

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE
OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA
KARNOZİNİN ETKİSİ**

Dr. UMUT DEMİRDELEN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2018

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE
OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA
KARNOZİNİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Umut DEMİRDELEN

Danışman Öğretim Üyesi:
Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Testis.....	6
2.1.1. Testis Embriyolojisi.....	6
2.1.2. Testis Anatomisi	8
2.1.3. Testis Histolojisi.....	10
2.1.3.1. Seminifer Tübül	11
2.1.3.1.1. Sertoli Hücreleri	11
2.1.3.1.2. Spermatogenezis	13
2.1.3.1.2.1. Spermatogonyal Faz (Mitoz)	13
2.1.3.1.2.2. Spermatosit Fazı (Mayoz).....	14
2.1.3.1.2.3. Spermatid Fazı (Spermiyogenez).....	16
2.1.3.2. İnterstisyel Bağ Doku	19
2.1.3.2.1. Miyoid Hücreler	19
2.1.3.2.2. Leydig Hücreleri	20
2.2. Kemoterapötik Ajanlar.....	20
2.2.1. Alkilleyici İlaçlar.....	21

2.2.1.1.	Alkilleyici İlaçların Etki Mekanizması.....	21
2.2.1.2.	Alkilleyici İlaçların Ortak Farmakolojik Özellikleri	21
2.2.1.3.	Siklofosfamid.....	22
2.2.1.3.1.	Siklofosfamid ve Fertilite.....	23
2.3.	Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	23
2.3.1.	Antioksidanlar	24
2.4.	Karnozin.....	25
3.	GEREÇ YÖNTEM.....	27
3.1.	Araştırma Tipi:.....	27
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı:	27
3.4.	Çalışma Materyali:.....	29
3.5.	Veri Toplama Araçları:	29
3.5.1.	Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	29
3.5.2.	Araştırmada Kullanılan Yöntemler	30
3.5.3.	Histokimyasal İncelemeler	30
3.5.3.1.	Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	31
3.5.3.2.	Hematoksilen-Eozin Boya Yöntemi	32
3.5.3.3.	Masson Trikrom Boyama Yöntemi	33
3.5.3.4.	Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemi	34
3.5.4.	İmmünohistokimyasal İncelemeler	35
3.5.4.1.	Anti-klaudin5 Boyama Yöntemi.....	35
3.5.4.2.	Aktif Kaspaz-3 Boyama Yöntemi.....	36
3.5.5.	Biyokimyasal İncelemeler	36
3.5.5.1.	Enzim Aktiviteleri ve MDA Düzeylerinin Saptanması.....	36
3.6.	Araştırma Planı ve Takvimi	37

3.7.	Verilerin Değerlendirilmesi	38
3.8.	Araştırmanın Sınırlılıkları.....	38
3.9.	Etik Kurul Onayı.....	38
4.	BULGULAR	39
4.1.	Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması	39
4.2.	Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	40
4.3.	Histolojik Bulgular.....	42
4.3.1.	Hematoksilen & Eozin (H-E) Boyama.....	42
4.3.1.1.	Johnsen Skorlaması.....	47
4.3.1.2.	Seminifer Tübül Çaplarının Değerlendirilmesi	48
4.3.2.	PAS Boyaması Değerlendirilmesi	50
4.3.2.1.	Bazal Membran Kalınlıklarının Değerlendirilmesi	50
4.3.3.	Masson Trikrom Boyaması Değerlendirilmesi	56
4.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular.....	61
4.4.1.	Aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama değerlendirilmesi.....	61
4.4.2.	Anti-klaudin5 immünohistokimyasal boyama değerlendirilmesi.....	65
4.5.	Biyokimyasal Bulgular.....	70
5.	TARTIŞMA.....	73
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
7.	KAYNAKLAR.....	80
8.	EKLER	87
	EK-1 Etik Kurul Onayı.....	87
	EK-2 Özgeçmiş	88

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Doku takip protokolü	31
Tablo 2 Johnsen Testiküler Skorlama Yöntemi	32
Tablo 3 Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	33
Tablo 4 Masson Trikrom boyama protokolü.....	34
Tablo 5 Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü.....	35
Tablo 6 Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	40
Tablo 7 Gruplar arası testis ağırlıklarının karşılaştırılması	40
Tablo 8. Testis ağırlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	41
Tablo 9. Seminifer tübül çaplarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	50
Tablo 10. Bazal membran kalınlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	52.
Tablo11. Gruplara ait anti-kludin5 ve aktif kaspaz-3 skarlama değlerleri.....	69
Tablo 12. Gruplara ait MDA ve GSH değlerleri.....	71

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Üç haftalık embriyonun şematik çizimi.	7
Şekil 2. Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı.	8
Şekil 3. Skrotum ve içindeki yapıların şematik çizimi	9
Şekil 4. İnsan testisinin sagital kesitinin histolojik görüntüsü	11
Şekil 5. İnsan sertoli hücresinde görülen karakteristik Charcot-Böttcher kristaloid cisimciklerin geçirimli elektron mikrofotografı	13
Şekil 6. İnsan seminifer epitelindeki tip A koyu ve açık, tip B spermatogonyumları gösteren bir çizim	14
Şekil 7. Spermatogenezin aşamaları.....	15
Şekil 8. Spermatogonyal hücrelerdeki mayoz ve mitozun karşılaştırılması.....	16
Şekil 9. Bir insan spermatozoonunun diyagramı	19
Şekil 10. Testisin leydig hücrelerini içeren histolojik görüntüsü	20
Şekil 11. Siklofosfamidin moleküler yapısı.	23
Şekil 12. Karnozinin moleküler formülü.....	26
Şekil 13. Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi	39
Şekil 14. Testis ağırlıklarının karşılaştırılması.	41
Şekil 15. Kontrol grubu olan testis histolojik görüntüleri	42
Şekil 16. Karnozin grubuna ait olan testis histolojik görüntüleri (H-E)	43
Şekil 17. Siklofosfamid grubuna ait olan testis histolojik görüntüleri (H-E)	45
Şekil 18. Önce siklofosfamid sonra karnozin verilen gruba ait olan testis histolojik görüntüleri (H-E)	45
Şekil 19. Siklofosfamid ve karnozin birlikte verilen gruba ait olan testis histolojik görüntüleri (H-E) Testis seminifer tübülerin yapısının görüntüsü.	46
Şekil 20. Önce karnozin sonra siklofosfamid verilen gruba ait olan testis histolojik görüntüleri (H-E) Testis seminifer tübülerin yapısının görüntüsü.	47
Şekil 21. Seminifer tübüllerin Johnsen skorlamasına göre karşılaştırılması.....	48
Şekil 22. Seminifer tübül çaplarının karşılaştırılması	49
Şekil 23. Seminifer tübül bazal membran kalınlıklarının karşılaştırılması	50
Şekil 24. Kontrol grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	53
Şekil 25. Karnozin grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	53
Şekil 26. Siklofosfamid grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	54

Şekil 27. K+CP grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	55
Şekil 28. K=CP grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	55
Şekil 29. CP+K grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	56
Şekil 30. Kontrol grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	57
Şekil 31. Karnozin grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü....	58
Şekil 32. Siklofosfamid grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	59
Şekil 33. K+CP grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	60
Şekil 34. K=CP grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	61
Şekil 35. CP+K grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	62
Şekil 36. Kontrol grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	63
Şekil 37. Karnozin grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	63
Şekil 38. Siklofosfamid grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	64
Şekil 39. K+CP grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	65
Şekil 40. K=CP grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	65
Şekil 41. CP+K grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	66
Şekil 42. Gruplar arası aktif kaspaz-3 immüreaktivite değerlendirme skorları.....	67
Şekil 43. Kontrol grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	67
Şekil 44. Karnozin grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	67
Şekil 45. Siklofosfamid grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	68
Şekil 46. K+CP grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	69

Şekil 47. CP=K grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	70
Şekil 48. CP+K grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü.....	71
Şekil 49. Gruplar arası anti-klaudin5 immüreaktivite değerlendirme skorlar.....	71
Şekil 50 . Gruplar arası MDA değerleri karşılaştırılması.....	72
Şekil 51. Gruplar arası GSH değerleri karşılaştırılması.....	73



KISALTMALAR

i.p. : İntraperitoneal

CP: Siklofosfamid

K: Karnozin

PAS: Periyodik Asit Schiff

TDF: Testis Belirleyici Faktör

aER : Düz Endoplazmik Retikulum

FSH : Folikül Uyarıcı Hormon

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

MDA : Malondialdehit

SOD : Süperoksit Dismutaz

PUFA : Çoklu Doymamış Yağ Asidi

SF: Serum Fizyolojik

GSH: Glutasyon

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

GPx: Glutasyon Peroksidaz

GR: Glutasyon Redüktaz

GSSG: Okside Glutasyon

TEŞEKKÜR

Histoloji ve embriyoloji alanında tıpta uzmanlık eğitimim boyunca tecrübe, bilgi birikimi ve ışığını esirgemeyen, tez çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR ve Doç. Dr. Başak BAYKARA' ya,

Uzmanlık eğitimi aldığım sürede mesleki ve kişisel gelişimime eşsiz katkılarda bulunan değerli hocalarım Prof Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Ülker SÖNMEZ, Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. Işıl TEKMEN, Prof. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN , Doç. Dr. Seda ÖZBAL, Doç. Dr. Serap ÇİLAKER MIÇILI'ya ,

Tez çalışmalarına katkı ve destek sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Müge KIRAY 'a ,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan değerli arkadaşlarım Özcan ÜSTÜN, Gökçen BİLİCİ, Şeyda DEMİR, Filiz YILMAZ, Betül SARI, Ayşegül KIRAZ, Merve TÜTÜNCÜ, Cansu BEKDEMİR, Tuğçe TOPCU, Selma AYDEMİR, Hüseyin KISAOĞLU, Meltem AVCI, Yavuz GENÇ, Merve AKSOY, Merve TATLI, Nevin ERSOY, Pınar AKOKAY, Uygur SAÇIK, Feyyaz ÖZEL, Yavuz GENÇ' e.

Ömrüm boyunca arkamda duran, destekleyen, sonsuz sevgiyle büyüten çok değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

SİÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA KARNOZİNİN ETKİSİ

UMUT DEMİRDELEN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Balçova , İzmir drumutdemirdelen@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Siklofosfamid romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, multiple sklerozis ve birçok kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Karaciğerde metabolik aktivasyona girdikten sonra vücutta reaktif oksijen radikalleri oluşturan toksik metabolitler oluşturur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda siklofosfamidin testise sitotoksik hasar verdiği; testis ağırlığında azalma, oligospermi, spermatogonyalarda DNA sentezinde azalma yaptığı gösterilmiştir.

Karnozin insanda kas ve sinir dokusunda sentezlenen, sindirim sisteminden kolayca emilebilen doğal bir antioksidan dipeptiddir. Deneysel olarak siklofosfamide bağlı oluşturulan testis hasarı modelinde, karnozinin etkilerini içeren bir çalışma literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada amaç, erkek sıçanlarda siklofosfamidin testis yapısında oluşturduğu hasarı incelemek ve bu hasarda karnozinin etkisini, ışık mikroskopik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak göstermektir.

Yöntem: Çalışmada Wistar Albino suşu 10-12 haftalık (200-250 gr) toplam 40 denek ile 6 grup oluşturuldu. Kontrol grubunda beş diğer deney gruplarında yedi denek kullanıldı. Deneyde kullanılan ilaçlar karnozin 250 mg/kg, siklofosfamid 150 mg/kg intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Kontrol grubu; herhangi bir ilaç ve çözgen verilmeyen grup, siklofosfamid (CP) grubu; sadece tek doz siklofosfamid verilen grup, karnozin grubu (K); sadece karnozin verilen grup, (K+CP) grubu; deneklere önce tek doz karnozin, bir saat sonra siklofosfamid verilen grup, (K=CP) grubu; deneklere karnozin ve siklofosfamidin eş zamanlı verildiği grup (CP+K) grubu; deneklere önce siklofosfamid, bir saat sonra karnozin verilen grup. Son doz uygulamadan 48 saat sonra tüm grupların testis doku örnekleri alınarak fiksatife konuldu. Rutin histolojik takip yöntemlerinden sonra testis dokuları parafin bloklara gömüldü. Her bloktan beş µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-eozin ile testis dokusunun morfolojisi, seminifer tübül çap ölçümü, Johnson skorlaması; PAS (Periyodik Asit Schiff) boyaması ile bazal membran kalınlık ölçümü;

Masson Trikrom boyaması ile bağ dokusu incelendi. İmmunohistokimyasal olarak anti-klaudin5 ve aktif kaspaz-3 antikorları ile immunhistokimyasal boyamalar yapıldı.

Bulgular: Kontrol ve karnozin gruplarında normal testis histolojik yapısı gözlemlendi. Hematoksilen-eozin boyamada; siklofosfamid grubunda belirgin germinal epitel hasarı olduğu görüldü. Seminifer tübülün germinal epitelinin bazal membrandan ayrıldığı (bazal membran ondülasyonu) görüldü. Hem karnozin hem siklofosfamid kullanılan diğer üç grupta bazı seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel alanda eritrosit görülmekle birlikte birçok seminifer tübülde spermatogenik seri hücrelerinin hasarsız, germinal epitelin düzenli olduğu ve dizilim bozukluğunun azaldığı gözlemlendi. Masson-Trikrom boyamada; siklofosfamid grubunda diğer gruplara göre intertübüler bağ dokusunda kollajen artışı izlendi. PAS boyamada; siklofosfamid grubunda diğer gruplara göre bazal membranda kalınlaşma saptandı. İmmunohistokimyasal olarak siklofosfamid grubunda diğer gruplara göre artmış aktif kaspaz-3 ve azalmış anti-klaudin5 immunreaktivitesi görüldü.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgulara göre siklofosfamidin testiste oluşturduğu hasarda karnozinin koruyucu ve tedavi edici etkinliği bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: karnozin, siklofosfamid, testis histolojisi, klaudin-5, aktif kaspaz-3

THE EFFECTS OF CARNOSINE ON CYCLOPHOSPHAMIDE INDUCED TESTICULAR INJURY

UMUT DEMİRDELEN

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Histology and
Embryology,

Balçova , Izmir drumutdemirdelen@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: Cyclophosphamide is a drug used in the treatment of rheumatoid arthritis, SLE, multiple sclerosis and many cancers. After the metabolic activation in the liver, it forms toxic metabolites that form reactive oxygen radicals in the body. Recent studies shows that cyclophosphamide has many cytotoxic effects on testis; such as decrease in testicular weight, oligospermia, decrease in DNA synthesis in spermatogonia.

Carnosine is a natural antioxidant dipeptide synthesized in the human muscle and nervous tissue. It can easily absorbable from the digestive system. A study involving the effects of carnosine in experimental model of testis injury induced by cyclophosphamide has not been found in the literature.

The aim of this study is to investigate the damage caused by the cyclophosphamide on the testis of male rats and to show the effect of carnosine by light microscopy, immunohistochemistry and biochemistry.

