak kuyucuklara eklendi, kit protokolündeki basamaklar uygulanarak ELISA okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizler için SPSS programı (SPSS statistics, IBM, Armonk, NY) kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow-Simirnov testi ile belirlendi. Biyokimyasal bulgularda ANOVA, post hoc-ANOVA testi, histopatolojik hasar skorlaması ve semikantitatif analiz sonuçların hesaplanmasında Kurskal Wallis/Tamhane T2 testi uygulandı. Moleküler analizlerde ise post hoc-ANOVA Tukey HSD testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyama bulguları

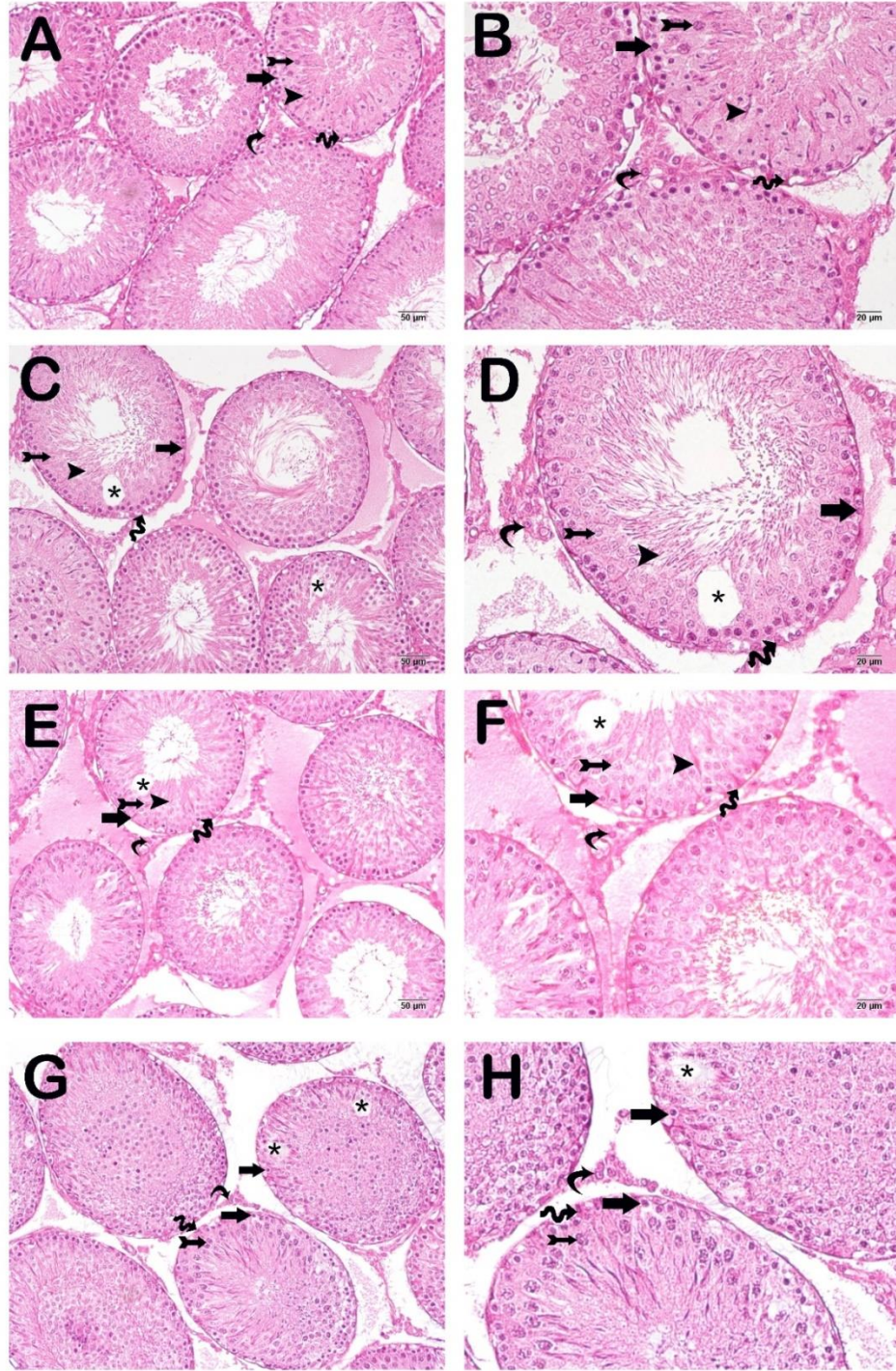
Çalışmamızın H&E boyama analiz sonuçlarına göre histopatolojik bulgularımızda kontrol grubu grubu testis dokularının seminifer tübül yapısı ve spermatogenik germ hücre döngüsünün normal seyrinde olduğu gözlemlendi. Tübül etrafındaki etrafındaki myoid hücrelerin yassı çekirdekli, Sertoli hücrelerinin nükleusunun heterokromatin görünümde ve belirgin bir nükleolusa sahip olduğu, interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinin sitoplazmasının eozinofilik normal görünümde olduğu görüldü. Tübül içindeki çeşitli evrelerde bulunan spermatogonyum, primer spermatosit, spermatid ve spermatozoon hücre serilerinin olağan seyrinde oldukları gözlemlendi. İmatinib-20, İmatinib-40 ve İmatinib-60 gruplarında seminifer tübül germinal epitelinde ödematoz alanlar görüldüğü, bunun yanı sıra İmatinib-20 grubunda az miktarda germinal epitelin azaldığı tespit edildi (Resim 3).

Testis dokusunda histopatolojik hasar tespitinde dokulara Johnsenn skorlaması uygulandı (Tablo 5). Kontrol grubuna kıyasla İmatinib-20 ($p=0.5$) ve İmatinib-40 gruplarında Johnsen skoru bakımından istatistiksel bir fark bulunmadı, fakat İmatinib-60 ($p=0.005$) grubunda anlamlı azalma tespit edildi (Tablo 12).

Tablo 12. Johnsen skorlama bulguları

Grup	Johnsen Skoru
Kontrol	10(9-10)
İmatinib-20	9(9-9.5) ^a
İmatinib-40	9(8.5-9) ^b
İmatinib-60	8.5(8-9) ^c

^a $p=0.5$ kontrol grubuna kıyasla,
^b $p=0.128$ kontrol grubuna kıyasla,
^c $p=0.005$ kontrol grubuna kıyasla,



Resim 3. H&E ile boyanmış testis dokusuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogonyumlar (ok), primer spermatositler (kuyruklu ok), spermatozonlar (ok başı), Sertoli hücresi (spiral ok), Leydig hücresi (kıvrık ok). **A(x20)-B(x40):** Kontrol grubu. **C(x20)-D(x40):** İmatinib-20 grubu. **E(x20)-F(x40):** İmatinib-40 grubu. **G(x20)-H(x40):** İmatinib-60 grubu.

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Semikantitatif Bulgular

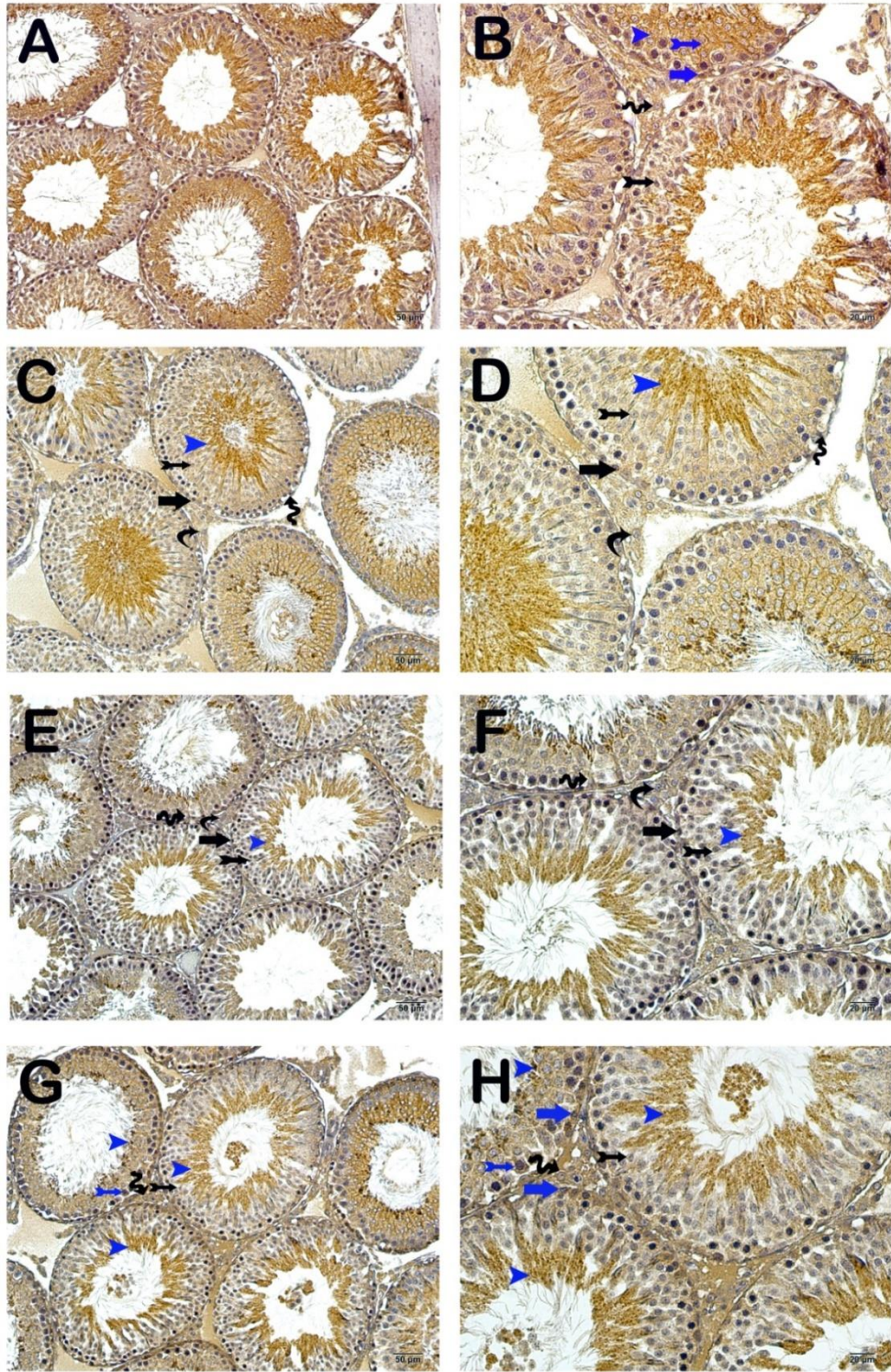
İmmünohistokimyasal boyanan dokular Tablo 7'deki immünohistokimyasal pozitivite derecelendirme metodu kullanılarak skorlandı. Anti-8-OHdG, anti-PDGF, anti-c-kit ve TUNEL boyama sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 13).

Tablo 13.Semikantitatif bulgu sonuçları

Grup	8-OHdG pozitivite skoru	PDGF pozitivite skoru	c-kit pozitivite skoru	TUNEL pozitivite skoru
Kontrol	0(0-0)	1(1-1)	2(2-2)	0(0-0.5)
İmatinib-20	0(0-0.5)	1(1-1)	2(1.5-2)	0(0-0)
İmatinib-40	0(0-1)	1(0.5-1)	2(2-2)	0(0-0)
İmatinib-60	0(0-1)	1(1-2)	2(2-3)	0(0-0)

4.2.2. Anti-c-kit Antikor Boyama Bulguları

Dokulara uygulanan anti-c-kit antikor, tüm gruplarda germ hücrelerinden yuvarlak ve uzamış spermatidlerde ve spermatozoonlarda yoğun tutulum görüldü (Resim 4). Kontrol grubuna kıyasla İmatinib-20, İmatinib-40 ve İmatinib-60 gruplarının pozitivite skorlamasında anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 13).