Method: In the study, 40 Wistar Albino strains 10-12 weeks (200-250gr) were divided into six groups . We used five subjects in the control group and seven subjects in the other experimental groups. Drugs used in the experiment were carnosine 250 mg / kg, cyclophosphamide 150 mg / kg intraperitoneal (i.p.). Control group; any drug and solvent-free group, cyclophosphamide (CP) group; the group which is given only a single dose of cyclophosphamide, carnosine group (K); only carnosine given group, (K + CP) group; first single dose carnosine and one hour later cyclophosphamide were given, (K = CP) group; carnosine and cyclophosphamide were given at the same time, group (CP + K) group; first single dose cyclophosphamide and one hour later carnosine were given. Forty-eight hours after the last dose of all groups, testicular tissue specimens were taken and fixed. After routine histological follow-up, testicular tissues were embedded in paraffin blocks. Sections with a thickness of five µm were taken from each block. Morphology of testis tissue with hematoxylin-eosin, measurement of seminiferous tubule diameter, Johnsen

scoring; basal membrane thickness measurement with PAS staining; the connective tissue was examined with Masson's Trichrome staining. Immunohistochemically, immunohistochemical staining with anti-claudin5 and active caspase-3 antibodies was performed.

Result: Normal testicular histologic structure was observed in control and carnosine group. Cyclophosphamide group showed significant germinal epithelial damage with the hematoxyline-eosin stain. The germinal epithelium of the seminiferous tubule detached from the basal membrane (basal membrane ondulation). Although there were erythrocytes in the interstitial space between some seminiferous tubules; it was observed that in many seminiferous tubules, spermatogenic series cells were undamaged, the germinal epithelium was regular and alignment disorder was decreased in the both carnosine and cyclophosphamide used three groups. There was an increase in collagen levels in the intertubular connective tissue in the cyclophosphamide group compared to the other groups with the Masson-trichrom stain. There was an increase in basal membrane thickness at the cyclophosphamide group when compared to the other groups with the PAS stain. Immunohistochemically, active caspase-3 and decreased anti-claudin5 immunoreactivity were observed in the cyclophosphamide group compared to the other groups.

Conclusion: According to our findings, cyclophosphamide has protective and therapeutic effect of carnosine in testicular damage

Keywords: carnosine, cyclophosphamide, testes, claudin-5, active caspase-3

1. **GİRİŞ VE AMAC**

Siklofosfamid romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, multiple sklerozis ve birçok kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Karaciğerde metabolik aktivasyona girdikten sonra vücutta reaktif oksijen radikalleri oluşturan toksik metabolitler oluşturur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda siklofosfamidin testise sitotoksik hasar verdiği; testis ağırlığında azalma, oligospermi, spermatogonyalarda DNA sentezinde azalma yaptığı gösterilmiştir.

Karnozin insanda kas ve sinir dokusunda sentezlenen, sindirim sisteminden kolayca emilebilen doğal bir antioksidan dipeptiddir. DeneySEL olarak siklofosfamide bağlı oluşturulan testis hasarı modelinde, karnozinin etkilerini içeren bir çalışma literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada amaç, erkek sıçanlarda siklofosfamidin testis yapısında oluşturduğu hasarı incelemek ve bu hasarda karnozinin etkisini, ışık mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. *Testis Embriyolojisi*

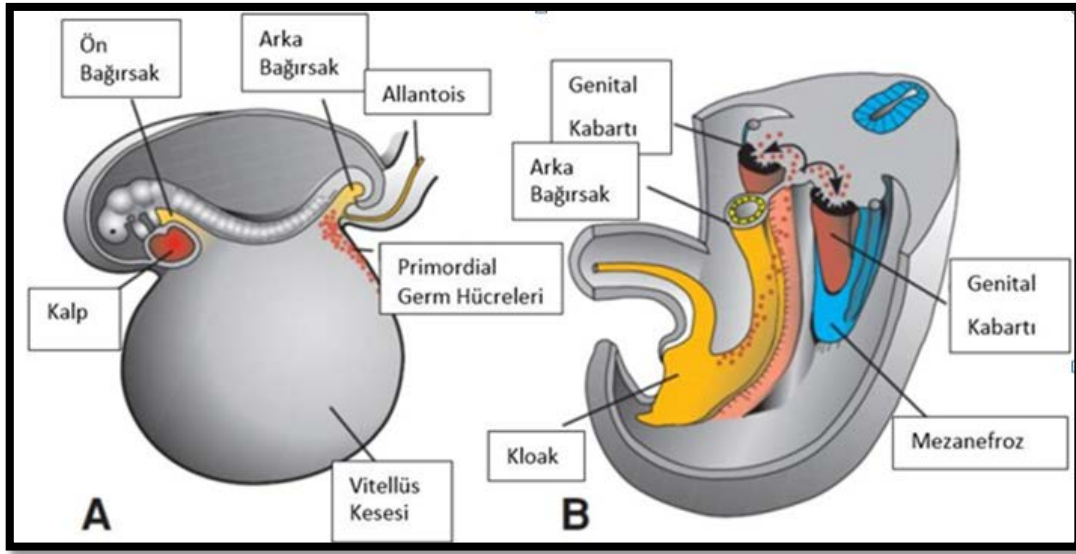
Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti fertilizasyonda esnasında dölleyen sperm çeşidiyle belirlenir. Morfolojik cinsiyet özellikleri ise embriyonik yedinci haftaya kadar gelişmez. Her iki cinste de yedinci haftaya kadar gonadların görünümü benzerdir ve farklanmamış gonadlar denir.

Gonadların geliştiği üç kaynak primordiyal germ hücreleri, posterior abdominal duvarın mezoteli ve altındaki mezenşimdir. Beşinci haftada mezonefrozun medialinde mezotel ve altındaki mezenşim prolifer olarak bir genital kabarcığı oluşturur. Epiteyal kordonların altındaki mezenşime doğru büyümesiyle farklanmamış gonada dışta korteks ve içte medulla oluşur. XY cinsiyet kromozomuna sahip embriyolarda medulla testise farklanır, korteks kalıntıları bırakarak dejenere olur. XX kromozomlu embriyolarda ise korteks overe farklanır ve medulla geriler.

Primordial germ hücreleri dördüncü haftanın başında yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar (Şekil 1). Son barsağın dorsal mezenterisi boyunca ilerleyerek beşinci haftada gonadal kabarcıklara ulaşırlar. Altıncı haftada primordial germ hücreleri mezenşim içerisine ilerleyerek primer cinsiyet kordonlarına katılırlar.

Y kromozomunun kısa kolundaki SRY geni testis belirleyici faktör için gereklidir. TDF (testis belirleyici faktör) etkisiyle primer cinsiyet kordonları seminifer tübüllere farklanır. Farklanmamış gonadın medullasının derinliklerine doğru büyür, dallanır ve anastomozlaşarak rete testisi oluşturur (Şekil 2). Sıkı fibröz bir bağ dokusu olan tunika albugineanın gelişimiyle seminifer tübüllerin yüzey epiteliyle bağlantısı kaybolur. Mezonefroz dejenere olurken testis kendi mezenterisi olan mezorşiyum ile asılır (1).

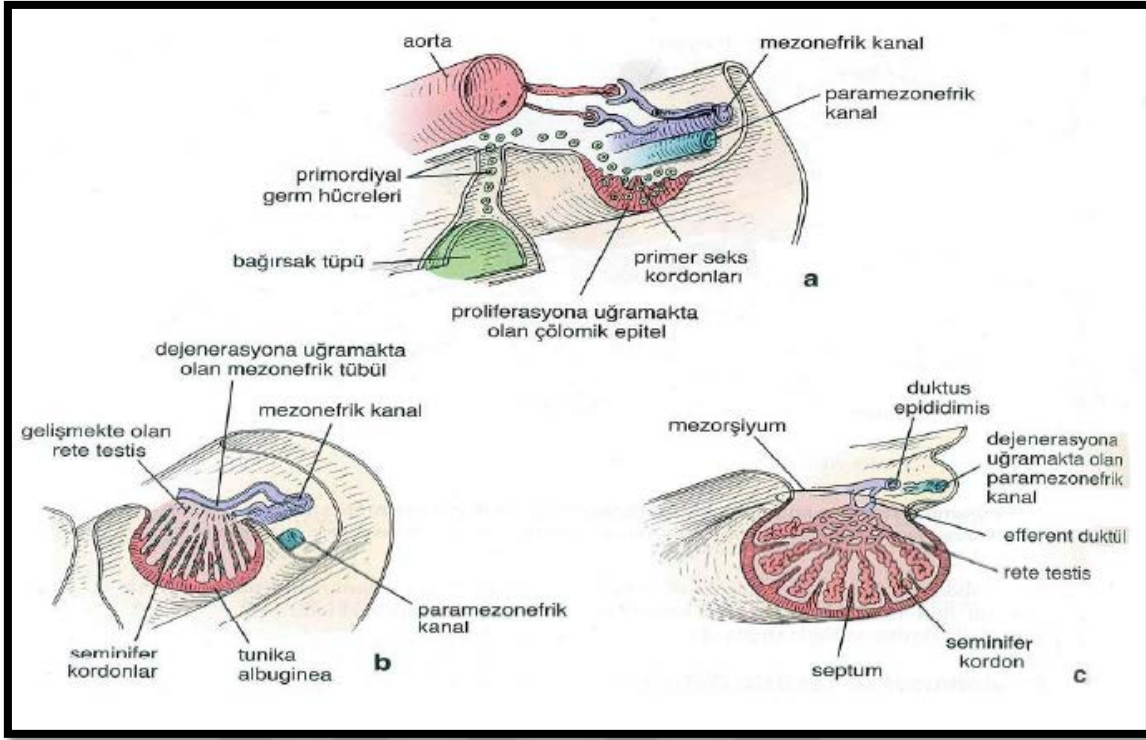
Testis kordonları dördüncü ayda atnalı şeklindedir ve rete testis ile devam eder. Puberteye kadar testis kordonları spermatogoniyalar ve sertoli hücrelerinden oluşan solid yapılar şeklinde bulunur. Pubertede testis kordonlarında lümen oluşumuyla seminifer tübüller gelişir (2). Testesteron hormon miktarı artışıyla spermatogenez başlar (3)



Şekil 1. Üç haftalık embriyonun şematik çizimi A) Vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki primordial germ hücrelerini gösteren üç haftalık embriyo, B) Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göç ederken izlediği yol (2).

Leydig hücreleri gonadal kabartının mezonefrosundan oluşur. Sekizinci haftadan itibaren dış genital ve mezonefrik duktusların erkek olarak farklılaşmasını sağlayan testosteron ve androstenedion salgılamaya başlarlar. Sekiz ile on iki haftalık dönemde pik yapan insan koryonik gonadotropin hormonu testosteron üretimini uyarır. Fetal testislerdeki sertoli hücrelerince salgılanan anti müllerian hormon paramezonefrik duktusların gelişimini baskılar.

26. haftada embriyodaki boyut artışı ve pelvisin genişlemesiyle testisler inguinal kanaldan geçerek skrotuma doğru inmeye başlar (1). Testislerin büyümesi, büyüyen karın içi organların oluşturduğu artan intraabdominal basınç ve mezonefrosun gerilemesi testislerin karın arka duvarı boyunca hareketine olanak tanır. Bu süreç testisten skrotuma doğru uzanan fibröz yapı olan gubernakulum testis rehberliğinde ve androjen hormonların kontrolünde gerçekleşir. Fetal gelişim sırasında peritonun parmaksı çıkıntısı olan processus vaginalis karın ön duvarı tabakalarını da beraberinde sürükleyerek gubernakulum testisin izinde skrotuma ulaşır (5). İniş sürecin de testisler aorta ile beslenmeye devam eder. Testiküler damarlar lumbal bölgeden skrotum içine kadar iner (2). Testislerin skrotuma inişi iki üç gün sürer. Terminde doğmuş bebeklerin %97' sinden fazlasında testisler skrotum içindedir. Doğumda inmemiş olan testislerin çoğu da bir yaşına kadar skrotuma iner (4).



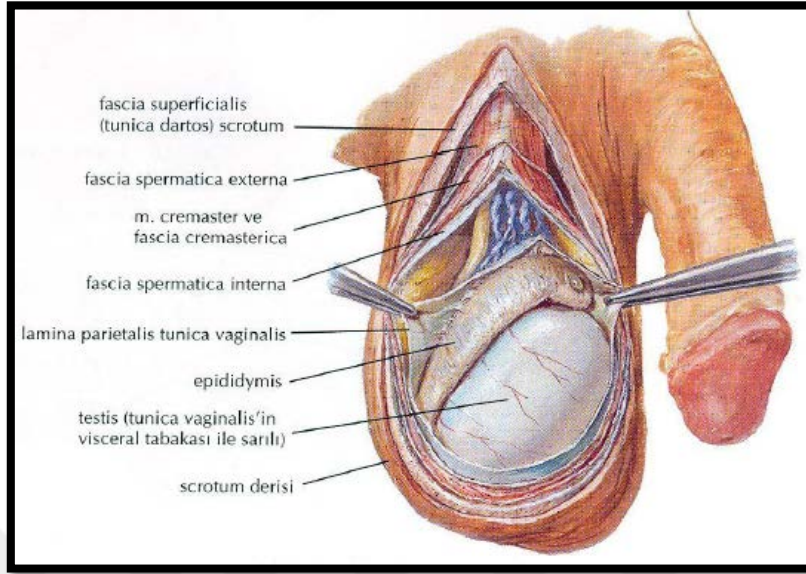
Şekil 2. Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı a) Bu diyagram beş haftalık bir embriyoda farklaşmamış gonad evresini göstermektedir. **b)** Testis belirleyici faktörün etkisi altındaki gonadın testosteron üretimini, primer seks kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşmasını göstermektedir. **c)** Testiküler gelişiminin son evresi (3).

2.1.2. Testis Anatomisi

Skrotumun içinde funikulus spermatikusa asılı biçimde bulunan, erkek üreme hücrelerinin yapıldığı bir çift organdır (Şekil 3). Üst ucu öne ve dışa, alt ucu arkaya ve içe dönük oblik pozisyonda skrotumda durur. Testisler eliptik şekildedir. Facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır. Her testisin ağırlığı yaklaşık 11-14 gr olup genelde sol testis sağdakine göre bir cm daha aşağıdadır (5). Testisler yaklaşık beş cm uzunlukta, iki buçuk cm genişlikte, üç cm kalınlıktadırlar ve iri bir badem şeklindedirler. (4).

Testislerin üst ucunda kadınlarda tuba uterinanın abdominal ucuna karşılık gelen appendiks testis denen küçük yassı bir yapı vardır. Testislerin arka kenarında bulunan epididimisin medialinde, margo posteriorda funikulus spermatikus vardır (5). Visseral periton (epiorşiyum) testisin düz ve konveks olan ön kenarını, her iki yüzünü ve uçlarını

kaplar. Arka kenarının ise lateral kısmı peritonla kaplıdır. Medial kısmı peritonsuzdur ve buraya epididimis tutunur. Buradan damarları, sinirleri ve kanalları geçer (4).



Şekil 3. Skrotum ve içindeki yapıların şematik çizimi (6).

Tunica vaginalis; fasya spermatica interna ve skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis ve testisi saran lamina visceralis (epiorşiyum) katmanlarını oluşturur. Katmanlar arasında testislerin hareketine olanak sağlayan sıvı bulunur (1).

Testisler tunika vaginalisten başka dıştan içe doğru tunika albuginea ve tunika vasküloza ile sarılmıştır. Tunika albuginea epiorşiyumun altında bulunan kalın fibröz tabakadır. Testisin arka kenarından testis parankimine doğru mediastinum testis (corpus higmorei) denen dikey bir yarım bölme gönderir. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından birçok fibröz bölme (septula testis) çıkar, testis parankiminden geçer ve tunika albugineanın iç yüzüne uzanarak testisi 250-300 lobcuğa (lobuli testis) böler (7). Lobuli testislerin içindeki tubuli seminiferi concorti denen kıvrımlı kanalcıklar testis parankimini oluşturur. Her bir kanalcık tubuli seminiferi rekti denen mediastinum yakınındaki düz kanalcığa uzanır. Bütün kanalcıklar mediastinumda ağ yaparak rete testisi oluşturur. Lobuli testislerde üretilen spermiumlar rete testis ve ductuli efferentesten geçerek epididimise ulaşır.

Tunika vasküloza testis parankimini sarar ve tunika albugineanın iç yüzünü örter. Testisin damar ağından oluşur.

Testisin arteriyel kanlanması aorta abdominalisin dalları olan sağ ve sol a. testicularis ile sağlanır. Her bir testisin arka kısmından çıkan küçük venler birleşir ve

pleksus pampiniformis venöz ağını oluşturur. Funiculus spermaticus ve canalis inguinalisten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Bu pleksustan çıkan iki ven birleşerek v. Testicularis oluşturur. Sağda v. Testicularis dextra v. Cava inferior'a solda v. Testicularis sinistra v. Renalis sinistra' ya dökülür.

Lenf damarları funiculus spermaticus ile beraber karın boşluğuna geçer nodi aortici laterales ve nodi preaorticiye dökülür.

Testisler medulla spinalisin torakal on ve on birinci segmentlerinden gelen sinirlerle inerve edilir. Pleksus aorticus ve renalisten geçerek testisleri besleyen damarların çevresinde organa ulaşır (5,7).

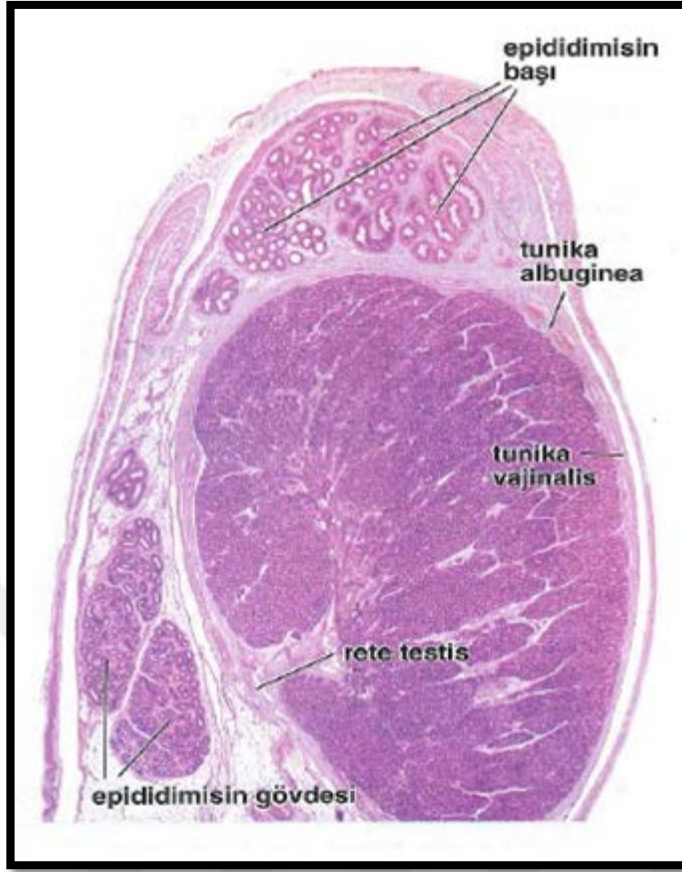
2.1.3. Testis Histolojisi

Endokrin ve ekzokrin özellikte birleşik tübüler bezdir. Endokrin olarak leydig hücrelerinden androjenik hormonlar salgılar. Ekzokrin olarak aktif holokrin biçimde spermium salgılar (8).

Testis parankiması üç tabaka ile örtülmüştür. İçten dışa doğru tunika vasküloza, tunika albuginea ve epiorşiyumdur. Epiorşiyum testisin inişi sırasında beraberinde sürüklediği peritonun visseral yaprağıdır. Tunika albuginea epiorşiyumun altında bulunan kalın fibröz tabakadır. Testisin arka kenarından testis parankimine doğru mediastinum testis (corpus higmorei) denen dikey bir yarım bölme gönderir (7).

Testis parankiması üç tabaka ile örtülmüştür. İçten dışa doğru tunika vasküloza, tunika albuginea ve epiorşiyumdur . Epiorşiyum testisin inişi sırasında beraberinde sürüklediği peritonun visseral yaprağıdır. Tunika albuginea epiorşiyumun altında bulunan kalın fibröz tabakadır. Testisin arka kenarından testis parankimine doğru mediastinum testis (corpus higmorei) denen dikey bir yarım bölme gönderir (7).

Testisler tunika albuginea adında kalın fibröz bir kapsülle sarılmıştır (Şekil 4). Testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Buradan çıkan ince fibröz uzantılar bezin içine ilerleyerek yaklaşık 250 testiküler lobülü oluşturur. Her lobül bir ila dört adet kadar seminifer tübül içerir. Seminifer tübüllerin etrafı kan ve lenf damarları, sinirler ve intersitisyel leydig hücrelerini içeren tunika vasküloza adında gevşek bağ dokusuyla çevrilidir (9). Lobüldeki seminifer tübüller oldukça kıvrıntılıdır. Kendi üzerlerinde katlanarak halka yaparlar. Mediastinum yakınında kısa düz seyredeler ve tubulus rektus adını alırlar. Mediastinuma girdiğinde anastomozlaşır rete testis denen kanal sistemini oluşturur (3).



Şekil 4. İnsan testisinin sagital kesitinin histolojik görüntüsü (3).

2.1.3.1. Seminifer Tübül

Seminifer tübüller spermatogenik hücrelerin üretildiği yerdir. Her bir testis 250-1000 adet seminifer tübül içerir. Bir tübülün uzunluğu 30-70 cm, çapı 150-250 mikron kadardır. Toplam uzunlukları 250 metreyi bulur. Oldukça kıvrımlı olan tübüllerin başlangıcı kör uçludur. Lümeni sonlara doğru daralır tubuli rekti denen kısa düz tübüller olarak devam eder. Rete testis adındaki anastomozlaşan kanallar sistemiyle devam eder. Rete testis 10-20 kadar duktuli efferentes yardımıyla epididimis başına bağlanır (9).

Seminifer tübüller tunika propria ile sarılmış çok katlı özel bir epitelden oluşur. Epiteli sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler oluşturur. Puberteye kadar en çok bulunan hücre tipi sertoli hücreleridir. Puberteden sonra sertoli hücrelerinin çoğalmaları durur ve ileri yaşlara kadar spermatogenik hücreler baskın hücre popülasyonunu oluşturur.

2.1.3.1.1. Sertoli Hücreleri

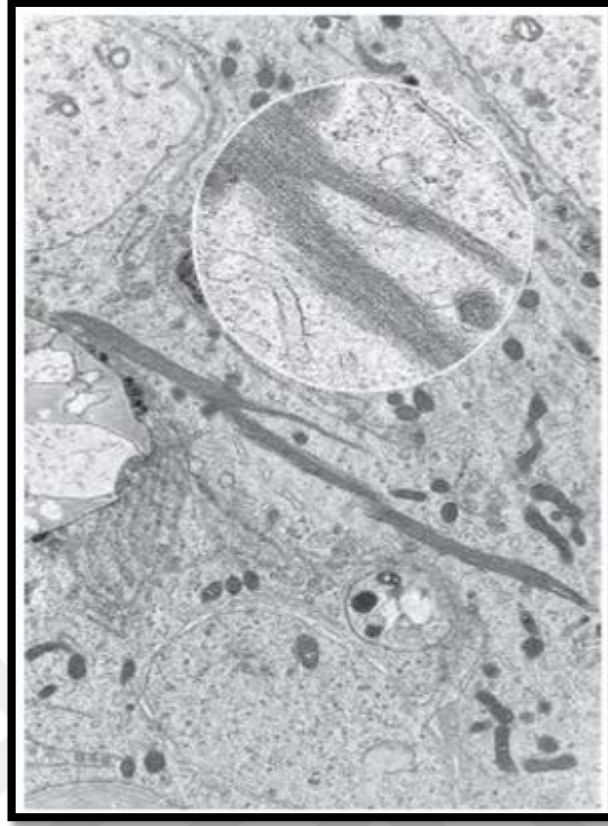
Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri apikal ve lateral uzantıları sayesinde destekleyen saran prizmatik hücrelerdir. Epitelin bazalinden lümenine kadar uzanır. Mayoz

sonrası spermler sertolinin apikaline tutunurlar. Sitoplazmasında yaygın gelişmiş golgi cisimcikleri, mitokondriler, lizozomlar, lipid damlacıkları, glikojen granülleri ve mikrotübüller içerirler. Karakteristik inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher) ince kristaloidler şeklinde sitoplazmada bulunur (Şekil 55). Oval yapıdaki ökromatik nükleusunda derin içe katlantılar bulunur.

Sertoli hücreleri bazolateral bölgelerinden sıkı bağlantılarla bağlanarak epitelyum bazal ve luminal kompartmanlara ayırırlar. Sertoli hücreleri arasındaki bu bağlantı kompleksi en az 50 sıkı kaynaşma çizgisi, plazmalemmaya paralel uzanmış düz endoplazmik retikulum ve aktin filamentlerinden oluşur. Vücudun immün olarak tanımadığı spermatid ve spermatositler luminal kompartmanda, spermatogonyum ve erken spermatositler ise bazal kompartmanda bulunur. Kan-testis bariyeriyle ayrılan bu hücreler besin alışverişini ve metabolit atılımını sertoli hücreleri aracılığıyla gerçekleştirirler. B tipi spermatogonyumların mitoz geçirmesiyle oluşan erken spermatidler bazalden mayoz sürecini geçireceği adluminal kompartmana geçerler. Bu hareket sertoli hücre uzantılarıyla yeni bağlantıların oluşumu ve eski bağlantıların yıkımıyla gerçekleşir.

Sertoli hücreleriyle geç spermatidler arasında da benzer yapıda bağlantı kompleksleri bulunur ancak burada sadece tutundurma fonksiyonuna sahiptir ve aktin filamentleriyle aER (düz endoplazmik retikulum)' dan yoksundurlar. Ayrıca erken spermatidlerle desmozom benzeri bağlantı kurarken bazal laminada hemidesmozomlarla bağlantı kurar.

Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri destekler, korur ve besler, olgun spermatidlerin tübül lümenin salınımına aktin aracılı kasılmalarla yardımcı olur, spermatidlerce atılan rezidüel cisimcikleri fagosit ederler. Androjen bağlayıcı protein salgılayarak seminifer tübüllerde spermatogenez için gerekli yüksek androjen konsantrasyonunu sağlarlar. Aktivin ve inhibin hormonlarını salgılayarak hipofizden FSH (follikül uyarıcı hormon) salınımını regüle ederler. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar sayesinde kan testis bariyerini oluştururlar.



Şekil 5. İnsan sertoli hücresinde görülen karakteristik Charcot-Böttcher kristaloid cisimciklerin geçirimli elektron mikrofotografı (3).

2.1.3.1.2. Spermatogenezis

Puberte öncesinde gonadotropinlerin etkisiyle başlayıp ömür boyu süren spermatogonyumlardan spermilerin üretilme sürecidir. Spermatogonya fazından spermium oluşumu 64 gün sürer. Spermatogonyanın bölünme evresinde geçen süre de eklenirse yaklaşık 74 gündür. Spermatogenez süreci için üç ayrı faz tanımlanmıştır.

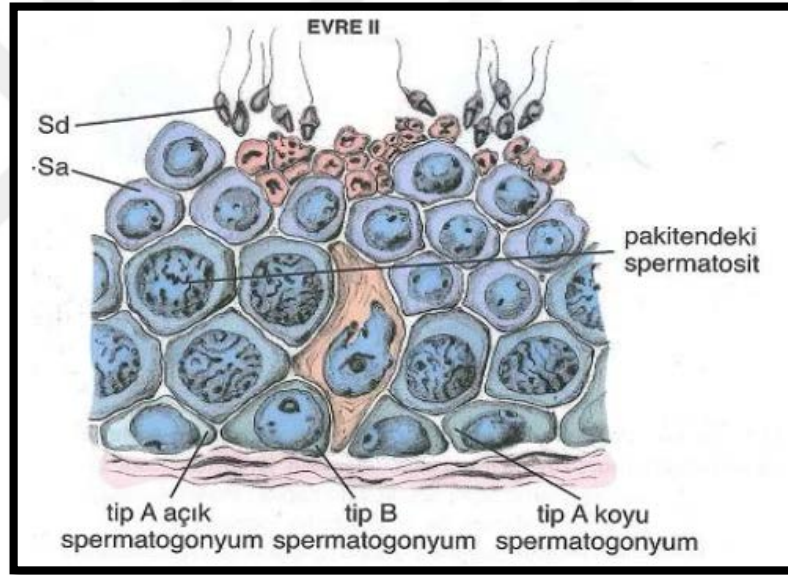
2.1.3.1.2.1. Spermatogonyal Faz (Mitoz)

Spermatogonyal kök hücrelerin seri mitotik bölünmelerle yerlerini dolduracak spermatogonyal hücreleri ve spermatositleri oluşturacak olan spermatogonyumları oluşturduğu süreçtir. Spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşırlar. Spermatogonyal faz insanda yaklaşık on gün sürer.

Spermatogonyumlar yaklaşık 12 µm çapında olup seminifer tübül bazal laminası üzerine otururlar. Bazal kompartmanda kan testis bariyerinin altında bulunurlar. Nükleuslarının görünümüne göre tip A açık ve koyu , tip B olmak üzere üç tip spermatogonyum bulunur. Tip A koyu spermatogonyumlar oval şekilli, yoğun bazofilik ve

ince granüllü kromatinli nükleuslara sahip rezerv kök hücre görevindedir. Tip A koyu spermatogonyumlar tam sitoplazmik bölünme geçirerek tip A açık ve koyu spermatogonyumları oluşturur. Tip A açık spermatogonyumlar açık renk boyanan ince granüllü kromatini olan oval nükleuslu hücrelerdir. Tip A açık spermatogonyumlar mitotik ya da mayotik bölünmelere uğrarken kardeş hücreler ince bir sitoplazmik köprüyle bağlı kalırlar. Bu sitoplazmik köprüler spermatid maturasyonu sonuna kadar sağlam kalır. Tip A açık spermatogonyumlar birkaç bölünme sonrası tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar (Şekil 6).

Tip B spermatogonyumlar merkezi yerleşimli, yuvarlak şekilli ve ökromatik nükleuslara sahipken az miktarda sitoplazmik organel içerirler. Mitozla çoğalarak primer spermatositleri oluştururlar.