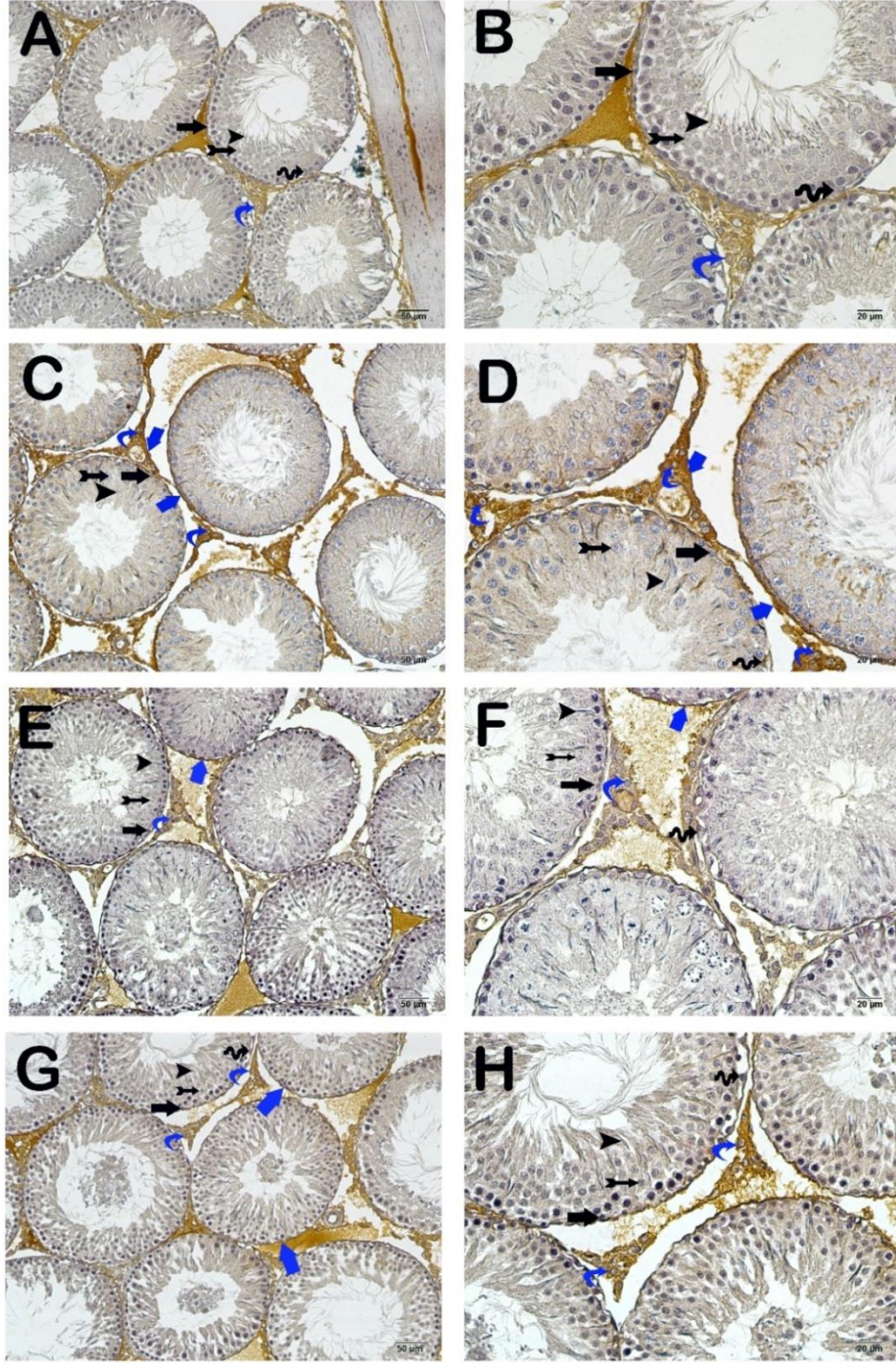


Resim 4. İHC yöntemi ile c-kit primer antikoru uygulanmış testis dokusuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogonyumlar (ok). Primer spermatositler (kuyruklu ok). Spermatozoonlar (ok başı). Sertoli hücresi (spiral ok). Leydig hücresi (kivrık ok). **A(x20)-B(x40):** Kontrol grubu. **C(x20)-D(x40):** İmatinib-20 grubu. **E(x20)-F(x40):** İmatinib-40 grubu. **G(x20)-H(x40):** İmatinib-60 grubu.

4.2.3. Anti-PDGF Antikor Boyama Bulguları

Kontrol grubu testis dokusuna ait kesitlerde seminifer tübüller, spermatogenetik hücreler ve Sertoli hücreleri normal yapıda gözlemlendi. İntertübüler alanlarda Leydig hücresinde ve miyoepitelial hücrelerinde PDGF pozitivitesi görüldü (Resim 5 A-B).

İmatinib-20 grubundaki testis dokusuna ait kesitlerde Leydig hücresinde ve miyoepitelial hücrelerde PDGF pozitivitesi izlendi (Resim 5 C-D). İmatinib-40 grubuna ait testis dokusu kesitlerinin seminifer tübüllerinde çok sayıda spermatogonyumlarda, primer spermatositlerde, spermatozoonlarda ve Sertoli hücrelerinde herhangi bir immünpozitivite izlenmedi. Bununla beraber Leydig hücrelerinde PDGF pozitivitesi görüldü (Resim 5 E-F). İmatinib-60 grubuna ait testis dokusu kesitlerinde PDGF immünnegatif germinal epitel görülmekteyken, Sertoli ve Leydig hücrelerinin sitoplazmasında PDGF pozitivesi gözlemlendi (Resim 5 G-H). PDGF boyanan kesitlerin pozitivite skorlamasında tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 13).

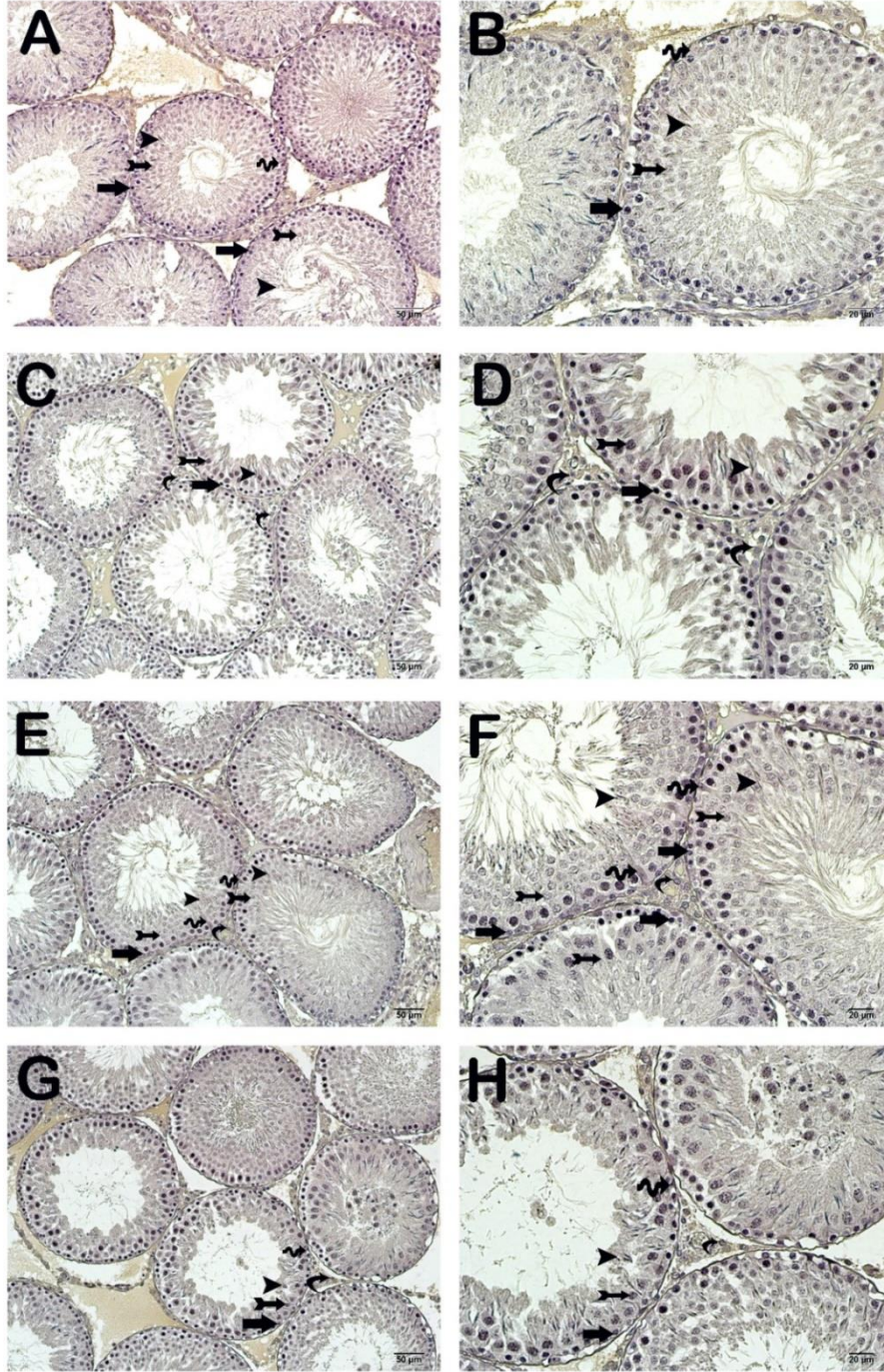


Resim 5. İHC yöntemi ile PDGF primer antikoruna uygulanmış testis dokusuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogonyumlar (ok). Primer spermatositler (kuyuklu ok). Spermatozonlar (ok başı). Sertoli hücresi (spiral ok). Leydig hücresi (kıvrık ok). **A(x20)-B(x40):** Kontrol grubu. **C(x20)-D(x40):** İmatinib-20 grubu. **E(x20)-F(x40):** İmatinib-40 grubu. **G(x20)-H(x40):** İmatinib-60 grubu.

4.2.4. Anti-8-OHdG Antikor Boyama Bulguları

Kontrol grubunda seminifer tübüllerdeki spermatogenetik hücreler, Sertoli hücreleri ve intertübüler alanlardaki Leydig hücreleri normal yapıda izlendi (Resim 6 A-B). İmatinib-20 grubuna ait testis dokusu kesitlerinde ise seminifer tübüllerde 8-OHdG immünnegatif spermatogenetik hücreler, Sertoli ve Leydig hücreleri görüldü (Resim 6 C-D). İmatinib-40 grubuna ait testis dokusu kesitlerinde seminifer tübül epitelinde çok sayıda spermatogonyumlar, primer spermatositler, spermatozoonlar ve Sertoli hücrelerinde herhangi bir immünpozitivite izlenmedi (Resim 6 E-F). İmatinib-60 grubuna ait testis dokusu kesitlerinde 8-OHdG immünnegatif, Sertoli ve Leydig hücreleri görüldü (Resim 6 G-H).

DNA hasarı belirteci olan 8-OHdG antikor ile işaretlenen testis dokusuna ait tüm gruplar arasında pozitivite skorlaması bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 13).

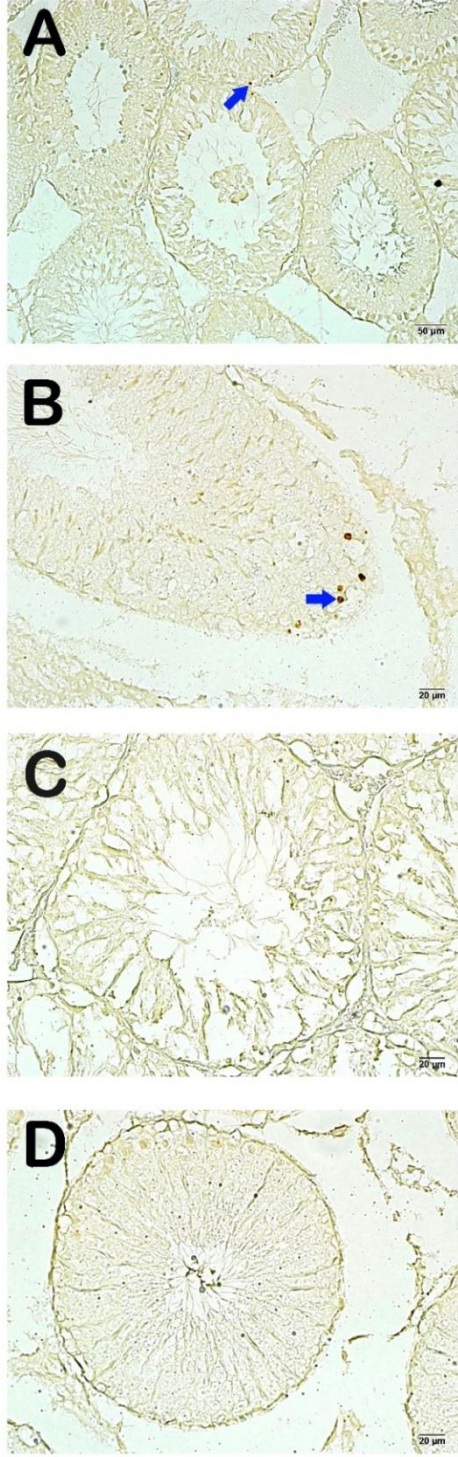


Resim 6. İHC yöntemi ile 8-OHdG primer antikoru uygulanmış testis dokusuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogonyumlar (ok). Primer spermatositler (kuyruklu ok). Spermatozoonlar (ok başı). Sertoli hücresi (spiral ok). Leydig hücresi (kivrık ok). **A(x20)-B(x40):** Kontrol grubu. **C(x20)-D(x40):** İmatinib-20 grubu. **E(x20)-F(x40):** İmatinib-40 grubu. **G(x20)-H(x40):** İmatinib-60 grubu.

4.3. TUNEL Analiz Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan TUNEL metodu boyamada kontrol grubu testis dokusunda seminifer tübül epitel hücreleri normal yapıda olup birkaç apoptotik germinal epitel izlendi (Resim 7 A). İmatinib-20 grubunda seminifer tübül epitel hücrelerinin olağan yapıda olduğu ve çok az sayıda apoptotik epitel hücreler olduğu görüldü (Resim 7 B). İmatinib-40 grubu seminifer tübül epitel hücrelerinin tipik yapıda olduğu izlendi (Resim 7 C). İmatinib-60 grubunda testis dokusuna ait kesitlerde TUNEL negatif germinal epitel hücreleri, Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri tespit edildi (Resim 7 D). Kontrol, İmatinib-20, İmatinib-40 ve İmatinib-60 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 13).





Resim 7. Testis dokusuna ait kesitlerde apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılan TUNEL yönteminin ışık mikroskopik görüntüsü. **A(x20):** Kontrol grubu. **B(x40):** İmatinib-20 grubu. **C(x40):** İmatinib-40 grubu. **D(x40):** İmatinib-60 grubu.

4.4. Sperm Sayımı Bulguları

Toplam sperm sayımında kontrol grubunun sperm sayısına kıyasla İmatinib-20 grubunda belirgin bir azalma bulundu ($p= 0,001$). Ancak İmatinib-40 ve İmatinib-60 gruplarında anlamlı bir fark gözlenmedi. İlaç grupları arasında İmatinib-20 grubuna göre İmatinib-60 grubuna ($p= 0,01$) ait sperm sayısında artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 14).

Tablo 14. Toplam sperm sayısı bulguları

Gruplar	Toplam sperm sayısı (10^6)
Kontrol	$17,37 \pm 0,90$
İmatinib-20	$10,06 \pm 1,75^a$
İmatinib-40	$14 \pm 0,88$
İmatinib-60	$16,08 \pm 0,66^b$

^a $p= 0,001$; İmatinib-20 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^b $p= 0,01$; İmatinib-60 grubu İmatinib-20 grubuna kıyasla,

4.5. Biyokimyasal Analiz Bulguları

4.5.1. TBARS Analiz Bulguları

TBARS analiz sonuçlarına göre testis dokusunda kontrol grubuna göre İmatinib-20 grubunda anlamlı bir artış görülürken ($p= 0.014$), İmatinib-60 grubunda önemli bir azalma görüldü ($p= 0.027$). Ancak İmatinib-40 grubunda istatistiksel bir fark gözlemlenmedi. Testis dokusuna ait sonuçlarda İmatinib-20 grubuna göre İmatinib-40 ($p= 0.005$) ile İmatinib-60 gruplarındaki ($p= 0.000$) azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 15).

TBARS serum analizlerinde kontrol grubu sonuçlarına kıyasla İmatinib-20 grubu ($p= 0.003$) değerinde anlamlı bir artış olduğu fakat İmatinib-40 ve İmatinib-60 değerlerinde istatistiksel bir anlam olmadığı tespit edildi. Fakat İmatinib-20 grubunun diğer gruplara kıyasla TBARS seviyesindeki artışı anlamlı bulundu ($p=0.003$) (Tablo 15).

Tablo 15. TBARS testis dokusu ve serum analiz bulguları

Parametre	Kontrol	İmatinib-20	İmatinib-40	İmatinib-60
Doku TBARS (nmol/gr doku)	6.21 ±1.21	7.93 ±1.33 ^{a,b,c}	6.06 ±1.22 ^e	4.63 ±1.05 ^d
Serum TBARS (nmol/mL)	0.53 ±0.09	0.67 ±0.05 ^f	0.53 ±0.07 ^g	0.56 ±0.10 ^h

^a*p*= 0.014; İmatinib-20 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^b*p*= 0.005; İmatinib-20 grubu İmatinib-40 grubuna kıyasla,
^c*p*= 0.000; İmatinib-20 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,
^d*p*= 0.027; İmatinib-60 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^e*p*= 0.031; İmatinib-40 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,
^f*p*= 0.003; İmatinib-20 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^g*p*= 0.003; İmatinib-20 grubu İmatinib-40 grubuna kıyasla,
^h*p*= 0.003; İmatinib-20 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,

4.5.2. Toplam Tiylol Analiz Bulguları

Testis dokusu toplam tiylol grubu analiz sonuçlarında İmatinib-20, İmatinib-40 ve İmatinib-60 gruplarının değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 16).

Serum toplam tiylol seviyelerinin İmatinib-60 grubunun kontrol grubuna göre önemli ölçüde anlamlı olarak azaldığı (*p*= 0.000) fakat İmatinib-40 grubunun kontrol grubuna göre artış gösterdiği bulundu (*p*= 0.005). İmatinib-20 grubunda kontrol grubuna kıyasla görülen azalma anlamlı değildi (Tablo 16).

Tablo 16. Toplam tiyol testis dokusu ve serum analiz bulguları.

Parametre	Kontrol	İmatinib-20	İmatinib-40	İmatinib-60
Doku Tiyol (nmol/gr doku)	1.31 ±0.10	1.22 ±0.09 ^a	1.24 ±0.15 ^b	1.20 ±0.12 ^c
Serum Tiyol (nmol/mL)	393± 58	386± 92 ^{d,e}	464± 80 ^{f,g}	227± 38 ^h

^a $p= 0,135$; İmatinib-20 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^b $p= 0,240$; İmatinib-40 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^c $p= 0,080$; İmatinib-60 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^d $p= 0.037$; İmatinib-20 grubu İmatinib-40 grubuna kıyasla,
^e $p= 0.000$; İmatinib-20 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,
^f $p= 0.005$; İmatinib-40 grubu kontrol grubuna kıyasla,
^g $p= 0.000$; İmatinib-40 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,
^h $p= 0.000$; İmatinib-60 grubu kontrol grubuna kıyasla,

4.5.3. Testosteron Analiz Bulguları

Testosteron seviyesi ölçümlerinde kontrol grubuna kıyasla İmatinib-60 grubunda anlamlı bir artış görülürken ($p= 0,007$), İmatinib- 20 grubundaki artış ve İmatinib-40 grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamdı değildi. İmatinib-60 grubu, İmatinib-20 ($p= 0,039$) ve İmatinib-40 ($p= 0,001$) gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi (Tablo 17).

Tablo 17. Testosteron analiz bulguları.

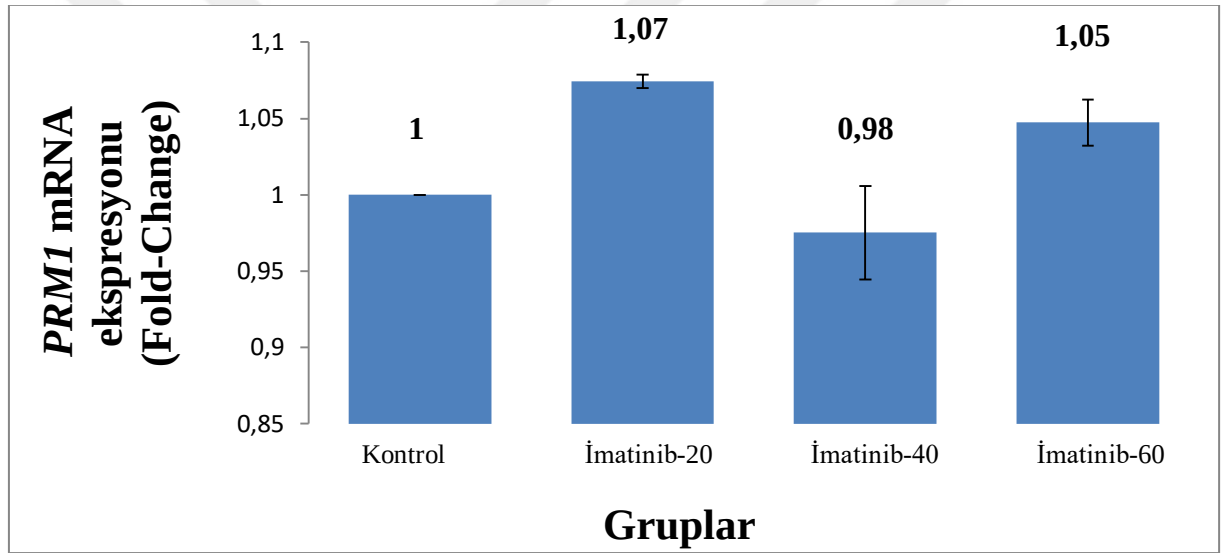
Parametre	Kontrol	İmatinib-20	İmatinib-40	İmatinib-60
Testosteron serum (pg/mL)	840± 1,47	841± 1,90 ^a	839± 0.26 ^b	844± 5,03 ^c

^a $p= 0,039$; İmatinib-20 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,
^b $p= 0,001$; İmatinib-40 grubu İmatinib-60 grubuna kıyasla,
^c $p= 0,007$; İmatinib-60 grubu kontrol grubuna kıyasla,

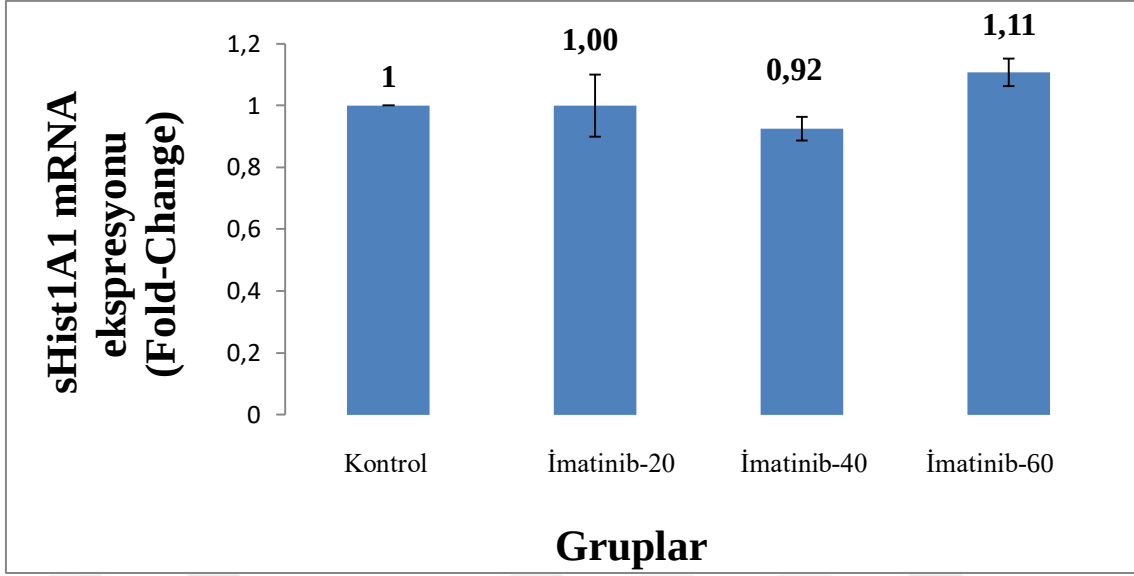
4.6. Real Time Analiz Bulguları:

Testis dokularının moleküler analizlerinde, protamin ekspresyonunda kontrol grubuna göre İmatinib-20 ve İmatinib-60 gruplarında artış görüldü fakat İmatinib-40 grubunda bir değişim gözlenmedi. Kontrol ve İmatinib-20 grupları arasında p değeri 0.003, kontrol grubu ile İmatinib-60 grubu arasındaki p değeri 0.036 olarak bulundu (Şekil 9).