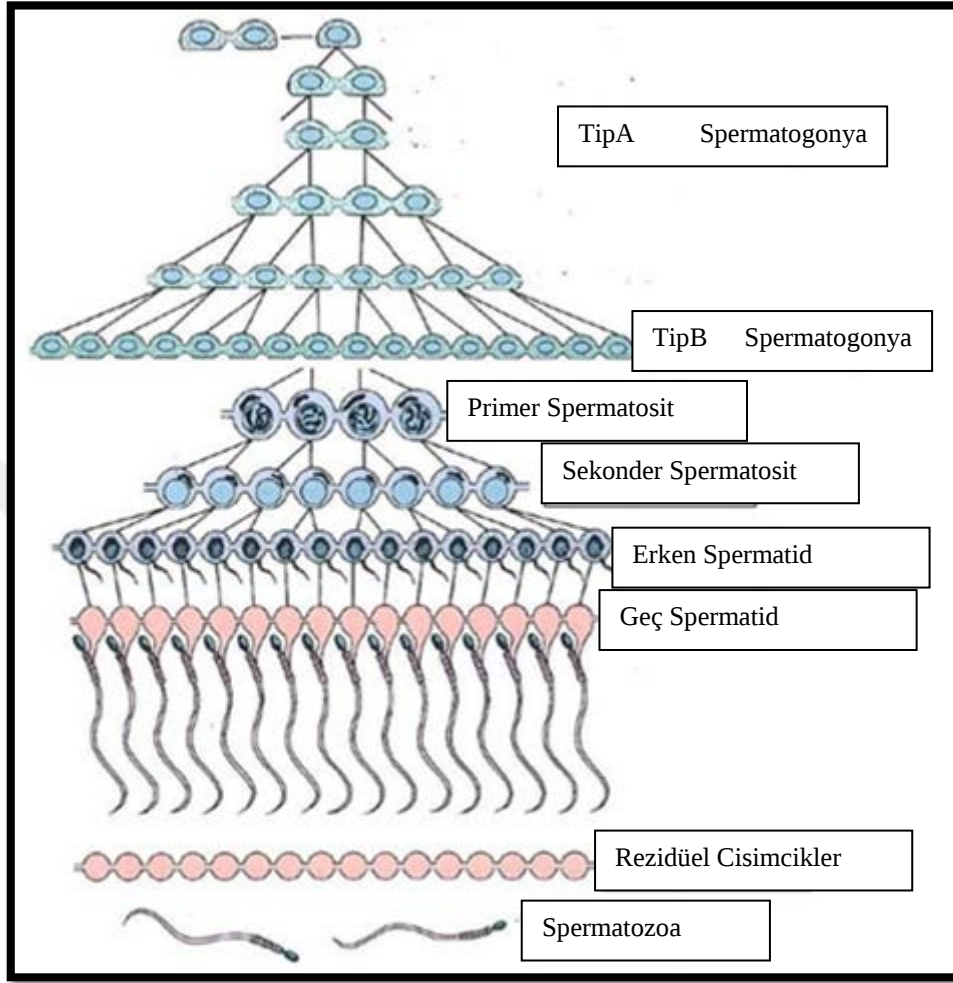


Şekil 6. İnsan seminifer epitelindeki tip A koyu ve açık, tip B spermatogonyumları gösteren bir çizim (3).

2.1.3.1.2.2. *Spermatosit Fazı (Mayoz)*

Primer spermatositlerin mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azalttıkları fazdır. Spermatositler sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların üzerinde, adluminal kompartmanda bulunurlar. Tip B spermatogonyumların mitoz geçirmesiyle primer spermatositler oluşur (Şekil 7). Primer spermatositler mayoz bölünmeye başlamadan önce DNA replikasyonu geçirirler. Normal $2n$ sayıda kromozom

içerirken her kromozomun iki kardeş kromatidden oluştuğu iki kat miktarda (4d) DNA içerirler.



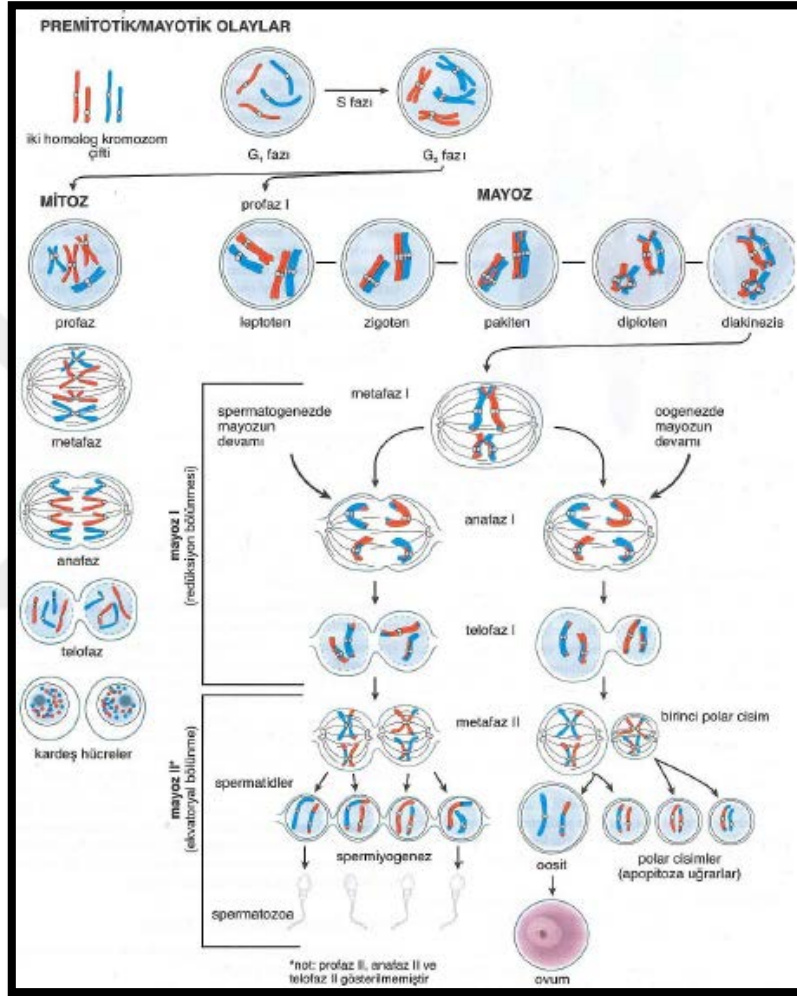
Şekil 7. Spermatogenezin aşamaları(3)

İnsanda 22 gün süren birinci mayotik bölünme sonucunda haploid kromozom ve diploid miktarda DNA içeren sekonder spermatositler oluşur. Birinci mayoz uzun sürdüğü için seminifer tübül kesitlerinde primer spermatosit daha çok görülür.

Mayoz-1 profaz evresinde kromatin yoğunlaşarak kromozomları oluşturur. Profaz sonunda 44 otozomal ve birer X ile Y kromozomunun her birinin iki kromatid içerdiği görülebilir. Metafaz çizgisi boyunca homolog kromozamlar dizilir ve eşleşir. Homolog kromozom çiftleri genetik materyal alışverişi yaptıkları crossing-over süreci geçirirler. Bu alışveriş sırasında dört kromatidden oluşan tetrad yapısı yeniden düzenlenir ve üç parçalı sinaptonemal kompleksi oluşturur. Homolog kromozomlar crossing-over sonunda ayrılarak

zıt kutuplara hareket eder. Genetik çeşitliliği garantileyen bu süreç sonunda her bir spermatositten dört adet farklı spermatid oluşur.

Mayoz-II öncesinde tekrar bir DNA eşlemesi görülmez. İkinci mayotik bölünme sonucunda her bir sekonder spermatositte iki adet spermatid oluşur. Spermatidlerin her biri tek bir kromatid içeren haploid sayıda kromozoma sahiptir (Şekil 8). Sonrasında spermatidlerden spermatozoaların oluştuğu spermiyogenez denen farklılaşma süreci başlar.



Şekil 8. Spermatogonyal hücrelerdeki mayoz ve mitozun karşılaştırılması(3)

2.1.3.1.2.3. Spermatid Fazı (Spermiyogenez)

İkinci mayoz bölünme sonucu oluşan spermatidlerin farklılaşarak spermium oluşturma sürecidir. Farklılaşma sürecinde bölünme olmaz ve kromozom sayısı değişmez. Haploid kromozomlu spermium döllenme sonucunda diploid hücre oluşturur. Spermiyogenez golgi, kep, akrozom ve olgunlaşma fazlarını içerir.

Golgi fazı: Proakrozomal granüller denen PAS pozitif granüller spermatidin golgi kompleksinde birikir. Bu granüller akrozomal vezikülün içinde birleşerek akrozomal granülü oluştururlar. Spermin anterior kutbunda akrozomal vezikül büyürken sentrioller posterior kutba göç eder. Dokuz periferik ve bir çift merkezi mikrotübül yapısında olan flagellar aksonem oluşmaya başlar.

Kep fazı : Nükleusun ön kısmında akrozomal vezikül yayılır ve akrozomal kep oluşur. Nükleus yoğunlaşır, nükleer zar parçalarını yitirir ve kalınlaşır. Nükleus da kondanse olur.

Akrozom fazı: Spermatid bu aşamada kuyruk kısmı seminifer tübül lümenine bakacak şekilde sertoli hücrelerine gömülür. Flagella gelişirken, nükleus yassılaşır ve uzar . Sitoplazma arka kısma yönelir, akrozom ön zara yönelir. Mikrotübüller akrozomdan spermatidin arka kutbuna kadar uzanarak, manşet denen silindirik kılıf yapısını oluşturmaya başlar. Önceden flagella gelişimini başlatmış olan sentrioller çekirdeğin arkasında sık bir oluğa tutunurlar. Burada boyun veya bağlantı parçasını oluştururlar. Flagellum büyürken plazmalemma da üzerinde arkaya doğru ilerlerken manşet kaybolur. Mitokondriler sperm kuyruğunun orta parçasını oluşturmak üzere fibrillerin etrafını helikal şekilde sarar.

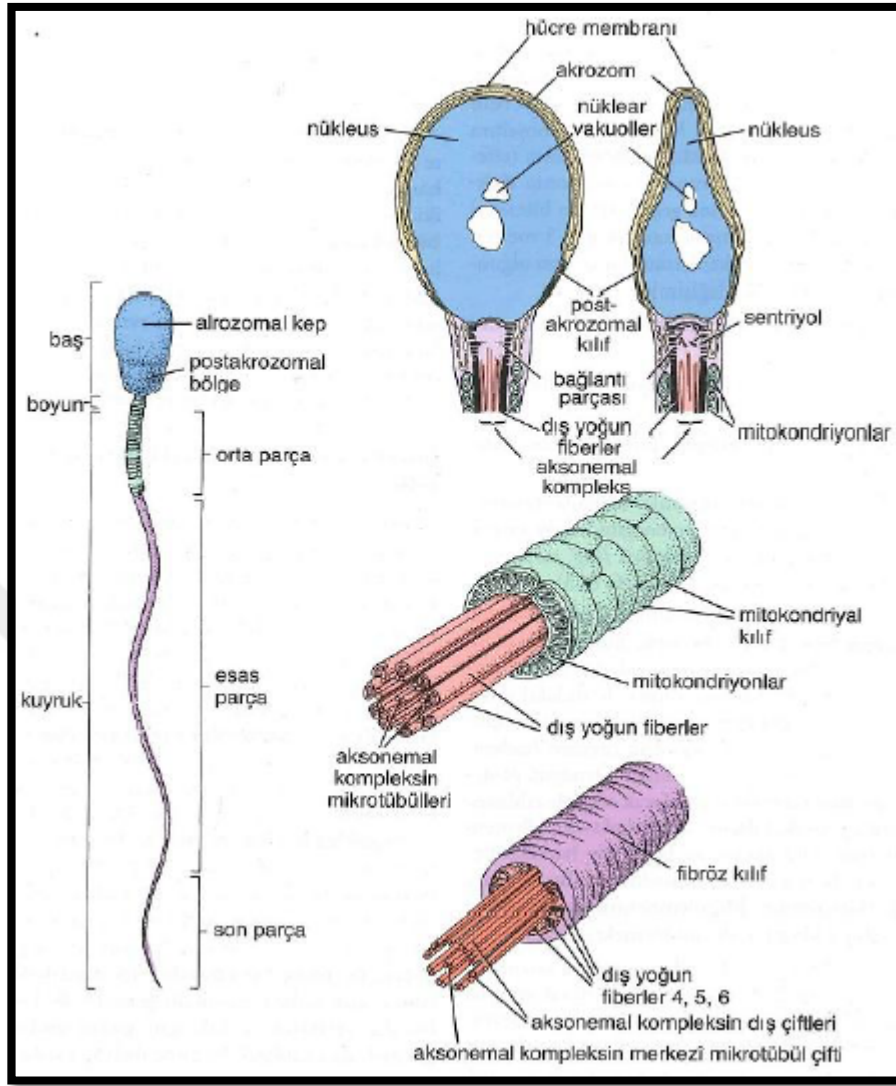
Olgunlaşma fazı: Flagelladaki fazla sitoplazmanın atıldığı ve matür spermatozoonun olduğu aşamadır. Sertoli hücreleri atılan rezidüel cisimcikleri fagosite eder. İnterselüler köprülerini rezidüel cisimciklerde bırakan spermatidler, birbirlerine bağlı olmadan sertoli hücrelerinden salınırlar. Spermatidlerin seminifer tübül lümenine salınması sürecine spermiyasyon denir. Ejekülattaki sperm sayısı spermiyasyon hızına bağlıdır (3).

Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Matür insan sperminin boyu ortalama 60 µm kadardır. Spermin başının uzunluğu dört buçuk µm, genişliği üç µm ve kalınlığı bir µm kadar olup yassı ve sivri yapıdadır. Nükleusun ön üçte ikilik kısmı hyaluronidaz, asit fosfataz, akrozin, nöraminidaz gibi enzimler içeren akrozomal kep ile sarılıdır. Akrozomal enzimler spermin ovumun zona pellucidasını aşması için gereklidir. Spermin ovuma temas etmesiyle enzimler salınır ve akrozom reaksiyonu başlar. Gelişen komplike olaylar zinciri tek bir spermin penetrasyonuna ve fertilizasyona yardımcı olur.

Spermin kuyruğu boyun, orta, esas ve son olmak üzere dört bölümden oluşur. Boyun kaba fibrillerin ilk kısmı ve sentriolleri içeren kısa bölümdür. Orta parça yedi μm kadardır. Kalın fiberler ve aksonemal kompleks çevresinde heliks şeklinde sarılmış mitokondriyonlar bulunur. Spermin hareketi için gerekli enerjiyi bu mitokondriler üretir. Esas parça 40 μm kadardır. Aksonemal kompleks ve kalın fibrillere ek olarak etrafı fibröz kılıfla sarılıdır. Son parça ise sadece aksonemal kompleksi içeren beş μm uzunluğundaki kısımdır (Şekil 99).

Spermiler ilk salındığında hareketsizdirler. Sertoli hücrelerince üretilen sıvının içinde yüzerler. Lamina propriyadaki peritübüler kontraktıl hücrelerin peristaltik kasılmalarının yardımıyla seminifer tübüllerde yol alırlar. Seminifer tübüllerde düz tübüller, rete testis, duktuli efferentes sırasıyla ilerleyerek duktus epididimise ulaşırlar. Spermiler oldukça uzun ve kıvrımlı olan duktus epididimiste ilerlerken hareket yeteneği kazanır. Epididimiste spermin intrasellüler cAMP (siklik adenosin monofosfat), pH ve kalsiyum iyon seviyelerinde olan değişimler flagellar protein kinaz ve fosfatazları etkiler. Protein fosforilasyonundaki bu değişiklikler spermin motilite kazanmasını sağlar. Spermiler epididimiste ayrıca olgunlaştırıcı değişiklikler geçirirler. Spermin çekirdek DNA'sı yoğunlaşır ve sitoplazması azalır. Plazmalemmasının lipid ve protein yapılarında değişiklikler ve glikozilasyon olur. Spermin fertilize etme kabiliyetini inhibe etmek için dış akrozom membranında değişimler olur ve dekapasitan faktörler eklenir. Duktus epididimisi saran düz kasların yardımıyla distale ilerleyen spermiler burada depolanır. Erkek genital kanallarında birkaç hafta yaşayabilen sperm hücreleri dışıde sadece iki üç gün canlı kalabilir. Dışı genital duktuslarında sperm membranında bulunan glikokonjugatların ayrıldığı ve yenisiyle değiştirildiği kapasitasyon süreci geçirirler.