Histonun eksprese edilmesinde ise; kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar arasında farklılık bulunmadı fakat İmatinib-60 grubu ekspresyonunda İmatinib-40 grubuna göre yükselme olduğu tespit edildi. İmatinib-40 ve İmatinib-60 grupları arasındaki p değeri 0.02 olarak tespit edildi (Şekil 10).



Şekil 9. Kontrol ve İmatinib-20, İmatinib-40, İmatinib-60 gruplarının testis dokularındaki protamin (PRM1) ekspresyonu.



Şekil 10. Kontrol ve İmatinib-20, İmatinib-40, İmatinib-60 gruplarının testis dokularındaki histon (sHist1A1) ekspresyonu.

5. TARTIŞMA

Prenatal dönemde gebe hastalarda ilaç kullanımının, fetüs üzerinde olası teratojenik etkilere yol açabileceği endişesi çoğu hastalığın tedavi süreci açısından önem taşımaktadır. Literatür incelendiğinde imatinibin prenatal dönemde kullanılmasına ilişkin farklı etkilerinin olduğu görülmektedir. Gebelik döneminde imatinibin teratojenitesine karşı hastaların bilgilendirilmesi ve koruyucu önlemler alınması gerektiği bildirilmektedir (Hensley ve Ford, 2003). Jain vd. (2015) tedavi boyunca gebelik dönemi de dahil olmak üzere uzun süre imatinib kullanan kadın hastanın, ilk gebeliğinde ektopik gebelik görüldüğü fakat ikinci gebelikte 35 haftalık doğan erkek bebekte sağ dış kulak malformasyonu, preauricular tag, angular oris kas eksikliği, imperfore anüs, sipina bifida okült, sağ böbrek eksikliği ve ektopik sol böbrek gibi teratojenik etkilerin görüldüğünü bildirmişlerdir. Başka bir vaka raporunda ise; günde 400 mg imatinib kullanan kadın hastanın 6 haftalık gebe olduğu anlaşıldığında ilacın kesildiği, meningosel teşhisi konulan fetüsün ölü olarak dünyaya geldiği gösterilmiştir (Choudhary vd., 2005). Tedavi sırasında gebe kalan ve gebeliğin yaklaşık 4-9. haftaları arasında imatinibe maruz kalan kadın hastaların bebeklerinin birinde hipospadias, başka bir bebekte ise ince barsağında orta dereceli rotasyon görüldüğü bildirilmiştir (Ault vd., 2006). Prenatal dönemde sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada prenatal 6-13. günlerde ve 13-19. günlerde 36 mg/kg ve 54 mg/kg dozlarında imatinib uygulanmış ve prenatal 20. günde sonlandırılan deneyde 54 mg/kg uygulanan fetüslerde imatinibin implantasyon öncesi ve sonrası kayıplarda, düşük yüzdesinde ve rezorpsiyonlarda artışa neden olduğu; ayrıca imatinibe maruz kalan fetüslerde ön ve arka uzuvlarda malformasyonlar, eksensefali, ensefalosel, iskelet sistemine ait bazı kemiklerde tamamlanmamış ossifikasyon gibi teratojenik etkiler gösterilmiştir (El Gendy vd., 2015). Carlier vd. (2017) yaptıkları çalışmada paternal imatinib maruziyeti sonrasında oluşan gebeliklerde kardiyomiyopati, renal ve üriner sistem anomalilerine rastlamışlardır. Başka bir çalışmada ise 28. haftada imatinib tedavisine başlanan gebe hastadan doğum sırasında alınan kordon kanı, amniyotik sıvı ve plasentadan alınan örneklerde düşük seviyelerde imatinibe rastlanılmış olmasına rağmen neonatal idrarda yüksek miktarda imatinib tespit edilmiştir ve metaboliti olan N-desmethyl imatinib ise anne sütünde yüksek oranda bulunmuştur (Burwick vd., 2017). Sadece KML hastalarında değil aynı zamanda GİST tedavisinde kullanılan imatinibin, 16 haftalık GİST teşhisi konulan hasta vakasında fetüse olası teratojenik etkilerden kaçınılması gerektiği önerilmektedirler (Charo vd., 2018).

Bu bilgilerin aksine Russell vd. (2007) gebeliğin ilk 4 haftasında imatinib kullanan KML hastasında ilaç uygulaması kesilmiş, gebeliğin ilerleyen döneminde lökositoz ve trombositoz geliştiren hastaya imatinibin tekrar başladığı ve doğum öncesi herhangi bir komplikasyon geliştirmeyen kız bebeğin dünyaya geldiğini fakat organogenez döneminde imatinib maruziyetinden kaçınılması gerektiğini bildirmişlerdir. Ali vd. (2005) 400 mg imatinib kullanan KML hastasında, tedavinin 4. ayında hastanın 8 haftalık gebe olduğu görüldüğünde imatinib kullanımı durdurulmuştur, 38 haftalık dünyaya gelen kız bebekte herhangi bir komplikasyon görülmediği bildirilmiştir. Alkindi vd. (2005)'nin çalışmasında iki farklı vakada imatinib kullanan hastalar gebelik döneminde de ilaca devam etmişlerdir, bebekler düşük kiloda doğmasına rağmen herhangi bir malformasyon görülmediği belirtilmiştir. İmatinib tedavisi sırasında 2 gebelik dönemi yaşayan hastanın ilk gebeliğinde 4. haftada, ikinci gebeliğinde ise 3. haftada imatinib kesilmiştir fakat bebeklerde doğum defekti ve doğum sonrası yan etkiler gözlemlenmemiştir (Garderet vd., 2007). Webb ve Jafta (2012)'nin çalışmasında iki ayrı vakanın ilkinde imatinib kullanan hasta hamile kalma isteği nedeniyle imatinib tedavisini keserek gebelik boyunca interferon kullanmıştır, prematüre dünyaya gelen bebekte görülen foramen ovale ve duktus arteriosus açıklığı görülmesine rağmen gelişimi takip edilen bebekte klinodaktil dışında bir malformasyon görülmemiştir; ikinci vakada ise imatinib tedavisi gören hastanın 8 haftalık hamile olduğu saptanmış 400 mg/gün dozajında tedaviye devam edilmiş, yine düşük kilodaki bu bebekte klinodaktil haricinde morfolojik olarak normal olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise gebeliğin ilk 5 ayında imatinib kullanan hastanın bebeği, 8 yaşına kadar izlenmiş ve herhangi bir malformasyona rastlanılmamıştır (Sheng ve Sun, 2016). Law vd. (2017)'nin bildirdikleri vaka raporlarında 10 yıl boyunca 400 mg/gün imatinib kullanan bir KML hastası, gebe kalma isteğiyle 6 ay önce imatinib tedavisini keserek interferon kullanmaya başlamıştır ve sağlıklı bir bebek dünyaya getirmiştir; başka bir vakada ise imatinib tedavisinde gebe kalan bir hasta imatinibin fetüsün olası teratojenik etkilerine karşı bilgilendirilmiş ve gebeliği sonlandırmayı seçmişlerdir, diğer vaka da ise plansız gebe kalan (4 haftalık) imatinib kullanan KML hastası, gebeliğin geri kalan süresinde ilaç kullanımından uzak durarak komplikasyon görülmeyen bebek dünyaya getirdiği bildirilmiştir. Anne sütünde düşük dozlarda bulunan imatinibin, hayatlarının ilk yılındaki bebeklerin gelişimi üzerine etkileri bilinmemektedir (Chelyseva vd., 2017).

Erkek üreme sisteminde imatinibin etkilerini inceleyen bazı çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Germinal hücrelerle yapılan in vitro bir çalışmada imatinib,

spermatogonyal kök hücrelerini de içeren germline kök hücre kültürünün büyümesinde ve farklılaşmış hücrelerin sayısında azalmaya neden olurken spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenilemesinde imatinibden etkilenmediği gösterilmiştir (Heim vd., 2011). Prasad vd. (2010) yetişkin fare testisinde imatinibin histopatolojik değişikliklere neden olduğunu fakat ilacın kesilmesiyle bu değişikliklerin geri dönüşümlü olduğunu söylemişlerdir. Bizim çalışmamızdaki histopatolojik bulgularımızda imatinib verilen gruplarda germinal epitelde azalma ve ödematoz alanlar tespit edilmiştir. Buna rağmen Johnsen skorlamasına göre kontrol grubuna kıyasla İmatinib-20 ve İmatinib-40 gruplarında bir fark gözlenmezken, İmatinib-60 grubunun skorlamasındaki düşüş göze çarpmaktadır. Nurmio vd. (2007) sıçanlarda postnatal 5-7. günlerde 50 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında imatinib maruziyeti testislerde periferik yerleşimli tip A spermatogonyum sayısında azalmaya ve spermatogonyumlarda apoptoza neden olurken, hücre göçünü etkilemediğini ve epididimal sperm sayısında bir değişiklik olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da testis dokusuna ait seminifer tübüllerde bulunan spermatogonyumlarda TUNEL metodu ile işaretlenen apoptotik hücrelerin normal olduğu görülürken, gruplar arasında da anlamlı bir değişim gözlenmedi.

İmatinib kullanımı sırasında testosteron hormon seviyesiyle ilgili literatürde farklı makaleler yer almaktadır. İmatinib ile 6 ay tedavi gören erkek hastalarda testosteron seviyesinin azaldığı gözlenirken, FSH ve LH hormon seviyelerinin arttığı görülmüştür (Ghalaut vd., 2014). Tanrıverdi vd. (2012) imatinib tedavisi gören erkek hastalarda testosteron salınımının düşük seviyede olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun aksine farklı bir çalışmada imatinib tedavisi gören erkek hastada testosteron seviyesinde bir farklılık olmadığı gösterilmektedir (Seshadri vd., 2004). Yine başka bir çalışmada genç erkek hastada, puberte öncesi uzun süreli imatinib kullanımı sonrasında testosteron seviyesinin normal düzeyde olduğu belirtilmiştir (Mariani vd., 2011). Tauer vd. (2014)'ün yaptığı çalışmada da benzer olarak adölesan sıçanlarda uzun süreli imatinib kullanımının testosteron hormonunun salınmasında bir değişiklik göstermediği bildirilmektedir. Chang vd. (2017)'nin bulgularına benzer olarak bizim çalışmamızda da kontrol, İmatinib-20 ve İmatinib-40 grupları arasında testosteron seviyesinde bir farklılık bulunmazken, İmatinib-60 grubunun testosteron seviyelerinin, diğer gruplara kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi.

İnsan testis dokusunda c-kit' in immünohistokimyasal boyamalarla tip A spermatogonyumlarda, yuvarlak spermatidlerin akrozomal granüllerinde ve Leydig hücrelerinde pozitif boyandığı, bunun yanında hem normal hem de subfertil bireylerde Sertoli hücrelerindeki boyanma farklılığı gözlenmiştir (Sandlow vd., 1996). Sandlow vd. (1997) yaptığı diğer bir çalışmada fare, sıçan ve insan türlerinde c-kit'in erken spermatogenik hücrelerde, Leydig hücrelerinde, yuvarlak spermatidlerin akrozomal granüllerinde ve tübül içerisindeki spermatozoonların akrozomal bölgesinde çeşitli miktarlarda eksprese edildiğini göstermişlerdir. C-kit'in, spermatogenezin maturasyon aşamasındaki uzamış spermatid evresinde ve epididimal spermatozoonlarda da görüldüğü belirtilmiştir (Albanesi vd., 1996). Çalışmamızdaki tüm gruplarda immünohistokimyasal olarak işaretlenen c-kit, literatüre benzer olarak yuvarlak spermatid ve testiküler spermatozoonlarda yoğun olarak boyandı fakat boyama analizlerinde histopatolojik skorlamada bir fark izlenmedi.