Şekil 9. Bir insan spermatozoonunun diyagramı (3)

2.1.3.2. İnterstisyel Bağ Doku

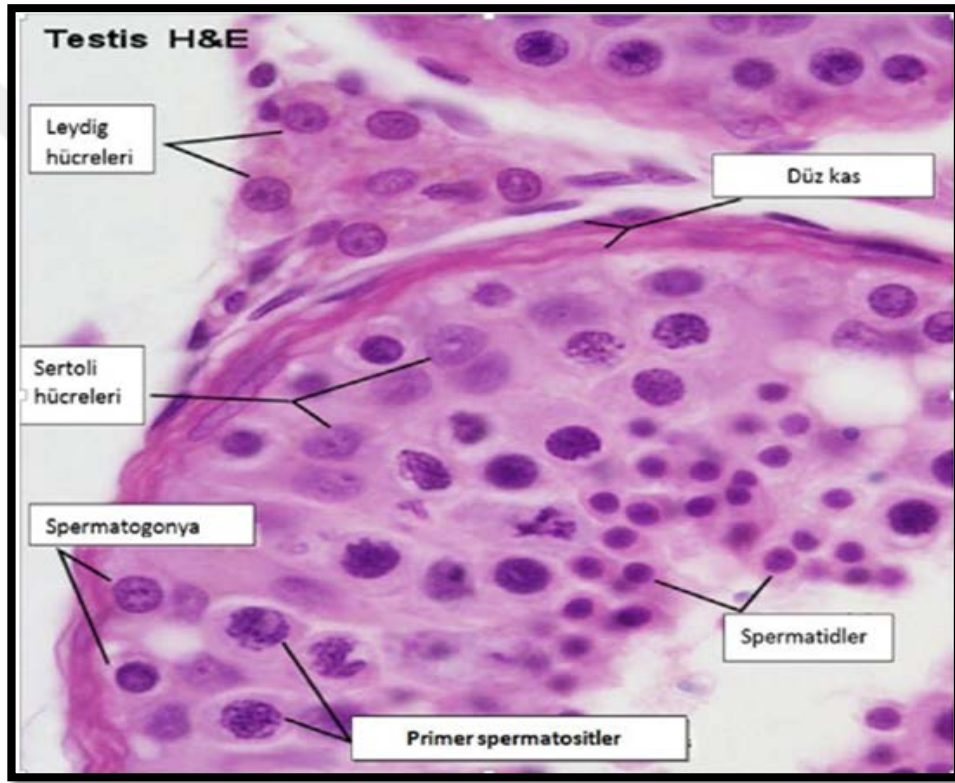
2.1.3.2.1. Miyoid Hücreler

İnsanda testis seminifer tübül bazal laminasının etrafında üç beş sıra dizilmiş peritübüler kontraktıl hücreler (miyoid) ve kollajen fiberler bulunur. Bu peritübüler doku fibroblast içermez. Miyoid hücrelerin bolca granüllü endoplazmik retikulum içermesi fibroblastlar gibi kollajen sentezleme özelliği olduğuna işaret eder. Miyoid hücreler içerdikleri aktin flamanlar sayesinde ritmik kasılmalar gerçekleştirirler. Böylece testiküler sıvı ve spermatozoaların seminifer tübüllerden akışını sağlayan peristaltik dalgalar oluşur. Epididimisi geçene kadar spermler hareket yeteneği kazanmamışlardır ve tübüler peristaltik kasılmalarla yol alır. Leydig hücreleri kan ve lenf damarları miyoid tabakanın

dışında yer alır (Şekil 10). Yaşlılıkla birlikte tunika propriyanın kalınlığı artar, seminifer tübül boyutları azalır ve sperm üretimi düşer (3).

2.1.3.2.2. Leydig Hücreleri

İntersitisyel hücreler olarak da adlandırılırlar. Leydig hücre sayısı ve işlevselliği hormonal uyarılara bağlıdır. Gebelikte plasentadan salınan insan koryonik gonadotropinler fetusteki leydig hücrelerini uyarır. Erkek genital sistemin farklanması için gerekli androjenleri üretir. Gebeliğin dördüncü ayında aktivitesi azalarak geriler. Pubertede hipofizden salınan lüteinizan hormonun etkisiyle yeniden testosteron sentezlemeye başlar (10).



Şekil 10. Testisin leydig hücrelerini içeren histolojik görüntüsü (11).

2.2. Kemoterapötik Ajanlar

1. Antrasiklinler
2. Alkilleyiciler
3. Antimetabolitler
4. Anti-mikrotubul ajanlar
5. Monoklonal antikorlar
6. Diğer Ajanlar

2.2.1. Alkilleyici İlaçlar

Birinci Dünya Savaşı'nda kükürtlü hardalların Almanlar tarafından kimyasal silah olarak kullanılmasıyla insanlarda kemik iliği ve lenfoid dokuya toksik olduğu belirlenmiştir. Böylelikle azotlu hardallar deney hayvanı tümör çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. 1948 yılında ilk kez mekloreタミン klinik kullanıma girerek modern kanser kemoterapisi dönemini başlatmıştır. Dolayısıyla alkilleyici ilaçlar en sık kullanılan kemoterapötiklerden biri olmasının yanında bu konuda ilktir (12).

2.2.1.1. Alkilleyici İlaçların Etki Mekanizması

Alkilleyiciler ön ilaçlardır. Alkilleyici ilaçlar kanserli hücrede yapılarına uygun pozitif yüklü etilenimonyum ve karbonyum türevlerine dönüşürler. Karbonyum iyonu DNA'nın içerdiği negatif yüklü olan amino, tiyol, fosfat, hidroksil, fosfat, imidazol gruplarına ve nükleik asitlere geri dönüşsüz şekilde kovalent bağlarla bağlanır. Böylece antineoplastik etkiyi gerçekleştirecek olan alkillenme olur.

Alkillenme DNA transkripsiyon ve replikasyonunu bozar. Alkilleyici ilaçlardan oluşan reaktif metabolitler genellikle DNA üzerindeki guanin nükleik asitinin yedi nolu azot atomuna bağlanır. Bu durumda DNA'da üç önemli değişiklikten birine neden olur. Guanin, sitozin yerine adenin ile baz eşleşmesi yaparak DNA ve mRNA moleküllerinde bozukluk yapabilir. İmidazol halkası açılan guanin parçalanabilir ve buradan DNA kırılabilir. En önemlisi reaktif metabolitler farklı DNA zincirlerindeki guaninler arasında çapraz bağlantı kurarak DNA replikasyon ve transkripsiyonunu imkansız kılabilir.

Alkilleyici ilaçlar enzim ve proteinleri etkileyerek hücresel solunumu da bozarlar. Hücre oluşturdıkları bozukluklar radyoaktif ışınlarla maruz kalan hücrelerdekinde benzediğinden radyomimetik ilaçlar olarak da adlandırılırlar(12).

2.2.1.2. Alkilleyici İlaçların Ortak Farmakolojik Özellikleri

Lenfoid doku ve kemik iliğini baskılar. Tek dozluk kullanımla kemik iliğinde uzun süren baskılanma oluşturur ve geç dönemde de kan sayımı tablosuna yansır. Lenfoid dokuda yaptığı bozukluklarla immünoşüpresif etki oluşturur. Kanda lökosit, lenfosit ve platelet sayısı azalır. Bu etkilerin devam etme süresi ilaca göre değişmekle birlikte en kısa etki üç haftayla siklofosamid kullanımıyla oluşur.

Bulantı, kusma ve iştahsızlık sıklıkla görülür. Ağız ve barsak mukozalarında iltihaplanma ile ülserasyon (mukozit) yapabilirler. Mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkileri bulunur. Siklofosamidle daha sık olmakla birlikte alopesi yapabilirler.

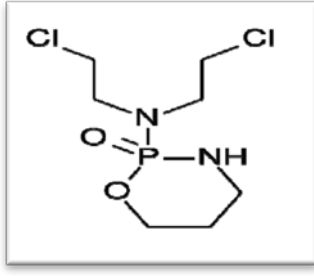
Siklofosfamide özgü yan etkisi steril hemorajik sistit ve üroteliyal toksisitedir. Sistit zaman içinde fibrozise dönüşebilir ayrıca mesane kanseri gelişebilir. İntravenöz mesna (merkapt-etan sülfonat) kullanılarak bu yan etki önlenabilir. Böbreklerden değişmeden atılan mesna mesane içinde akroleinle kompleks oluşturarak inaktive eder. Gonadlara toksik etkileri bulunmaktadır.

Siklofosfamid, klorambusil gibi bazı alkilleyiciler su bulunan alanlarda karbonyum türevlerine yavaşça dönüştüklerinden dokuda nekroz yapıcı etki olmadan oral alınabilir. Siklofosfamid oral veya intravenöz yolla kullanılabilir (12). Siklofosfamid, ifosfamid ve dikarbazin farmakokinetik olarak ön ilaçtır (13). Karaciğerde aktif metaboliti olan fosforamid hardalına dönüşür. Hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde başarıyla kullanılır. İmmünbaskılayıcı etkisi sebebiyle de romatoid artrit, Behçet hastalığı, nefrotik sendrom ve diğer birçok otoimmün hastalıklarda kullanılır (12).

2.2.1.3. Siklofosfamid

Siklofosfamid kokusuz, beyaz renkli ve moleküler ağırlığı 279,1 olan kristalin tozdur (şekil11). Siklofosfamid immünsüpresyon ve bir çok malignensi tedavisinde oral olarak günlük 100-200 mg ya da intravenöz olarak üç dört haftada bir 600-1000 m²/kg dozda verilebilir. Her iki yöntemle de maksimum kan plazma konsantrasyon seviyesine yaklaşık bir saat içinde ulaşır. Eleminasyon yarı ömrü beş ile sekiz saat arasındadır. Dokulardaki siklofosfamidin dağılımı plazma ile paralellik gösterir, %67' si proteine bağlı siklofosfamid metaboliti olarak bulunur. Normal hepatik ve renal fonksiyona sahip hastalarda tüm vucüttan hepatik eleminasyonu 5,4 l/h hızla gerçekleşir. İlacın %10 u idrarla değişmeden atılırken siklofosfamidin çoğunluğu inaktif metabolitler halinde atılır (14). İlacın safradaki konsantrasyonu kan plazmasındakiyle benzer olmasına karşın enterohepatik geri dolaşıma bağlı olarak dışkıda oldukça az bulunur (15).

Siklofosfamid karaciğerde aktif karma fonksiyonlu oksidazlarca aktif metabolitlerine dönüşür . Bu metabolitler kan akımı yoluyla kanserli hücrelere ulaştırılır (16).



Şekil 11. Siklofosfamidin moleküler yapısı.

2.2.1.3.1. Siklofosfamid ve Fertilité

Kemoterapi alan hastalarda sağ kalımı arttırmak kadar fertilitenin korunması da önemli bir konudur (17,18). Siklofosfamid solid tümörler, immün aracılı hastalıklar da dahil olmak üzere birçok neoplastik ve non-neoplastik çocukluk çağı hastalıklarının tedavisinde kullanılan alkilliyici bir ajandır (19,20). Siklofosfamide maruz kalan erkeklerden elde edilen testiküler biyopsilerde normal bir spermatogenezde gerekli olan germinal epitelin hasarlandığı gösterilmiştir (21,22). Biyopsi bulguları da siklofosfamide maruz bırakılan erkek hastalarda klinik bulgularla desteklenmiş ve azospermi insidansının arttığı belirlenmiştir (23,24). Siklofosfamide bağlı olarak oluşan gonadal hasar doza bağlıdır, 25 g/m² 'den fazla miktarda siklofosfamid tedavisi alan hastalarla 7,5 g/m² 'den daha az dozlarda alan hastalar arasında anormal sperm oranları arasında anlamlı fark bulunur (25,26).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Oksijen insan hayatı için elzem bir moleküldür ancak vücudun sıradan fizyolojik metabolik faaliyetlerinde oluşan bazı reaktif oksijen türleri hücre hasarlanması oluşturabilir (27). Reaktif oksijen türleri değişime uğramamış oksijene göre kimyasal tepkimelere girmeye daha meğillidir. Bunların birçoğu serbest radikaldir (28). Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu olan yüksek enerjili atom, molekül veya iyonlara radikal ya da çoğu zaman serbest radikal denir. Kararsız yapıda olan bu radikaller hızla reaksiyona girerek kararlı hale geçmek isterler. Dolayısıyla oldukça reaktiftirler (29). Protein, lipid, DNA gibi hücre bilşenlerine zarar verebilecek reaksiyonlara girebilirler. Kalp ve damar hastalıkları, dejeneratif hastalıklar, kanser, yaşlanma, immün sistemi hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara neden olur (27).

Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali hücre zarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin alfa metilen gruplarından hidrojen atomunu ayırarak lipid peroksidasyonunu

başlatır. Superoksit anyonu veya H_2O_2 (hidrojen peroksit) nin; demir iyonunun katalizör olduğu Fenton ve Haber- Weiss reaksiyonlarıyla oluşan hidroksil radikali peroksidasyondan esas sorumlu radikaldir (30).

Serbest oksijen radikalleri hücreyi üç yolla hasarladığı bilinir ;

- a) Hücre zarındaki kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek peroksidasyon metabolitleri meydana getirirler. Lipid peroksidasyonu denilen bu oksidatif tepkimeler hücre zarında irreversible haraplanma oluşturur.
- b) Lipid peroksidasyonu ile oluşan radikallerden malondialdehit yapılıdır. Hücre zarındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olarak iyon geçirgenliğini ve enzim aktivitesini bozar (31). MDA (malondialdehit) hücre zarını kolayca geçerek DNA ile tepkimeye girer ve hasar oluşturur (32). Hücrenin yaşlanmasına ve kanserleşmesine sebep olabilecek DNA haraplanması yapabilir.
- c) Glutasyon ile oksidatif reaksiyona girerek sülfür içerikli radikaller oluştururlar. Bu radikaller proteinlerdeki sülfür ile disülfid bağı yaparak yapılarını bozarlar (33).

Organizmada prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulmasına oksidatif stres denir. Serbest oksijen radikalleri artarsa oksidatif stres tetiklenir (34). Antioksidan enzim sistemleri aktive edilir. Hücre içi savunma sistemleri yeterli olmazsa oksidasyona duyarlı DNA, lipid, protein ve karbonhidratları içeren hücre yapıları hasarlanır (35). Oksidatif stres oluşturan prooksidanlar canlıda bulunan glutasyon peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz gibi enzimlerle ve de transferin, seruloplazmin, askorbik asit, indirgenmiş glutasyon, alfa-tokoferol gibi antioksidanlarla elemine edilirler (36). Antioksidanların azalması veya metabolitlerinin azalmasına bakılarak antioksidan tüketimi belirlenmek suretiyle oksidatif stres değerlendirilebilir (37).

2.3.1. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin canlılarda önemli hasarlar oluşturduğu bilinmektedir. Bu hasarları önlemeye karşı antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler SOD (superoksit dismutaz), katalaz, ferritin gibi hücre içi ya da serüloplazmin, haptoglobulin, hemopeksin, transferin gibi hücre dışı olabilmektedir (38,39).

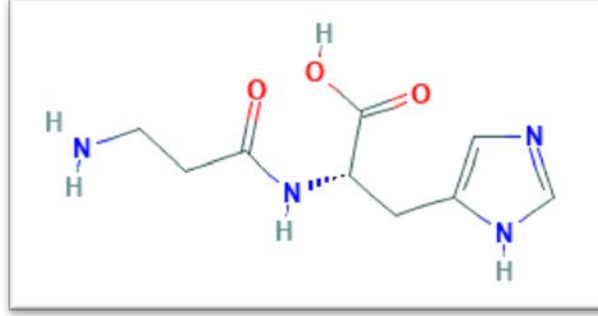
Antioksidanlar organizmayı serbest radikal hasarından korumak için çeşitli savunma yöntemleri kullanırlar;

- a) SOD ve katalaz gibi enzimlerle katalitik olarak uzaklaştırılabilir
- b) Serbest radikal oluşumu proteinler yapılarını ayırarak veya oksijen molekülüne electron aktarımını engelleyerek kontrol edebilir. Bu yolla transferrin, albumin, haptoglobulin, hemopeksin, hemoksijenazlar kullanılarak hem, bakır ve demir iyonları gibi prooksidanların etkinliği sınırlandırılabilir.
- c) Şaperon proteinleri DNA molekülünü sararak, mitokondriyal enzimler membrandaki PUFA (çoklu doymamış yağ asidi) miktarını ayarlayarak biyomolekülleri oksidatif stresten korurlar.
- d) Karotenoidler super oksid radikalının reaktivitesini baskırlar. Bu özellik karotenoidlere özgüdür.
- e) E.coli bakterisinin fumaraz-c enzimi oksidatif hasara duyarlı molekülleri duyarsız olanla yer değiştirerek koruma sağlar.
- f) GSH (glutasyon), alfa-tokoferol, askorbat, ürat, albumin, ve plazminojenler gibi antioksidanlar serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek önemli biyolojik moleküllerin zararlı radikallerle etkileşmesini önlerler. Normal hücre yapısının bozulması metal iyonları salınmasına sebep olur ve oksidatif hasar hızlanır. Demir iyonlarının H_2O_2 den uzak tutmak koruma sağlar.(40)
- g) Süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz, katalaz enzim fonksiyonu olan endojen antioksidanlardır. Transferin, serüloplazmin, ferritin, myoglobin, hemoglobin, melatonin, glutasyon, sistein, bilirubin, ürat, albumin, karnozin ve laktoferrin enzim görevi olmayan endojen antioksidanlardır (41). Folik asit, alfa-tokoferol, beta-karoten, demir şelatörleri ve askorbik asit ise organizmaya dışarıdan alınan ekzojen antioksidanlara örnek oluşturur (42,43).

2.4. Karnozin

Karnozin ilk kez 1900 yılında Rus kimyager Gulewitch tarafından et içinde bulunan protein olmayan ve nitrojen içeren bir bileşik olarak tanımlanmıştır (44). Karnozin hayvanlarda kas ve beyin dokusunda özellikle olfaktör yapılarda bol miktarda bulunur.

Fazla et tüketiminde karnozinüri görülebilir. Moleküler formülü $C_9H_{14}N_4O_3$ 'dir ve moleküler ağırlığı 226,23 g/mol'dür (şekil 12). Erime noktası 253 C derecedir. Karnozinin sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir. 3,1 ml 25 C derece suda bir gram karnozin çözünebilir (45,46).



Şekil 12. Karnozinin moleküler formülü

Karnozin β -alanil ve L-histidin 'den oluşan doğal bir dipeptiddir. Karnozin, karnozin sentaz enzimiyle sentezlenir. L-histidin'in imidazol halkasının metillenmesiyle anserin oluşur. Ophidin ve balenin de diğer metillenmiş karnozin analoglarıdır. Karnozin kan, karaciğer ve böbrekte bulunan karnozinaz enzimiyle yıkılır (44,47).

Besinlerle alınan etin içindeki karnozin miktarı tüketilen hayvan türüne ve kas metabolizmasına göre değişir. Glikolitik kaslar daha fazla karnozin içerirler. En çok kuzu etinde bulunmakla birlikte dana ve domuz etinde de bolca bulunur. İskelet kası gibi uzun ömürlü dokularda bolca oluşan karnozinin birçok homeostatik görevi vardır. Memelilerde antioksidan, antiglikasyon etkili, serbest oksijen radikalleri temizleyicisi, pH tamponlayıcısı ve metal iyonu şelatörü molekül olarak bilinir (48). İçerdiği imidazol halkası sayesinde iyi bir pH tamponlayıcısıdır (49).

Karnozinin antioksidan mekanizması metal iyonlarında şelasyon etkisine, superoksit dismutaz enzimi benzeri aktivitesine, reaktif oksijen ürünleri ve serbest radikalleri atabilme yeteneğiyle ilişkilidir (50). Karnozin yaşlanma ve ilişkili patolojilerde görülen protein oksidasyonu, glikasyon ve ileri glikasyon son ürünleri oluşumunu baskılar. Glikasyon serbest radikallerden ayrı olarak ileri glikasyon son ürünleriyle hücrel yaşlanmaya sebep olur (46).

Proteinler, ketonlar ve aldehitler üzerinde antiglikasyon etkisi sayesinde çok toksik bir lipid oksidasyon ürünü olan malondialdehit oluşumunu azaltır (51). Aldehitlerin neden olduğu protein-protein ve protein-DNA çapraz bağlanmalarını önler. Mitokondriyal solunum ve oksijen tüketimini düzenleyerek kanserin enerji metabolizmasını, büyüme ve

progresyonunu etkiler. Bu fizyolojik özellikleriyle az yan etkiye sahip potansiyel bir anti-kanser ilacı olabilir (52). İskemiye bağlı vasküler tip demansta çinkonun tetiklediği nöron ölümünü önler. Proteinlerdeki çapraz bağlanmayı önleyici etkisiyle Alzheimer hastalığında beta amiloid oluşumunu inhibe eder. Kan beyin bariyerini kolayca geçebilir ve yan etkisi yoktur. Olfaktör kortekste glutamaterjik reseptörler üzerinde nörotrofik ve nöroprotektif etkileri vardır. Serebral iskemi çalışmalarında mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (53).

Karnozin iyi bir metal iyon şelatörüdür. Bakır, çinko, kobalt, demir iyonlarıyla birleşip kompleks oluşturabilir. Bu iyonlara bağlı reaksiyonları inhibe eder. Örneğin demir iyonlarıyla şelasyon yapması sonucunda lipid peroksidasyonu baskılanır.

Karnozin antioksidan aktivitesini metal iyon şelasyonu, ROS (reaktif oksijen türevleri) ve peroksil radikalleri temizlenmesi gibi farklı mekanizmalarla gerçekleştirebilir. Karnozin serbest radikalleri temizlemesinin yanısıra bunları üreten enzim sistemlerinin de aktivitelerinin düzenleyicisidir (54,55).

Karnozin fizyolojik konsantrasyonlarda superoksit anyonlarıyla süperoksit dismutaz enzimi gibi reaksiyona girebilir (56). İnterlökün 1 β ürettirerek apoptozisi azaltır. B ve T lenfosit aktivasyonu yapar. İnflamasyonu baskılayarak yara iyileşmesini hızlandırır.

Deneyisel mide ülseri çalışmalarında çinko ve karnozin birleşiminin gastrik mukozayı koruduğu gösterilmiştir (57,58).

1990'lerden beri çeşitli hayvan modellerinde yapılan in vivo çalışmalarda karnozinin testis, beyin ve böbrek gibi organlarda iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (59,60).

Karnozinin deneysel olarak köpeklere intravenöz enjeksiyonu sonrası sistemik kan basıncında geçici bir azalma saptanmıştır (61). Ratlarda yapılan çalışmalarda bunun karnozinin direk vazodilatör etkisine bağlı olabileceği gösterilmiştir (62).

3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. Araştırma Tipi:

Araştırmamız prospektif ve deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 07 Mart 2017 tarihinde 08/2017 Protokol no ile etik açıdan uygun

bulunmuştur. Haziran 2017’de malzeme tedarik edilmeye başlandı. Temmuz 2017’de Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı’nda ilaç uygulama ve sakrifikasyon yapıldıktan sonra, alınan testis dokularından sol testis biyokimyasal analizler için Fizyoloji Anabilim Dalı’na, sağ testis ise histolojik analizler için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalına getirilerek gerekli çalışmalar yapıldı.

3.3. Araştırma Evreni ve Çalışma Grupları:

Araştırmada altı deney grubu olmak üzere toplamda 40 deney hayvanı (sıçan) kullanıldı ve deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi.

I.Grup, Kontrol grubu: Hiçbir madde uygulanmayan, bazal değerler için kullanılan gruptur. Deney başlatıldıktan 48 saat sonra tüm denekler sakrifiye edildi ve testis doku örnekleri alındı.

II.Grup, Siklofosfamid (CP) grubu: Deneklere deney başlangıç günü tek doz i.p. yolla 150 mg/kg siklofosfamid verildi. 48 saat sonra tüm denekler sakrifiye edildi.

III.Grup, Karnozin (K) grubu: Deneklere deney başlangıç günü tek doz i.p. yolla 250 mg/kg karnozin verildi. 48 saat sonra tüm denekler sakrifiye edildi.

IV.Grup, Karnozin + Siklofosfamid (K+CP) grubu: Deneklere deney başlangıcının birinci günü önce tek doz 250 mg/kg karnozin, bir saat sonra 150 mg/kg siklofosfamid i.p. yolla verildi. 48 saat sonra tüm denekler sakrifiye edildi.

V.Grup, Karnozin = Siklofosfamid (K=CP) grubu: Deneklere deney başlangıcının birinci günü önce tek doz 250 mg/kg karnozin ve 150 mg/kg siklofosfamid birlikte i.p. yolla verildi. 48 saat sonra tüm denekler sakrifiye edildi.

VI.Grup, Siklofosfamid + Karnozin (K=CP) grubu: Deneklere deney başlangıcının birinci günü önce tek doz 150 mg/kg siklofosfamid 1 saat sonra 250 mg/kg karnozin i.p. yolla verildi. 48 saat sonra tüm denekler sakrifiye edildi.

Karnozin uygulaması:

Karnozin (Sigma, St. Louis, MO, USA) öncelikle SF (serum fizyolojik) içinde çözündürülerek elde edildi. Karnozin i.p. yolla 250mg/kg dozda verildi (63).

Siklofosfamid uygulaması:

Siklofosfamid (Sigma, St. Louis, MO, USA) öncelikle SF içinde çözündürülerek elde edildi. i.p. yolla 150mg/kg dozda verildi (64).

Deneklerin Yaşamı Sonlandırma Zamanı ve Yöntemi:

Denekler dahil oldukları gruplara göre ketamin-ksilazin anestezisi altında 48 saat sonunda sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sırasında deneklerin testis dokuları çıkarıldı.

Alınan dokulardan; sağ testis histolojik incelemelere, sol testis ise biyokimyasal incelemelere tabi tutulmuştur. Histolojik incelemeler için alınan sağ testisler formaldehit ve bouin solüsyonu içine koyuldu. Biyokimyasal incelemeler için alınan sol testis ise deney tüpü ile kuru buz içerisine koyulmuştur.

Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda (sacrifikasyon öncesi) deneklerin ağırlıkları ölçüldü.

3.4. Çalışma Materyali:

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen, Wistar Albino suşu toplam 40 adet 12 haftalık (200-250 gr) yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel analiz için, kontrol grubunda beş diğer her grupta yedi denek olacak şekilde planlandı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık / aydınlık periyodunda, 20–22°C oda sıcaklığında %50-60 nisbi nem bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi (ad libitum). Deneyde kullanılan hayvanların 12 haftalık olarak seçilme sebebi, insanda 18-30 yaş aralığına denk gelmesinden dolayıdır.

3.5. Veri Toplama Araçları:

3.5.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerin ve testislerinin ağırlıklarını ölçmek için terazi, deneklerden elde edilen dokuların doku takibinde etüv, incelenmesinde kesit almak için mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için nemli ortam kabı ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör, spektrofotometre ve buzluk kullanıldı.

3.5.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulandı. İnce kesitleri alındı, histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamaları yapıldı. Araştırmada histokimyasal inceleme için Hematoksilen-Eozin, PAS ve Masson Trikrom histokimya boyamaları, immünohistokimya olarak Aktif Kaspaz-3 ve Anti-kludin5 antikoru boyamaları yapıldı. Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom, Aktif Kaspaz-3 ve Anti-kludin5 boyamaları için 40x büyütmede, PAS boyaması için ise 100x' lik büyütmede inceleme yapılarak Image J (1,50) programı ile değerlendirme yapıldı.

Biyokimyasal incelemeler için GSH (Glutasyon), MDA kitleri kullanıldı.

3.5.3. Histokimyasal İncelemeler

Deneklerden alınan sağ testis doku örnekleri mikroskobik incelemeler için Bouin solüsyonunda fikse edildi. Testis dokuları bütün olarak 24 saat boyunca fiksatif içinde bırakıldı. Bouin solüsyonu içinde fikse edilen dokular, %70'lik alkol içinde sarı renk tamamen çıkana kadar yıkandı. Dereceleri giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonları yapıp, dört değişim aseton ve iki değişim ksilen serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflandırılan dokular parafine emdirme işleminden sonra parafin bloklara gömülme işlemi yapıldı (

Tablo 1). Elde edilen parafin bloklardan mikrotomla polilizin kaplı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin, PAS ve Masson-Trikrom boyama protokolleri uygulanarak ışık mikroskobu altında değerlendirme işlemleri yapıldı. Hematoksilen-Eozin boyaması ile seminifer tübül çapı ölçüldü. Germ hücre ve germ hücre tabakası, interstisyel alandaki Leydig hücreleri ve genel testis morfolojisi incelendi. Masson Trikrom boyaması ile bağ dokusu yapısı incelendi. PAS boyaması ile bazal membran kalınlığı ölçüldü. Anti-claudin-5 ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapıldı. Değerlendirmeler için Image J (1.50) programı kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarında bulunan Olympus BX 51 Mikroskobu ile histolojik preparatların fotoğrafları çekildi. Çalışma sırasında testis dokusu değerlendirilirken seminifer tübüllerin çapları, tübül epitel kalınlığı ölçülüp, interstisyel Leydig hücrelerinin dejenerasyonu değerlendirildi. Elde edilen veriler, Johnsen skorlama yöntemi kullanılarak ortalama değerleri bulundu ve gruplar arasındaki farklılıklar karşılaştırıldı (Johnsen, 1970).

Tablo 1. Doku takip protokolü

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	Bouin solüsyonu	12-24 Saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	%70'lik Alkol	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	1 Saat
	%70'lik Alkol	1 Saat
	%70'lik Alkol	1 Saat
	%80'lik Alkol	1 Saat
	%96'lık Alkol	1 Saat
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	1'er Saat
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2	1'er Saat
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.5.3.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Johnsen skorlaması için her grupta rastgele on adet tübül değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler için One Way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi (Tablo 2) (65).