PDGF- α 'nın erken testiste morfolojik ve hücresel gelişiminde önemli bir görev almasının yanı sıra endotel hücrelerinin düzenlenmesi, testis kordlarının ayrılması, proliferasyon, hücre göçü ve Leydig hücresinin gelişimi gibi bir çok önemli olayda rol aldığı belirtilmektedir (Brennan vd., 2003). Basciani vd. (2002) yaptığı çalışmada hem fetal hemde yetişkin testiste Sertoli ve Leydig hücrelerinde, bunun yanı sıra yetişkin testisinde perimyoidal hücreler, spermatositler ve spermatozoonlarda PDGF'ler ve ligandlarının testis içinde immünohistokimyasal olarak işaretlenmesinin PDGF'nin bir hedef veya diğer hücreler için büyüme faktörü olabileceği görüşünü belirtmişlerdir. İmatinibin testiste Leydig hücrelerinin canlılığını azalttığı ve PDGF seviyelerini artırdığı, PDGF' nin Leydig hücresinin gelişimi ve fonksiyonu açısından önemli olduğu ve düzenli spermatogenezde rol oynadığı belirtilmektedir (Kheradmand vd., 2016). Aynı zamanda imatinibin neden olduğu anormal düzeylerdeki PDGF salınımının üremede aksaklıklar ve infertiliteyle ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Kheradmand vd., 2016). Bu çalışmada immünohistokimyasal anti-PDGF boyamasında, seminifer tübüller arasında yer alan Leydig hücreleri ve perimyoidal hücrelerde yoğun tutulum gördük fakat gruplar arasında pozitivite skorlamasında bir fark gözlemlenmedi.

İmatinibin oksidatif stres seviyesini artırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Al-Rasheed vd., 2017; Emadi vd., 2019). Bizim çalışmamızda da biyokimyasal bulgulardaki TBARS ölçümlerine göre, testis dokusunda kontrol grubuna kıyasla İmatinib-20 grubunda

oksidatif stresin arttığını bulduk ancak İmatinib-60 grubunda azaldığını tespit ettik. Bu çalışmaların aksine karaciğer fibrozis modeli oluşturulan çalışmada imatinib verilen grupta oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir (Shaker vd., 2011). Başka bir çalışmada kalp dokusunda uygulanan imatinibin doğrudan oksidatif strese neden olmadığı bildirilmiştir (Wolf vd., 2010). Bu çalışmalara benzer olarak, serum bulgularımızda TBARS seviyelerinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda azalma olduğu bulundu fakat bu azalmanın sadece İmatinib-20 ve İmatinib-40 gruplarında anlamlı olduğu kaydedildi. Sadece imatinib değil, lösemi tedavisinde kullanılan diğer sekonder tirozin kinaz inhibitörlerinin de, diyabet modeli oluşturulan hayvanlarda pankreasta oksidatif stresi ve apoptozu azalttığı da literatürde yer almaktadır (Samaha vd., 2019).

Al-Rasheed vd. (2017) karaciğer dokusunda, imatinib verilen grubun GSH değerlerinde düşmeye neden olduğunu tespit etmişlerdir. Emadi vd. (2019) böbrekte imatinibin GSH kaynaklarını azalttığını açıklamışlardır. Testis dokusunda yaptığımız tiyol ölçümlerimizde bu çalışmaya benzer olarak imatinibin, İmatinib-60 grubunda önemli bir düşüşe neden olduğu, İmatinib-20 ve İmatinib-40 gruplarında ise anlamlı olmayan azalmayla sonuçlandığı gösterildi. Buna rağmen serumdaki bulgularımıza bakıldığında tiyol değerlerinde kontrol grubuna göre İmatinib-40 grubunda önemli bir artış fakat İmatinib-60 grubunda belirgin bir azalma olduğunu görmekteyiz. Bu biyokimyasal analizler sonucunda İmatinib-20 grubunda oksidatif stresin artışı antioksidan sistemi uyararak devreye girmesine neden olabileceğini; İmatinib-40 ve İmatinib-60 gruplarında glutatyon dışı antioksidan sistemlerinde uyarıcı bir etkisi olabileceği ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyon üzerinde baskılayıcı özelliği olabileceğini düşünmekteyiz.

Spermatidlerin spermatozoonlara dönüşümünde DNA'nın sıkı hale gelmesi gerekli olup bu sıkılaşmanın da histonlar, arjinin ve sisteinden zengin olan protamin adı verilen proteinlerin yer değiştirmesiyle meydana geldiği bilinmektedir. Ayrıca bu değişim sonucu oluşan nükleoprotamin yapısının sperm başını fiziksel ve kimyasal hasarlara karşı koruyabileceği belirtilmektedir (Braun, 2001). Protaminin sülfidril gruplarıyla çapraz bağlandığı, kromatin hacmini koruyarak dış etkilere karşı dayanıklı hale getirdiği bildirilmektedir (Ballhorn, 1982). Protamin ve histon, nükleer maturasyon ve kalite markırları olarak kullanılmaktadır (Cassault-Meyer vd., 2014). Çalışmamızdaki gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde imatinibe maruz kalan testis dokusunda protamin ve

histon ekspresyonunda farklılık olmadığını görmekteyiz. Bulgularımıza dayanarak imatinibin, spermiyohistogenez sırasında nükleer maturasyonunda bir değişim göstermediğini söyleyebiliriz.

Yapılan bazı çalışmalarda imatinibin sperm sayısında azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (Seshadri vd., 2004; Nicolini vd., 2016). Seshadri vd. (2004) hipereozinofilik sendrom nedeniyle imatinib tedavisine başlatılan genç erkek hastanın tedavi öncesi ve sonrası araştırılan sperm parametrelerinde farklılık olduğunu tespit etmişlerdir; imatinib kullanımı sonrasında sperm sayısının azaldığını göstermişlerdir. Mariani vd. (2011) imatinibin şiddetli oligozoospermiye neden olduğunu ifade etmektedirler. İmatinib kullanan KML hastalarının spermiyogramlarını inceleyen çalışmada sağlıklı bireylere göre sperm sayısının azaldığı bildirilmektedir (Chang vd., 2017). Bu çalışmalara benzer olarak çalışmamızda toplam sperm sayısına baktığımızda ise kontrol grubuna göre İmatinib-20 grubunda anlamlı bir azalma tespit edildi. Schultheis vd. (2012)'nin yaptıkları çalışmada imatinibin sıçanlarda düzenli ovulasyona ve normal sperm üretimine neden olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da sperm sayısı açısından kontrol grubuna göre İmatinib-40 ve İmatinib 60 grubunda farklılık olmadığını ve İmatinib-60 grubunun sperm sayısını İmatinib-20 grubuna göre anlamlı artış gösterdiğini saptadık.

Moura vd. (2019) yaptıkları çalışmada gebeliğin ilk haftalarında TKİ'ne maruz kalan gebe hastaların konjenital malformasyonlar göstermediğini fakat gebelik döneminde TKİ'lerin kullanılmamasını önermişlerdir. Uzun dönem imatinib kullanımının, hem gebelik döneminde kullanan hem de gebelik öncesi kullanımı kesilen dişi sıçanların plesantasında vasküler gerileme ve trofoblast tabakasında küçülme gibi olumsuz etkilere neden olduğu görülmüştür (Salem vd., 2019). İmatinibin gebeliğin 2. ve 3. trimesterinde kullanımına bağlı doğumların normal gerçekleştiği, umbilikal kandaki imatinib konsantrasyonunun maternal kandaki konsantrasyona göre düşük olduğu belirtilmiştir (Chelysheva vd., 2018a). Buna ilaveten imatinibin anne sütünde tespit edilen miktarının terapötikal dozlardan çok daha düşük miktarlarda tespit edilmesine rağmen bebeklerdeki etkileri bilinmemektedir (Chelysheva vd., 2018b). Bu bilgiler ışığında prenatal dönemde imatinib kullanımının testis dokusunda histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açabileceğini, ancak spermiogenez sırasında germ hücrelerinin nükleer olgunlaşmasında olumsuz bir etki olmadığını göstermiştir.

Pre-embriyonik dönemde karşılaşılan herhangi bir olumsuz durumda, ya hep ya hiç prensibine göre hayatta kalma veya fetal ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir (Shamy ve Tamizian, 2018). Çalışmamızda da 80 mg imatinib uygulanan grupta düzenli siklus gösteren sıçanlarda gebelik oluşmamasının, bu prensibe bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Çocuk sahibi olmak isteyen KML hastalarının tedavilerinin planlanarak anne ve çocuk sağlığı açısından olumlu etkiler gösterebileceği belirtilmektedir (Stella vd., 2019). Bazı çalışmalarda gebe kalmak isteyen KML hastalarının gebelik öncesinde TKİ'lerinin elektif biçimde kesilip doğum sonrasında devam edilmesinin KML tedavisinin aksamasına (sekel, kalıcı hasar) yönelik ciddi bir etki göstermeyeceğini belirtilmektedir (Lasica vd., 2019). Gebelikten önce TKİ tedavisini kesip, gebelik döneminde interferon- α gibi tedavilerin kullanımının güvenli olabileceği bildirilmiştir (Balsat vd., 2018).

Bu çalışmada, imatinibin gebelik boyunca kullanımının testis dokusu üzerindeki etkileri araştırıldı. Çalışmamızda bazı sınırlamalar olduğunu düşünmekteyiz. Bunlardan ilki, artan imatinib dozlarının, yavruların cinsiyeti ve doğum oranları gibi popülasyon üzerindeki etkilerin deney hayvanları sayısının az olması nedeniyle incelenememesidir. Mevcut araştırmanın, artan dozajlarda yer alan genetik ve moleküler hasar mekanizmalarını ve özellikle imatinibin 80 mg/kg'da gebeliğe neden olmamasının sebebini araştıran çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız. Bundan sonraki çalışmaların hücresel ve moleküler düzeydeki sinyal yollarını aydınlatmak için daha fazla doğrulayıcı araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Prenatal dönemde uygulanan imatinib maruziyetinin testis dokusundaki etkilerini inceleyen çalışmamızda imatinibin:

1) Histopatolojik bulgulara kontrol grubu testis dokularının seminifer tübül yapısı ve spermatogenik germ hücre döngüsünün normal seyrinde olduğu, ilaç gruplarında seminifer tübül germinal epitelinde ödematoz alanlar ve az miktarda germinal epitelin azaldığı,

2) İmatinib-20 ve İmatinib-40 gruplarında Johnsen skorlamasına göre istatistiksel bir fark bulunmazken İmatinib-60 grubunda anlamlı azaldığı,

3) İmmünohistokimyasal boyamalarda pozitivite derecelendirme metodu skorlamasında anti-8-OHdG, anti-PDGF, anti-c-kit ve TUNEL boyama sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmediği,

4) Dokulara uygulanan anti-c-kit antikorun, tüm gruplarda germ hücrelerinden yuvarlak, uzamış spermatidler ve spermatozoonlarda yoğun tutulum gösterdiği,

5) Anti-PDGF antikor boyamada kontrol grubunda seminifer tübüller, spermatogenetik ve Sertoli hücrelerinin normal yapıda olduğu, intertübüler alanlarda Leydig ve miyoepitelial hücrelerde PDGF pozitivitesi görüldüğü ve ilaç gruplarında Leydig ve miyoepitelial hücrelerde PDGF pozitivitesi izlendiği,

6) Kontrol grubunda seminifer tübüllerdeki spermatogenetik hücreler, Sertoli hücreleri ve intertübüler alanlardaki Leydig hücrelerinin normal yapıda izlendiği ve imatinib uygulanan gruplarda seminifer tübüllerde immünnegatif 8-OHdG spermatogenetik, Sertoli ve Leydig hücrelerinin görüldüğü,

7) TUNEL metoduyla boyanan kesitlerde kontrol grubu seminifer tübül epitel hücreleri normal yapıda olup birkaç apoptotik germinal epitel izlendiği; İmatinib-20 grubunda çok az sayıda apoptotik epitel hücreler olduğu; İmatinib-40 grubu ve İmatinib-60 gruplarında TUNEL negatif germinal epitel hücreleri, Sertoli ve Leydig hücrelerinin tespit edildiği,

8) Sperm sayısının İmatinib-20 grubunda azalmaya neden olmasına rağmen, İmatinib-60 grubunun İmatinib-20 grubuna göre kıyasla arttığı,

9) TBARS seviyelerinin İmatinib-20 grubunda artarak oksidatif strese neden olduğu, İmatinib-60 grubunda azaldığı ve İmatinib-40 grubunda bir değişime neden olmadığı; TBARS serum seviyelerinin İmatinib-20 grubunda artışa neden olduğu, İmatinib-40 ve İmatinib-60 gruplarında bir farklılık göstermediği,

10) Dokudaki tiyol analiz sonuçlarının tüm gruplardaki azalmanın anlamlı olmadığı; Tiyol serum analiz sonuçlarında ise İmatinib-60 grubunda seviyenin azaldığı fakat İmatinib-40 grubunda arttığı, İmatinib-20 grubundaki azalmanın anlamlı olmadığı,

11) Testosteron seviyelerinin kontrol grubuna göre İmatinib-20 ve İmatinib-60 gruplarında anlamlı bir artış görülürken, İmatinib-40 grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma bulunduğu; İmatinib-60 grubunun İmatinib-40 grubuna göre anlamlı bir artış olduğu,

12) Protamin gen ekspresyon sonuçlarında İmatinib-20 ve İmatinib-60 gruplarında artış görüldüğü fakat İmatinib-40 grubunda bir değişim gözlenmediği; histonun eksprese edilmesinde ise; kontrol grubuna göre diğer gruplar arasında farklılık bulunmadığı fakat İmatinib-60 grubu ekspresyonunda İmatinib-40 grubuna göre yükselme olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda prenatal dönemde uygulanan imatinibin testis üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda:

- 1) Elektron mikroskopuyla ince yapının görüntülenmesi,
- 2) Prenatal dönemdeki imatinib maruziyetinin erkek üreme sisteminde FSH ve LH hormon seviyelerinin incelenmesi,
- 3) Sinyal yollarının aydınlatılması,
- 4) İmatinibin olumsuz etkilerine karşı önleyici veya koruyucu tedavileri yöntemlerinin araştırılması,
- 5) İmatinib maruziyetine karşı antioksidan savunma sisteminin tepkisinin incelenmesi,
- 6) İmatinibin ikinci ve üçüncü trimesterdeki etkilerinin araştırılması,
- 7) Prenatal dönemdeki imatinib maruziyetinin ovaryumdaki etkilerinin incelenmesi,
- 8) Prenatal dönemdeki imatinib kullanımının diğer sistemlerdeki organlara etkilerinin araştırılması,

9) Laktasyon döneminde imatinib kullanımının yavru gelişimi üzerine etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.



7. KAYNAKLAR

Albanesi C, Geremia R, Giorgio M, Dolci S, Sette C, Rossi P (1996). A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated c-kit protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122: 1291-1302.

Ali R, Özkalemkaş F, Özçelik T, Özkocaman V, Ozan Ü, Kimya Y, Köksal N, Gulten T, Yakut T, Tunalı A (2005). Pregnancy under treatment of imatinib and successful labor in a patient with chronic myelogenous leukemia (CML) Outcome of discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular remission. *Leuk Res* 29: 971–973. doi:10.1016/j.leukres.2005.01.009.

Ali R, Ozkalemkas F, Kimya Y, Koksall N, Ozkocaman V, Tuna G, Yorulmaz H, Tunali A (2009). Imatinib use during pregnancy and breast feeding: a case report and review of the literature. *Arch Gynecol Obstet* 280: 169–175. doi: 10.1007/s00404-008-0861-7.

AlKindi S, Dennison D, Pathare A (2005). Imatinib in pregnancy. *Eur J Haematol* 74: 535–537. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00420.x.

Al-Rasheed NM, El-Masry TA, Tousson E, Hassan HM, Al-Ghadeer A (2017). Protective potential of grape seed proanthocyanidins extract against glivec (imatinib mesylate) induced liver toxicity and oxidative stress in male rats. *Annual Research & Review in Biology* 20(6): 1-9. doi: 10.9734/ARRB/2017/37766.

Apperley J (2009). CML in pregnancy and childhood. *Best Pract Res Clin Haematol* 22: 455-474. doi: 10.1016/j.beha.2009.09.008.

Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B (1991). Oxygen Free Radicals and Human Diseases. *J Roy Soc Oct* 111(5): 172- 177. doi: 10.1177/146642409111100506.

Ault P, Kantarjian H, O'Brien S, Faderl S, Beran M, Rios MB, Koller C, Giles F, Keating M, Talpaz M, Cortes J (2006). Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* 24(7): 1204-1208. doi: 10.1200/JCO.2005.04.6557.

Azim Jr HA, Pavlidis N, Peccatori FA (2010). Treatment of the pregnant mother with cancer: A systematic review on the use of cytotoxic, endocrine, targeted agents and immunotherapy during pregnancy. Part II: Hematological tumors. *Cancer Treat Rev* 36: 110–121. doi:10.1016/j.ctrv.2009.11.004.

- Balhorn R (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93: 298-305. doi: 10.1083/jcb.93.2.298.
- Balhorn R, Weston S, Thomas C, Wyrobek AJ (1984). DNA packaging in mouse spermatids synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp Cell Res* 150: 298-308. doi: 10.1016/0014-4827(84)90572-x.
- Balsat M, Etienne M, Elhamri M, Hayette S, Salles G, Thomas X (2018). Successful pregnancies in patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with interferon-alpha therapy during the tyrosine kinase inhibitors era. *Eur J Haematol* 101: 774–780. doi: 10.1111/ejh.13167.
- Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL (2015). *Ganong's Review of Medical Physiology. Ganong' un Tıbbi Fizyolojisi*. 24th ed. Çeviren: Gökbel H, Nobel Tıp Kitapevleri Tic. Ltd., Şti., İstanbul, 419-428.
- Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Ulisse S, Rucci N, Jannini EA, Rocca Cd, Manicone A, Carani C, Spera G, Gnessi L (2002). Expression of platelet-derived growth factor-a (pdgf-a), pdgf-b, and pdgf receptor- α and - β during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 87(5): 2310–2319. doi: 10.1210/jcem.87.5.8476.
- Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Brama M, Ricci A, Betsholtz C, Bondjers C, Ricci G, Catizone A, Galdieri M, Spera G, Gnessi L (2004). Expression of platelet-derived growth factor (pdgf) in the epididymis and analysis of the epididymal development in pdgf-a, pdgf-b, and pdgf receptor β deficient mice. *Biol Reprod* 70: 168–177. doi: 10.1095/biolreprod.103.019232.
- Basciani S, De Luca G, Dolci S, Brama M, Arizzi M, Mariani S, Rosano G, Spera G, Gnessi L (2008). Platelet-derived growth factor receptor β -subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology* 149(12): 6226–6235. doi: 10.1210/en.2008-0349.
- Basciani S, Mariani S, Spera G, Gnessi L (2010). Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocr Rev* 31: 916–939. doi: 10.1210/er.2010-0004.
- Betteridge DJ (2000). What Is Oxidative Stress. *Metabolism* 49(2 Suppl 1): 3-8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3.

- Bildik G, Acılan C, Sahin GN, Karahuseyinoglu S, Oktem O (2019). C-Abl is not activated in DNA damage-induced and Tap63-mediated oocyte apoptosis in human ovary. *Cell Death Dis* 9 (10): 943. doi: 10.1038/s41419-018-1026-7.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalaycı O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1): 9-19.doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Biterge B, Schneider R (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res* 356: 457–466. doi: 10.1007/s00441-014-1862-4.
- Boddu D, Thankamony P, Guruprasad CS, Nair M, Rajeswari B, Seetharam S (2019). Effect of imatinib on growth in children with chronic myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 36(4): 189-197. doi: 10.1080/08880018.2019.1610119.
- Braun RE (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28: 10-12.
- Brennan J, Tillman C, Capel B (2003). *Pdgfr- α* mediates testis cord organization and fetal leydig cell development in the xy gonad. *Genes Dev* 17(6): 800-810. doi: 10.1101/gad.1052503.
- Burwick RM, Kuo K, Brewer D, Druker BJ (2017). Maternal, fetal, and neonatal imatinib levels with treatment of chronic myeloid leukemia in pregnancy. *Obstet Gynecol* 129: 831–834. doi: 10.1097/AOG.0000000000001972.
- Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini GE, Galeraud-Denis I (2014). An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol* 38: 131–140. doi: 10.1016/j.etap.2014.05.007.
- Cardoso HJ, Figueira MI, Socorro S (2017). The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer. *J. Cell Commun Signal* 11: 297-307. doi: 10.1007/s12079-017-0399-1.
- Carlier P, Bernard N, Lagarce L, Dautriche A, Be'ne' J, Foulhe' Sam-Lai N, Eftekhari P (2017). Pregnancy outcome among partners of male patients receiving imatinib, dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: reports collected by the French network pharmacovigilance centers. *Arch Gynecol Obstet* 295: 269–271. doi: 10.1007/s00404-016-4262-z.

- Chang X, Zhou L, Chen X, Xu B, Cheng Y, Sun S, Fang M, Xiang Y (2017). Impact of imatinib on the fertility of male patients with chronic myelogenous leukaemia in the chronic phase. *Targ Oncol* 12: 827–832. doi: 10.1007/s11523-017-0521-6.
- Charo LM, Burgoyne AM, Fanta PT, Patel H, Chmielecki J, Sicklick JK, McHale MT (2018). A novel *prkar1b-braf* fusion in gastrointestinal stromal tumor guides adjuvant treatment decision-making during pregnancy. *J Natl Compr Canc Netw* 16(3): 238–242. doi: 10.6004/jnccn.2017.7039.
- Chelysheva E, Aleshin S, Polushkina E, Shmakov R, Shokhin I, Chilov G, Turkina A (2017). Breastfeeding in patients with chronic myeloid leukaemia: case series with measurements of drug concentrations in maternal milk and literature review. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 10(1): e2018027. doi: 10.4084/MJHID.2018.027.
- Chelysheva E, Turkina A, Polushkina E, Shmakov R, Zeifman A, Aleshin S, Shokhin I, Guranda D, Oksenjuk O, Mordanov S, Kazakbaeva K, Chilov G (2018a). Placental transfer of tyrosine kinase inhibitors used for chronic myeloid leukemia treatment. *Leuk Lymphoma* 59(3): 733-738. doi: 10.1080/10428194.2017.1347929.
- Chelysheva E, Aleshin S, Polushkina E, Shmakov R, Shokhin I, Chilov G, Turkina A (2018b). Breastfeeding in patients with chronic myeloid leukaemia: case series with measurements of drug concentrations in maternal milk and literature review. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 10(1): e2018027. doi: 10.4084/MJHID.2018.027.
- Choudhary DR, Mishra P, Kumar R, Mahapatra M, Choudhry VP (2006). Pregnancy on imatinib: fatal outcome with meningocele. *Ann Oncol*. 17(1): 178-179. doi: 10.1093/annonc/mdj065.
- De Leve LD, Kaplowitz N (1990). Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 10(4):251-266. doi: 10.1055/s-2008-1040481.
- Dickinson DA, Forman HJ (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64(5-6):1019-1026. doi: 10.1016/s0006-2952(02)01172-3.
- Dudek RW (2016). BRS: Embryology. BRS: Embriyoloji. Çeviren: İrez T, Erkan M, İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 180-189.
- Ellmann GL (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

- El Gendy MM, Kandil AM, Helal MA, Zahou FM (2015). The teratogenic effects of imatinib mesylate on rat fetuses. *Toxicol Rep* 2: 654-663. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.05.001.
- Emadi E, Abdoli N, Ghanbarinejad V, Mohammadi HR, Mobarakeh KM, Azarpira N, Mahboubi Z, Niknahad H, Heidari R (2019). The potential role of mitochondrial impairment in the pathogenesis of imatinib-induced renal injury. *Heliyon* 5: e01996. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01996. eCollection 2019 Jun.
- Eroschenko VP (2011). diFiore's Atlas of Histology-with Functional Corelations. diFiore Histoloji Atlası. 10th ed. Çeviren: Demir R, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Tic. Ltd. Şti., Ankara, 351-356.
- Figueira MI, Cardoso HJ, Correia S, Maia CJ, Socorro S (2017). The stem cell factor (SCF)/c-KIT system in carcinogenesis of reproductive tissues: What does the hormonal regulation tell us? *Cancer Lett* 405: 10-21. doi: 10.1016/j.canlet.2017.07.017.
- Finkel T, Holbrook N (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 9;408(6809): 239-247. doi: 10.1038/35041687.
- Garderet L, Santacruz R, Barbu V, van den Akker J, Carbonne B, Gorin NC (2007). Two successful pregnancies in a chronic myeloid leukemia patient treated with imatinib. *Haematologica* 2007; 92:(1)e9-e10. doi: 10.3324/haematol.10935.
- Ghalaut VS, Prakash G, Bansal P, Dahiya K, Dokwal S, Ghalaut PS, Bala M, Dhankar R (2014). Effect of imatinib on male reproductive hormones in BCR-ABL positive CML patients: A preliminary report. *J Oncol Pharm Practice* 20(4) 243-248. doi: 10.1177/1078155213500686.
- Gnessi L, Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Spera G, Wang C, Bondjers C, Karlsson L, Betscholtz C (2000). Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J Cell Biol.* 149: 1019-1025. doi: 10.1083/jcb.149.5.1019.
- Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, Mattei M, Candi E, De Felici M, Melino G, Cesareni G (2009). Inhibition of the c-Abl TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med.* 15(10):1179-85. doi: 10.1038/nm.2033.