Tablo 2. Johnsen Testiküler Skorlama Yöntemi

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

3.5.3.2. Hematoksilen-Eozin Boya Yöntemi

Alınan parafin kesitler iki gün 37°C de etüvde bekletildi. Kesitler iki saat 60°C de etüvde bekletildi. İlk 20 dakikası 60°C de etüvde, diğer iki değişim oda sıcaklığında yirmişer dakika olarak üç kez ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Distile suda yıkandıktan sonra on dakika Hematoksilen boya solüsyonu içerisinde bekletilip, akan suda on dakika yıkama işlemi sonrası suyu süzülüp iki dakika boyunca eozin boya solüsyonu içerisinde bekletildi. Birer dakika süreyle sırayla %70, %80, %96' ya kadar artan etil alkol serilerinden geçirildi ve üç kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan ile kapatıldı. (Tablo 3).

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Dehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.5.3.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra 20'er dakikalık üç farklı ksilen serilerinden geçirildiler. Ardından kesitler azalan alkol serilerinden geçirilerek (absolü alkol, %96, %80 ve %70'lik alkol) ve distile suya getirildiler. Kesitler distile sudan çıkarıldıktan sonra Masson Trikrom boyama kitiyle (Bio-optica, 04-010802) boyama işlemleri gerçekleştirildi. Dokular boyama kiti içindeki weigert's hematoksisilen- solüsyon A (Reaktif A) ve solüsyon B (Reaktif B) içinde on dk bekletildi. Daha sonra yıkanma işlemi yapılmadan pikrik asit alkolde (Reaktif C) dört dk bekletildi. Distile suyunda çalkalandı. Ardından ponceau-asit fuksin solüsyonunda (Reaktif D) dört dakika boyandı. Distile suda yıkandı. Preparat on dakika fosfomolibdik asitte (Reaktif E) tutuldu. Ardından masson anilin mavisi solüsyonunu (Reaktif F) dökülerek beş dakika bekletildi. Distile suda yıkandı. Daha sonra absol alkolü takip eden %95'lik alkolde

dehidrate edildi ve yıkandı. Ksilol ile şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapama işlemi yapıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Masson Trikrom boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif A+ Reaktif B solüsyonu	10 dakika
Boyama	Reaktif C	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif D	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif E	10 dakika
Boyama	Reaktif F	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.5.3.4. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemi

Bazal membran kalınlığındaki değişiklikleri incelemek için PAS boyaması yapıldı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için bir saat 60°C de etüvde bekletildi. Ardından bir saati 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda sıcaklığında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %70'e kadar azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra PAS boyama kiti (Bio-optica, 04-130802 Milano, İtalya) içerisinde periyodik asit solüsyonu (Reaktif A) içerisinde on dakika bekletildi. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için üç dakika distile suda bekletilen kesitler suyu süzülüp 20 dakika Schiff boya solüsyonu (Reaktif B) içerisinde bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkanan kesitlerin üstüne potasyum metabisülfite solüsyonunu (Reaktif C) konularak iki dk bekletildi. Kesitlere yıkama işlemi yapılmadan fiksatif solüsyonu (Reaktif D) konularak iki dk bekletildi. Boyama işleminin ardından kesitler distile suda iyice yıkandıktan sonra Mayers hematoksilen solüsyonu (Reaktif E) içinde üç dk

bekletildi. Boyamadan sonra beş dakika akarsuda yıkanan kesitler daha sonra %96'lık alkolle çalkalanıp üç kez 20'şer dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Dehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 dakika
Boyama	Reagent D	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'luk alkol serileni	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.5.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Anti-klaudin5 boyaması ve aktif kaspaz-3 immün işaretlemesi ile sitoplazma koyu kahverengi boyandı.

3.5.4.1. Anti-klaudin5 Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal inceleme için deparafinizasyon sonrası kesitler on dk. on Mm sitrat buffer ile mikrodalgada ısıtıldı. Dakopen ile çevreleri sınırlandırıldı ve daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla beş dk. %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. üç defa beşer dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan Anti-klaudin5 1:100 (SAB4200538,sigma) antikoruna +4°C de enkübe edildi. Ardından önce 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor daha sonra da 30 dakika enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) uygulandı.

Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapama işlemi yapıldı.

3.5.4.2. Aktif Kaspaz-3 Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal inceleme için deparafinizasyon sonrası kesitler on dk. on Mm sitrat buffer ile mikrodalgada ısıtıldı. Dakopen ile çevreleri sınırlandırıldı ve daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla beş dakika boyunca %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. Üç defa beşer dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan aktif anti-kaspaz-3 1:100 (AB3623, Millipore) antikoru ile sıfırın üstünde dört derecede inkübe edildi. Ardından önce 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor daha sonra da 30 dakika enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapama işlemi yapıldı.

3.5.5. Biyokimyasal İncelemeler

Homojenizasyon

Tüm sıçanların hafif eter anestezisi altında testis dokuları disseke edildi. Her sıçanın sağ testis dokusu serum fizyolojik ile yıkandı ve ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) 0.15 M KCl içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı. Homojenatlar 10 000 rpm, sıfırın üstünde dört derecede 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar ölçümler gerçekleştirilene kadar -80°C'de saklandı. Doku hasarını göstermek için Malondialdehit (MDA) seviyeleri, antioksidan durumu değerlendirmek için Glutasyon (GSH) seviyeleri ticari kitlerle kit prosedürlerine göre ölçüldü.

MDA ve GSH düzeylerinin saptanması

MDA ve GSH seviyeleri Oxis Research kitleri kullanılarak spektrofotometre (T80, PG instruments, UK) ile ölçüldü. Ölçümler hazırlanan süpernatantlarda gerçekleştirildi.

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

GSH seviyeleri Bioxytech GSH-420 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. Kitin alışma yöntemi chromophoric thione oluşumu temeline dayanır. Tamponla karıştırılan süpernatana indirgeyici ajan eklenerek oksidize glutatyon indirgenmiş forma dönüştürülür. Daha sonra kromojen eklenip pH arttırılarak chromophoric thione oluşturulur. 420 nm'de absorbans ölçülerek GSH konsantrasyonu belirlendi.

Doku protein lmleri BCA protein kitiyle yapıldı. Kitin alışma prensibi total proteinin kolorimetrik tayininde BCA (bisinkoninik asit) kullanılmasına dayanmaktadır. İki molekül BCA bir bakır iyonu ile şelatlanarak morumsu renkte reaksiyon oluşurmaktadır. Spektrofotometrede 620 nm'de absorbans okunarak standart eğrisinden protein konsantrasyonu belirlendi.

İstatistik değerlendirme

Tüm veriler ortalama±SH olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar SPSS programında one-way ANOVA post hoc LSD testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

3.6 Araştırma Planı ve Takvimi

Tez Konusunun Belirlenmesi ve Literatür Araştırması

Mayıs 2016 – Aralık 2016



Etik Kurul İzni Alınması

7 Mart 2017



Tez Yazım ve Uygulamalar için Literatür Tarama ve Araştırma Yapılması

Nisan 2017 – Haziran 2017



DeneySEL Materyalin Toplanması

Temmuz 2017 – Ağustos 2017



Laboratuvar Çalışmaları
Eylül 2017 – Ocak 2018



Tez Yazımı
Şubat 2018 – Mayıs 2018

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm veriler SPSS 23,0 istatistik programına yüklendi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Gruplar arasındaki farklar Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı (66).

Biyokimyasal değerlendirme de ise tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar SPSS programında one-way ANOVA post hoc LSD testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Deneklere siklofosfamid verilerek testiküler hasar oluşturuldu. Sınırlılığımız fonksiyonel olarak fertilitenin değerlendirilememesidir. Deney öncesi ve sonrasında spermium sayısı, morfolojisi hareketliliği, canlılığına bakabilmek verilerimizi güçlendirirdi.

3.9. Etik Kurul Onayı

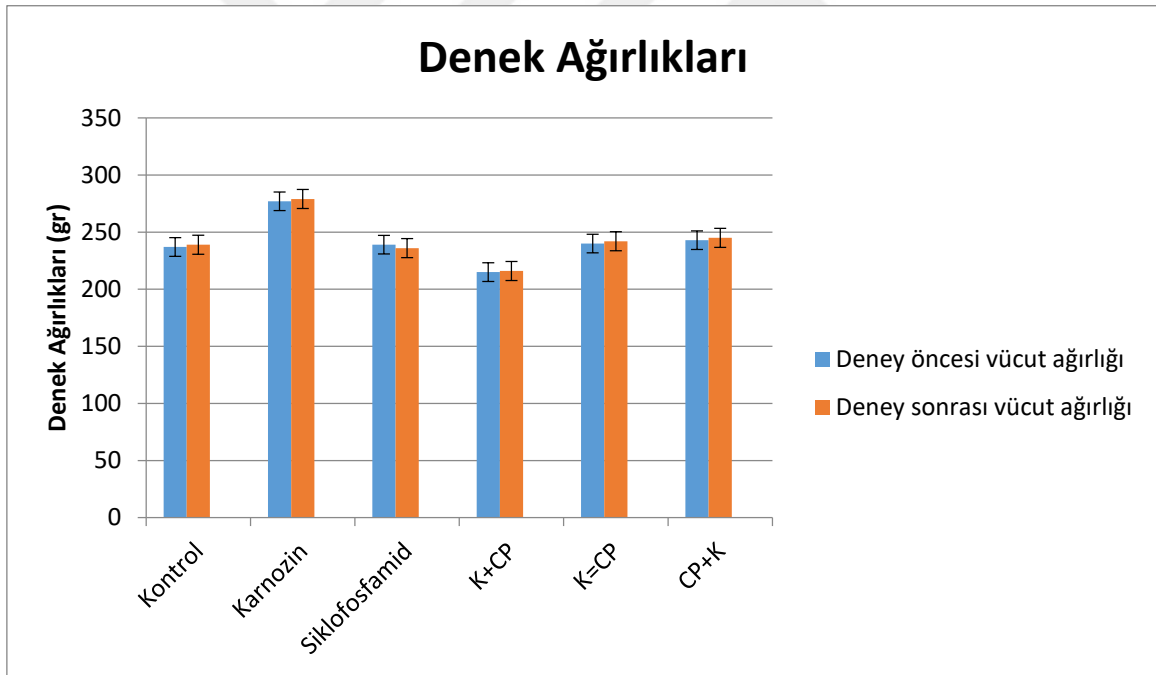
Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 07 Mart 2017 tarihinde gerçekleştirilen toplantıda, 08/2017 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur(EK-1).

4. BULGULAR

4.7. Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Çalışma başlarken ve biterken sıçanların vücut ağırlık değerleri belirlendi. Deneklerin çalışma başlarkenki vücut ağırlıklarının ortalama değerleri; kontrol grubunda $237,81 \pm 2,82$ gr, siklofosamid grubunda $239,43 \pm 6,58$ gr, karnozin grubunda $277,43 \pm 8,07$ gr, CP+K grubunda $215,11 \pm 5,31$ gr, CP=K grubunda $243,71 \pm 3,76$ gr, K+CP grubunda $240,29 \pm 2,88$ gr olarak saptandı. Deneklerin çalışma sonundaki vücut ağırlıklarının ortalama değerleri; kontrol grubunda $239,61 \pm 2,96$ gr, siklofosamid grubunda $236,71 \pm 6,48$ gr, karnozin grubunda $279,43 \pm 8,25$ gr, CP+K grubunda $216,71 \pm 5,27$ gr, CP=K grubunda $245,57 \pm 3,56$ gr, K+CP grubunda $242,14 \pm 2,87$ olarak saptandı (Şekil 13).

Deney öncesi ve sonrasındaki vücut ağırlık farkları açısından değerlendirildiğinde; siklofosamid grubu hariç tüm gruplarda anlamlı artış olurken siklofosamid grubunda anlamlı azalma olmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 13. Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi.

Tablo 6. Vücut ağırlıklarının deney öncesi ve sonrasındaki farkın istatistiksel olarak değerlendirilmesi. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve tabloda koyu yazıldı.

Grup	P değeri
kontrol	0,027
K	0,017
CP	0,016
K+CP	0,016
K=CP	0,016
CP+K	0,016

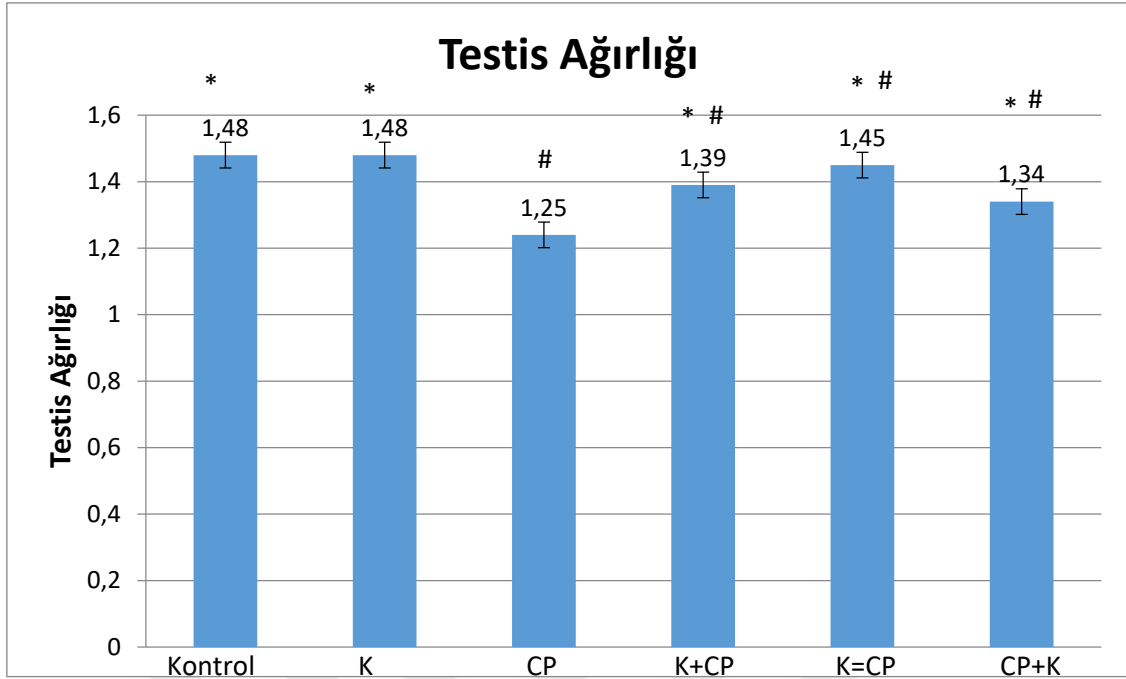
4.8. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Çalışma sonunda deneklerin testis ağırlıkları ölçüldü. Deneklerin testis ağırlıklarının ortalama değerleri; kontrol grubunda $1,49 \pm 0,01$ gr, karnozin grubunda $1,48 \pm 0,03$ gr, siklofosfamid grubunda $1,25 \pm 0,03$ gr, K+CP grubunda $1,39 \pm 0,02$ gr, K=CP grubunda $1,45 \pm 0,01$ gr, CP+K grubunda $1,34 \pm 0,02$ gr olarak saptandı (Tablo 7).

Testis ağırlıkları değerlendirildiğinde kontrol grubuyla; siklofosfamid ve siklofosfamidin karnozinle kombine olarak verildiği diğer üç grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve karnozin gruplarındaki deneklerin testis ağırlıkları ortalamaları, diğer tüm gruplardakinden yüksek ölçülmüştür. Ayrıca CP+K, CP=K ve K+CP gruplarında testis ağırlıkları siklofosfamid grubuna göre ağır bulunmuştur. CP+K ile K+CP grupları arasında fark izlenmezken, CP=K grubunda anlamlı artmış testis ağırlık değerleri saptanmıştır (Şekil 14).