Guyton AC, Hall JE (2007). Textbook of Medical Physiology. Tıbbi Fizyoloji. 11th ed. Çeviren: Çavuşoğlu H, Çağlayan Yeğen B, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 996-1010.

Güneş S, Arslan MA, Taşkurt Hekim GN, Aşcı R (2016). The role of epigenetics in idiopathic male infertility. J Assist Reprod Genet 33: 553–569. doi: 10.1007/s10815-016-0682-8.

Heim C, Minniear K, Tenenhaus Dann C (2011). Imatinib has deleterious effects on differentiating spermatogonia while sparing spermatogonial stem cell self renewal. Reprod Toxicol. 31(4): 454-63. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.12.056.

Hensley ML, Ford JM (2003). İmatinib treatment: specific issues related to safety, fertility, and pregnancy. Semin Hematol 40(2 suppl 2):21-25. doi:10.1053/shem.2003.50038.

Ingles CJ, Dixon GH (1967). Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis. Biochemistry 58: 1011-1018.

Iqbal N, Iqbal N (2014). Imatinib: A breakthrough of targeted therapy in cancer. Chemother Res Pract. 2014: 357027, 1-9. doi: 10.1155/2014/357027.

Iram H, Iram F, Husain A (2016). A review on imatinib:A wonder drug in oncology. Adv. Biomed. Pharma. 3(4): 227-244. <http://dx.doi.org/10.19046/abp.v03i04.07>.

Jain N, Sharmab D, Agrawal R, Jain A (2015). A newborn with teratogenic effect of imatinib mesylate: a very rare case report. Med Princ Pract 24: 291–293. doi: 10.1159/000381806.

Junqueira LC, Carneiro J (2003). Basic Histology. Temel Histoloji. 10td ed. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 431-442.

Kheradmand F, Hashemnia SMR, Valizadeh N, Roshan-Milani S (2016). The Effects of Imatinib Mesylate on Cellular Viability, Platelet Derived Growth Factor and Stem Cell Factor in Mouse Testicular Normal Leydig Cells. J Reprod Infertil 17(2):82-87

Kierszenbaum AL (2006). Histology and Cell Biology. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviren: Demir R, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Tic. Ltd. Şti., Ankara, 531-555.

Lasica M, Willcox A, Burbury K, Ross DM, Branford S, Butler J, Filshie R, Januszewicz H, Joske D, Mills A, Simpson D, Tam C, Taylor K, Watson AM, Wolf M, Grigg A (2019). The effect of tyrosine kinase inhibitor interruption and interferon use on pregnancy outcomes and long-term disease control in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 60(7): 1796-1802. doi: 10.1080/10428194.2018.1551533.

Law AD, Hwan Kim DD, Lipton JH (2017). Pregnancy: part of life in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*, 58(2): 280-287. doi: 10.1080/10428194.2016.1201571.

Luberda Z (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 5(1):5-17.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389: 251-260. doi: 10.1038/38444.

Luskin MR (2018). Chronic myeloid leukemia and pregnancy: patient and partner perspectives. *Expert Rev Hematol*, 11(8): 597-599. doi: 10.1080/17474086.2018.1500889.

Madabhavi I, Sarkar M, Modi M, Kadakol N (2019). Pregnancy outcomes in chronic myeloid leukemia: a single center experience. *J Glob Oncol* 5: 1-11. doi: 10.1200/JGO.18.00211.

Makler A (1978). A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril* 30: 313-318. doi: 10.1016/s0015-0282(16)43518-1.

Makler A (1980). The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 33: 337-338. doi: 10.1016/s0015-0282(16)44606-6.

Manova K, Bachvarova RK (1991). Expression of c-kit encoded at the w locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Dev Biol* 146: 312-324. doi: 10.1016/0012-1606(91)90233-s.

Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P, Bachvarova RF (1993). The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 157: 85-99. doi: 10.1006/dbio.1993.1114.

Mariani S, Basciani S, Arizzi M, Spera G, Gnessi L (2002). PDGF and the testis. *Trends Endocrinol Metab* 13: 11-17. doi: 10.1016/s1043-2760(01)00518-5.

Mariani S, Basciani S, Fabbri A, Agati L, Ulisse S, Lubrano C, Spera G, Gnessi L (2011). Severe oligozoospermia in a young man with chronic myeloid leukemia on long-term treatment with imatinib started before puberty. *Fertil Steril* 95(3):1120.e15-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.060.

Moore KL, Persaud TVN (2009). *Before We Are Born. Embriyoloji Ve Doğum Defektlerinin Temelleri*. Çeviren: Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F, Güneş Tıp Kitapevleri, İstanbul, 175-178.

Moore KL, Persaud TVN (2002). *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. 6th ed. Çeviren: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 323-330.

Moura AC, Delamain MT, Duarte GBO, Lorand-Metze I, Souza CA, Pagnano KBB (2019). Management of chronic myeloid leukemia during pregnancy: a retrospective analysis at a single center. *Hematol Transfus Cell Ther* 41(2): 125–128. doi: 10.1016/j.htct.2018.10.001.

Nicolini FE, Alcazer V, Huguet F, Cony-Makhoul P, Heiblig M, Fort MP, Morisset S, Guerci-Bresler A, Soula V, Sobh M, d'Estaing SG, Daudin M, Etienne G (2016). CML patients show sperm alterations at diagnosis that are not improved with imatinib treatment. *Leuk Res* 48: 80–83. doi: 10.1016/j.leukres.2016.07.008.

Nurmio M, Toppari J, Zaman F, Andersson AM, Paranko J, Söder O, Jahnukainen K (2007). Inhibition of tyrosine kinases PDGFR and C-Kit by imatinib mesylate interferes with postnatal testicular development in the rat. *Int J Androl* 30: 366–376. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00755.x.

Okezie AI, Kaur H, Halliwell B (1991). Oxygen Free Radicals and Human Diseases. *J. Roy. Soc. Health* Oct 1: 172- 177. doi: 10.1177/146642409111100506

Orth JM, Jester WF, Oiu J (1996). Gonocytes in testes of neonatal rats express the c-kit gene. *Mol Reprod Dev* 45: 123-131. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<123::AID-MRD3>3.0.CO;2-V.

Pallavee P, Samal R, Ghose S (2019). Chronic myeloid leukaemia in pregnancy: call for guidelines. *J Obstet Gynaecol* 39 (4): 582–583. doi: 10.1080/01443615.2018.1534815.

- Prasad AM, Ramnarayan K, Bairy KL (2010). Effect Of Imatinib On Histological Parameters In Male Swiss Albino Mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 4(2): 117-122.
- Pye SM, Cortes J, Ault P, Hatfield A, Kantarjian H, Pilot R, Rosti G, Apperley JF (2008). The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood*. 2111: 5505-5508. doi: 10.1182/blood-2007-10-114900.
- Russell MA, Carpenter MW, Akhtar MS, Lagattuta TF, Egorin MJ (2007). Imatinib mesylate and metabolite concentrations in maternal blood, umbilical cord blood, placenta and breast milk. *J Perinatol* 27: 241–243. doi: 10.1038/sj.jp.7211665.
- Rojas DB, Gemelli T, Binkowski de Andrade R, Guimaraes Campos A, Dutra-Filho CS, Duval Wannmacher CM (2012). Administration of histidine to female rats induces changes in oxidative status in cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 37: 1031–1036. doi: 10.1007/s11064-012-0703-7.
- Ross MH, Pawlina W (2011). *Histology: A Text And Atlas 6/E. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas / Altıncı Baskıdan Çeviri. 6th ed. Çeviren: Baykal B, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Tic. Ltd. Şti., Ankara, 784-805.*
- Rönnstrand L (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 61: 2535–2548. doi: 10.1007/s00018-004-4189-6.
- Sadler TW (2005). *Langman's Medical Embryology. Lagman's Medikal Embriyoloji. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Tic. Ltd. Şti., Ankara, 330-337.*
- Salem W, Li K, Krapp C, Ingles SA, Bartolomei MS, Chung K, Paulson RJ, Nowak RA, McGinnis LK (2019). Imatinib treatments have longterm impact on placentation and embryo survival. *Sci Rep*. 9(1): 2535. doi: 10.1038/s41598-019-39134-0.
- Samaha MM, Said E, Salem HA (2019). Nilotinib enhances β -islets integrity and secretory functions in a rat model of STZ-induced diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 860: 172569. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172569.
- Sancak B, Cumhur M (2004). *Fonksiyonel Anatomi. 3. Baskı. ODTÜ Yayıncılık, Ankara, Sayfa: 286-297.*

- Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A (1996). Expression of c-kit and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl* 17 (4): 403-408.
- Sandlow JI, Feng HL, Sandra A (1997). Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology* 49: 494-500. doi: 10.1016/S0090-4295(96)00494-3.
- Sassone-Corsi P (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296: 2176-2178. doi: 10.1126/science.1070963.
- Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K (2012). Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 9: 609–619. doi: 10.1038/nrurol.2012.183.
- Schultheis B, Nijmeijer BA, Yin H, Gosden RG, Melo JV (2012). Imatinib mesylate at therapeutic doses has no impact on folliculogenesis or spermatogenesis in a leukaemic mouse model. *Leuk Res* 36: 271–274. doi:10.1016/j.leukres.2011.09.025.
- Seshadri T, Seymour JF, McArthur GA (2004). Oligospermia in a Patient Receiving Imatinib Therapy for the Hypereosinophilic Syndrome. *N Engl J Med*. 11;351(20):2134-5. doi: 10.1056/NEJM200411113512024.
- Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossi P (2000). The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 599-608.
- Shaker ME, Salem HA, Shiha GE, Ibrahim TM (2011). Nilotinib counteracts thioacetamide-induced hepatic oxidative stress and attenuates liver fibrosis progression. *Fundam Clin Pharmacol*. 25: 248–257. doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00824.x
- Shamy T, Tamizian O (2018). Principles of prescribing in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology And Reproductive Medicine* 28(5): 136-140. doi: 10.1016/j.ogrm.2018.03.005.
- Sheng W, Sun N (2016). Successful pregnancy and delivery in a patient with chronic myeloid leukemia: a case report and review of the literature. *SpringerPlus* 5: 2055. doi 10.1186/s40064-016-3693-0.

Sies (1997). Oxidative Stress: Oxidants And Antioxidants. *Exp Physiol* 82(2): 291-295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

Stella S, Tírró E, Massimino M, Vitale SR, Russo S, Pennisi MS, Puma A, Romano C, Di Gregorio S, Innao V, Stagno F, Di Raimondo F, Musolino C, Manzella L (2019). Successful Management of a Pregnant Patient With Chronic Myeloid Leukemia Receiving Standard Dose Imatinib. *in vivo* 33: 1593-1598. doi: 10.21873/invivo.11641.

Tanrıverdi O, Unubol M, Taskin F, Meydan N, Sargin G, Guney E, Barutca S (2012). Imatinib-associated bilateral gynecomastia and unilateral testicular hydrocele in male patient with metastatic gastrointestinal stromal tumor: A literature review. *J Oncol Pharm Practice* 18(2): 303–310. doi: 10.1177/1078155211424629.

Tauer JT, Ulmer A, Glauche I, Jung R, Suttorp M (2014). Long-term Imatinib Treatment does not Cause Testicular Toxicity in Male Adolescents with Chronic Myeloid Leukemia and in a Juvenile Rat Model. *Klin Padiatr* 226: 169–174. doi: 10.1055/s-0034-1372643.

Tessarz P, Kousarides T (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and Dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15: 703-708. doi: 10.1038/nrm3890.

Tuğlu M, Melli M (2012). İmatinib: Etki mekanizması ve direnç geliştirme mekanizmaları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 65: 77-82. doi: 10.1501/Tıpfak_0000000813.

Vetto JT (2009). Role of imatinib in the management of early, operable, and advanced GI stromal tumors (GISTs). *OncoTargets Ther*. 2: 151–159. doi: 10.2147/ott.s4740.

Vishal M, Pares S, Adwait S, Nachiketa D (2010). Uncommon simultaneous diagnosis of multiple myeloma and chronic myeloid leukaemia. *J R Coll Physicians Edinb* 50: 303–304. doi: 10.4997/JRCPE.2020.319.

Webb MJ, Jafta D (2012). Imatinib Use in Pregnancy. *Turk J Hematol*; 29: 405-408. doi: 10.5505/tjh.2012.82542.

WHO, 2010. WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. *Türk Üroloji Derneği* 2011, 5. Baskı, ISBN: 978-975-00112-4-5, 271s., Kadioğlu, A. (Ç. Ed.), 68-69.

Wolf A, Couttet P, Dong M, Grenet O, Heron M, Junker U, Laengle U, Ledieu D, Marrer E, Nusscher A, Persohn E, Pognan F, Rivière GJ, Roth DR, Trendelenburg C, Tsao J,

Roman D (2010). Imatinib does not induce cardiotoxicity at clinically relevant concentrations in preclinical studies. *Leukemia Research* 34: 1180–1188. doi:10.1016/j.leukres.2010.01.004.





EKLER

EK 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Belgesi

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
(Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)

BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):22		
	ÇALIŞMANIN ADI	Sıçanlarda prenatal dönemde uygulanan imatinibin testis gelişimi üzerine etkisi.	
	Title	The effect of prenatal imatinibin administration on the development of testis	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)	Levent TÜMKAYA,	
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)	Zehra TOPAL SUZAN	
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez Ulusal	☐ Çok Merkezli Ulusal	☐ Çok Merkezli Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	Karar No(Decision No):2017/22	Tarih (Date): 28.07.2017
	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Doç.Dr. Levent TÜMKAYA'nın sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir.	
Decision Information	The study above has been approved by the Local Ethics Committee of R.T.E. University.	
	☒ Accepted	☐ Rejected

ÜYELER (Members)						
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyet i	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç.Dr. Fikri BALTA (Başkan, Müdür, Veteriner Hekim)	Su Ürünleri	R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr. Adnan YILMAZ (Başkan Vekili)	Tıbbi Biyokimya	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Doç.Dr. Nurhayat ÖZDEMİR (Üye)	Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr. Levent TÜMKAYA (Üye)	Histoloji Embriyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☒ E ☐ H	☒ E ☐ H	
Yrd.Doç.Dr. Saliha EKŞİ (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yrd.Doç.Dr. Hatice SEVİM NALKIRAN (Üye)	Tıbbi Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yrd. Doç.Dr. Murat ALKURT (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	R.T.E. Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Barış KARA (Üye)	Sağlık Çalışanı	Sağlık Sen	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Eylem RAKICI EKŞİOĞLU (Üye)	Serbest Çalışan	Sivil Üye	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

*Araştırma ile ilişkisi(Relation to the project, E: Yes, H: No)

**Toplantıda Bulunma(Attendance, E: Yes, H: No)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER			
Soyadı, Adı		:TOPAL SUZAN, Zehra	
Uyruğu		:TC	
Doğum Tarihi ve Yeri		:12/08/1986 Espiye	
Telefon (İş)		:0464	
E-Posta		:zehratopall@gmail.com	
Yazışma Adresi (İş)		:Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi İslampaşa Mah. 2 nolu Şehitler Cad. Dekanlık Binası Kat:1 Oda No: 104 Merkez/RİZE	
EĞİTİM BİLGİLERİ			
Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı	
Doktora/Uzmanlık	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Histoloji ve Embriyoloji AD	-	
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Histoloji ve Embriyoloji AD	2012	
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009	
Lise	Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi	2004	
AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ			
Görevi		Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015-
YABANCI DİL			
	İngilizce		
UZMANLIK ALANI			
	Histoloji ve Embriyoloji		
YAYINLAR			

1	TÜREDİ Sibel, HANCI Hatice, TOPAL SUZAN Zehra , ÜNAL Deniz, MERCANTEPE Tolga, BOZKURT İlyas, KAYA Haydar, ODACI Ersan (2015). The effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the 21 day old male rat heart. Electromagn Biol Med. 34(4): 390-397. doi: 10.3109/15368378.2014.952742.
2	HANCI Hatice, TÜREDİ Sibel, TOPAL SUZAN Zehra , MERCANTEPE Tolga, BOZKURT İlyas, KAYA Haydar, ERSÖZ Şafak, ÜNAL Bünyamin, ODACI Ersan (2015). Can prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field affect the morphology of the spleen and thymus and alter biomarkers of oxidative damage in 21 day old male rats. Biotech Histochem. 90(7): 535-543. doi: 10.3109/10520295.2015.1042051.
3	ODACI Ersan, ÜNAL Deniz, MERCANTEPE Tolga, TOPAL SUZAN Zehra , HANCI Hatice, TÜREDİ Sibel, EROL Hüseyin Serkan, MUNĞAN Sevdegül, KAYA Haydar, ÇOLAKOĞLU Serdar (2015). Pathological effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the 21 day old male rat kidney. Biotech Histochem. 90(2): 93-101. doi:10.3109/10520295.2014.947322.
4	TOPAL SUZAN Zehra , HANCI Hatice, MERCANTEPE Tolga, EROL Hüseyin Serkan, KELEŞ Osman Nuri, KAYA Haydar, MUNĞAN Sevdegül, ODACI Ersan (2015). The effects of prenatal long duration exposure to 900 MHz electromagnetic field on the 21 day old newborn male rat liver. TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, 45, 291-297., Doi: 10.3906/sag-1404-168.
5	MERCANTEPE Tolga, TÜMKAYA Levent, GÖKÇE Fatih Mehmet, TOPAL SUZAN Zehra , ESMER Erva (2018). The effect of 900MHz Electromagnetic Field on the Cerebellum: A Histopathological Investigation. Sisli Etfal Hastan Tip Bul. 52(2): 129-134. doi: 10.14744/SEMB.2018.42275.
6	MERCANTEPE Tolga, TÜMKAYA Levent, GÖKÇE Fatih Mehmet, UZUNOK Barış, TOPAL SUZAN Zehra , ÇINAR Seda, ESMER Erva (2018). Prenatal Dönemde 900Mhz Elektromanyetik Alanın Sıçan Omurilik Dokusu Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. Acibadem Universitesi Saglik Bilimleri Dergisi 9(2) 137-141. doi: 10.31067/0.2018.4.
7	MERCANTEPE Tolga, TÜMKAYA Levent, BEYAZAL ÇELİKER Fatma, TOPAL SUZAN Zehra , ÇINAR Seda, AKYILDIZ Kerimali, MERCANTEPE Filiz,

	YILMAZ Adnan (2018). Effects of gadolinium-based MRI contrast agents on liver tissue. J Magn Reson Imaging. 48(5): 1367-1374. doi: 10.1002/jmri.26031.
8	BEYAZAL ÇELİKER Fatma, TÜMKAYA Levent, MERCANTEPE Tolga, BEYAZAL Mehmet, TURAN Arzu, BEYAZAL POLAT Hatice, TOPAL SUZAN Zehra , INECİKLİ Mehmet Fatih, AKYILDIZ Kerimali, YILMAZ Adnan (2019). Effects of Gadodiamide and Gadoteric Acid on Rat Kidneys: A Comparative Study. J Magn Reson Imaging. 49(2): 382-389. doi: 10.1002/jmri.26266.
BİLDİRİLER	
1	TOPAL SUZAN Zehra , YENİLMEZ Engin, ALVER Ahmet (2012). Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin Koruyucu Etkileri. Uluslararası Katılımlı XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi.
2	HANCI Hatice, TOPAL SUZAN Zehra , TÜREDİ Sibel, KAYA Haydar, ERSÖZ Şafak, ODACI Ersan (2013). Prenatal dönemde uygulanan 900 megahertz elektromanyetik alanın yavru sıçan dalak ve timus morfolojisi üzerine etkisi. Controversies on Electromagnetic Field in Medicine and Biology.
3	TÜREDİ Sibel, HANCI Hatice, TOPAL SUZAN Zehra , ÜNAL Deniz, MERCANTEPE Tolga, BOZKURT İlyas, KAYA Haydar, ODACI Ersan (2013). Prenatal dönemde uygulanan 900 megahertz elektromanyetik alanın yavru sıçan kalp dokusu üzerine etkisi. Controversies on Electromagnetic Field in Medicine and Biology.
4	ODACI Ersan, TOPAL SUZAN Zehra , HANCI Hatice, TÜREDİ Sibel, EROL Hüseyin Serkan, KAYA Haydar (2013). Prenatal dönemde uygulanan 900 megahertz elektromanyetik alanın yavru sıçanların böbrek morfolojisi üzerine etkisi. Controversies on Electromagnetic Field in Medicine and Biology.
5	TOPAL SUZAN Zehra , HANCI Hatice, EROL Hüseyin Serkan, KAYA Haydar, KELEŞ Osman Nuri, ODACI Ersan (2013). Prenatal dönemde uygulanan 900 megahertz elektromanyetik alanın yenidoğan sıçan karaciğeri üzerine etkisi. Controversies on Electromagnetic Field in Medicine and Biology.
6	TÜREDİ Sibel, HANCI Hatice, TOPAL SUZAN Zehra , ÜNAL Deniz, MERCANTEPE Tolga, KAYA Haydar, ODACI Ersan (2014). Prenatal dönemde uygulanan 900 megahertz elektromanyetik alanın yavru erkek sıçan kalp dokusu üzerine etkileri. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi.

7	TOPAL SUZAN Zehra , ODACI Ersan, ÜNAL Deniz, MERCANTEPE Tolga, HANCI Hatice, TÜREDİ Sibel, KAYA Haydar, ÇOLAKOĞLU Serdar (2014). Prenatal Dönemlerinde 900 MHZ Elektromanyetik Alan Etkisine Maruz Kalan 21 Günlük Erkek Sıçan Böbreklerinin Elektron Mikroskopik Değerlendirilmesi. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi.
8	HANCI Hatice, TÜREDİ Sibel, TOPAL SUZAN Zehra , MERCANTEPE Tolga, BOZKURT İlyas, KAYA Haydar, ÜNAL BÜNYAMİN, ODACI Ersan (2014). Prenatal Dönemde Uygulanan 900 Megahertz Elektromanyetik Alanın 21 Günlük Yavru Erkek Sıçan Dalak ve Timusu üzerine etkisi. Elektron Mikroskopik ve Biyokimyasal Bir Çalışma. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi.
9	BAYRAK Gülsen, BALTAŞ Nimet, YENİLMEZ Engin, YULUĞ Esin, KERİMOĞLU Gökçen, REİS KÖSE Gökşen Derya, HANCI Hatice, TÜREDİ Sibel, TOPAL SUZAN Zehra (2015). Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem Karayemiş in Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri. 22. Elektron Mikroskobu Kongresi.
10	TÜMKAYA Levent, MERCANTEPE Tolga, BALIK Gülşah, TOPAL SUZAN Zehra (2017). THE EFFECT OF BILBERRY IN THE OVARY CISPLATININ TOXICITY. 25th European Congress of Obstetrics and Gynaecology, 374-374. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
11	TÜMKAYA Levent, TOPAL SUZAN Zehra , MERCANTEPE Tolga, ÇINAR Seda, BEYAZAL ÇELİKER Fatma (2018). Gadolinium bazlı kontrast ajanlarının sıçan akciğeri üzerine etkileri. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 6(2018), 72-72. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
12	TÜMKAYA Levent, ÇINAR Seda, MERCANTEPE Tolga, TOPAL SUZAN Zehra , YILDIZ Lamiye, BEYAZAL ÇELİKER Fatma (2018). GADODİAMİD VE GADOTERAT MEGLUMİNİN OLFAKTOR BULBUS ÜZERİNE OLAN ETKİSİ. 1. International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology (SANAR2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
13	TÜMKAYA Levent, AKKUŞ Vahide, ÇINAR Seda, MERCANTEPE Tolga, TOPAL SUZAN Zehra (2018). Protective effect of White Tea againsts Cisplatin-induced Purkinje Cell Injury used for the Therapy of Metastatic Brain Tumors. 1. International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology

	(SANAR2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR	
1.	
HOBİLER	
1	Doğa yürüşü
2	Resim