Tablo 7. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması.

GRUPLAR	Testis ağırlıkları (g)
Kontrol	$1,49 \pm 0,01$
Karnozin	$1,48 \pm 0,03$
Siklofosfamid	$1,25 \pm 0,03$
K+CP	$1,39 \pm 0,02$
K=CP	$1,45 \pm 0,01$
CP+K	$1,34 \pm 0,02$



Şekil 14. Testis ağırlıklarının karşılaştırılması.

- *CP grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p < 0,05$), # Kontrol grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p < 0,05$)

Tablo 8. Testis ağırlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi ($p < 0,05$).

Gruplar	P Değeri
CP – CP+K	0,004
CP-CP=K	0,001
CP-K+CP	0,001
CP-K	0,001
CP- Kontrol	0,001
CP+K- CP=K	0,001
CP+K - K+CP	0,073
CP+K –K	0,001
CP+K - Kontrol	0,001
CP=K - K+CP	0,038
CP=K –K	0,710
CP=K – Kontrol	0,035
K+CP –K	0,011
K+CP – Kontrol	0,002
K-Kontrol	0,366

4.9. Histolojik Bulgular

4.9.1. Hematoksilen- Eozin (H-E) Boyama

Hematoksilen-eozin boyamasıyla; testis kapsülü (tunica albuginea), seminifer tübüller arasındaki bağ dokusu (intersitisyel alan), bazal membran yapısı, seminifer tübül çapları, spermatogenik seriye ait hücreler ve spermatogenezis (Johnsen skorlamasına göre) değerlendirildi. Değerlendirmeler Olympus BX51 mikroskobu ve Olympus DP71 kamerasıyla yapıldı.

A-Kontrol Grubu: H-E ile boyanan kontrol grubu testis dokuları incelendi. En dışta kapsül (tunica albuginea) yapısından itibaren, seminifer tübüller ve aralarındaki bağ dokusunun yapısının korunduğu izlendi. Bazal membranın seminifer tübül epitelini belirgin bir şekilde sardığı ve hiçbir şekilde tübülden ayrılma durumunun (membran ondülasyonu) olmadığı görüldü. Seminifer tübül epiteline bakıldığında dejenerasyon izlenmedi. Spermatogonyumdan itibaren bütün spermatogenik serinin düzgün bir şekilde dizildiği izlendi. Olgun spermiumların seminifer tübül lümeninde görülmesiyle de normal bir spermatogenezisin gerçekleştiği belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. Kontrol grubu olan testis histolojik görüntüsü (20x) (H-E). Normal testis morfolojisi görülmektedir. **Yıldız** düzgün sıralanmış seminifer epitel. **Beyaz ok** tübül lümeninde spermium.

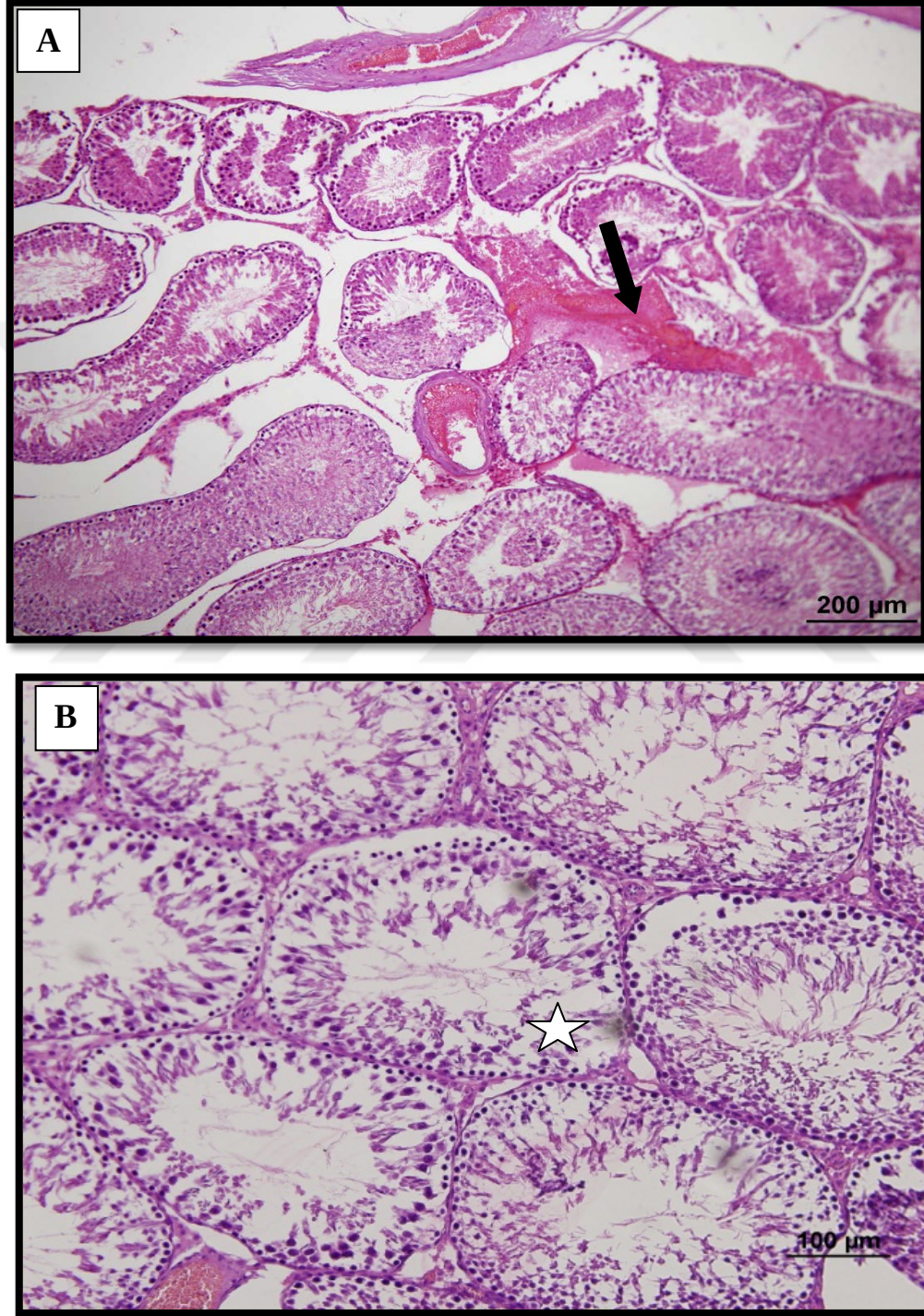
B-Karnozin Grubu (K): Değerlendirme sonucunda kontrol grubuna benzer bulgular izlendi. Testisi çevreleyen tunika albuginea kontrol grubunda olduğu gibi normal bir şekilde izlendi. Seminifer tübüller arasındaki intersitisyel alanda kan hücreleri ya da damar duvarlarında dejenerasyon izlenmedi. Germinal epiteldeki spermatogenik hücrelerin normal yerleşim yerlerinde olduğu görüldü. Olgun spermiumlar seminifer tübül lümeninde izlenerek spermatogenezin eksiksiz olarak gerçekleştirdiği belirlendi. Seminifer tübülü saran bazal membranda hasar, kalınlaşma ya da ondülasyon izlenmedi (Şekil 16).



Şekil 16 Karnozin grubuna ait olan testis histolojik görüntüleri (20x) (H-E). Kontrol grubuna yakın morfolojik görüntü sergilemektedir. . **Yıldız** seminifer epitelyum. **Beyaz ok** tübül lümeninde spermiyum.

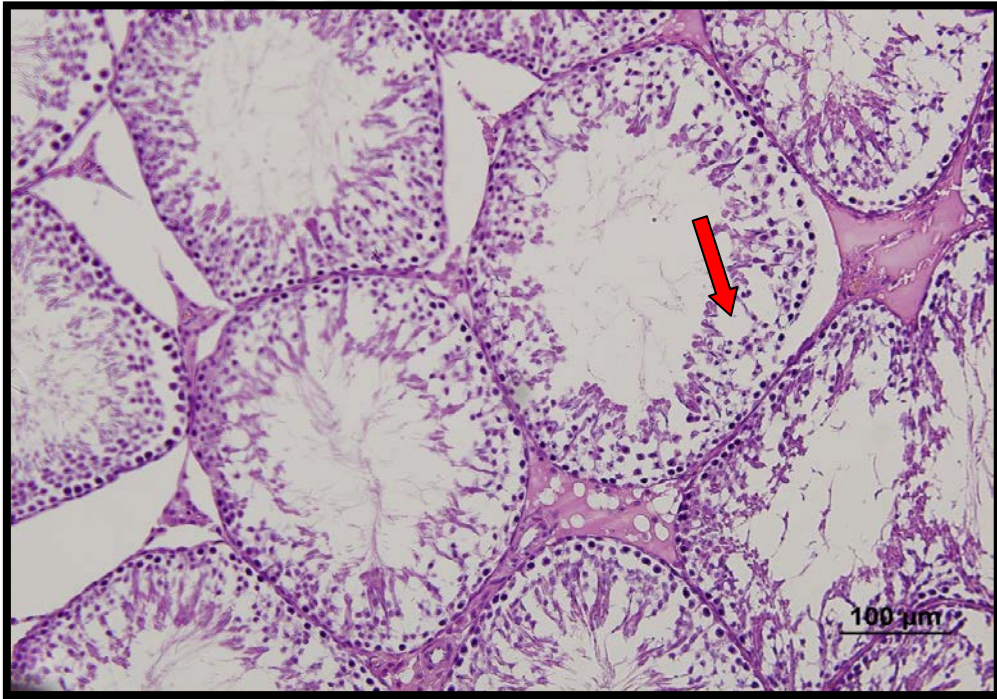
C-Siklofosfamid Grubu (CP): H-E boyamasıyla yapılan değerlendirme sonucunda kontrol ve karnozin grubuna göre belirgin germinal epitel hasarı olduğu görüldü. Testisi çevreleyen kapsül (tunika albuginea) hasarsız olarak görüldü ancak seminifer tübüller arasındaki bağ dokuda (intersitisyel alan) kan hücreleri izlendi ve damarlarda dejenerasyon belirlendi. Seminifer tübülün germinal epitelinin bazal membrandan ayrıldığı (bazal membran ondülasyonu) görüldü. Birçok seminifer tübülde hasarlanma ve dejenerasyon izlendi. Seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait hücrelerin parçalı gruplar halinde olduğu bazı tübüllerde ise yok denecek kadar az spermatogenik hücre olduğu gözlemlendi.

Germinal epitelde spermatogenik hücreler çevresinde vakuolizasyon belirlendi. Lümeninde olgun spermium bulunduran seminifer tübül sayısı oldukça azdı. Testis dokusunda tübüllerin sıklığı yetersizdi ya da bir başka deyişle aralarındaki mesafenin belirgin olarak fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Siklofosfamid grubuna ait olan testis histolojik görüntüleri (H-E) **A) Siyah ok** Seminifer tübüller arası intersitisyel alanda görülen kanamalar(10x) **B) Yıldız** Seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve anormal tübüler yapı (20x)

D-Önce Siklofosfamid Sonra Karnozin Verilen Grup (CP+K): Hematoksilen-eozinle boyanan testis dokuları incelendiğinde testisi çevreleyen kapsül yapısı kontrol grubuna benzerdi. Bazı seminifer tübüllerin arasındaki intersitisyel alanda kan hücreleri görülmekle birlikte tübüllerin çoğunda intersitisyel alanda damar endotel dejenerasyonu ve kan hücreleri bulunmamaktaydı. Birçok seminifer tübülde spermatogenik seriye ait hücrelerin hasarsız olduğu görüldü. Tübül lümeninde olgun spermiumların bulunmasıyla spermatogenezisin gerçekleştiği belirlendi. Germinal epitel kuşatan bazal membranda hasar ve ondülasyon izlenmedi. Az sayıda seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve epitel arasında vakuolizasyon izlendi (Şekil 18).



Şekil 18. Önce siklofosfamid sonra karnozin verilen gruba ait olan testis histolojik görüntüsü (20x) (H-E) **kırmızı ok** germinal epitel hücreleri arasında vakuolizasyon

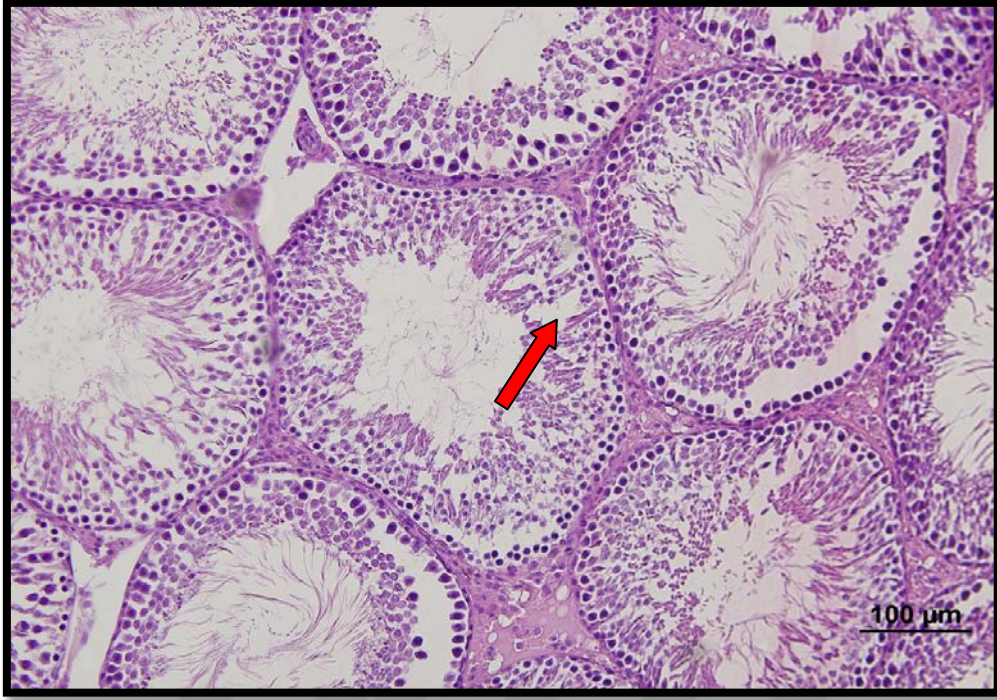
E-Siklofosfamid ve Karnozin Birlikte Verilen Grup (CP=K): Hematoksilen-eozinle boyanan testis dokuları incelendiğinde bazı seminifer tübüllerde germinal epitelde vakuolizasyon olduğu görüldü. Germinal epitelin bazı tübüllerde dejenere olduğu ve

lümene döküldüğü saptandı. Bu bulguların dışında genelde tübüllerin çoğu kontrol grubuna benzer şekilde normal morfolojideydi.(Şekil 19).



Şekil 19. Siklofosfamid ve karnozin birlikte verilen gruba ait olan testis histolojik görüntüsü (20x) (H-E) **kırmızı ok** germinal epitel hücreleri arasında vakuolizasyon.

F-Önce Karnozin Sonra Siklofosfamid Verilen Grup (K+CP): H-E boyanan preperatlarda intersitisyel alanda yer yer kanamalar olduğu ve bazı tübüller germinal epitelin bazal membrandan ayrıldığı görüldü. Nadir olarak da germinal epitelde görülen vakuolizasyon dışında geri kalan birçok tübülün normale yakın morfolojide olduğu görüldü (Şekil 20).

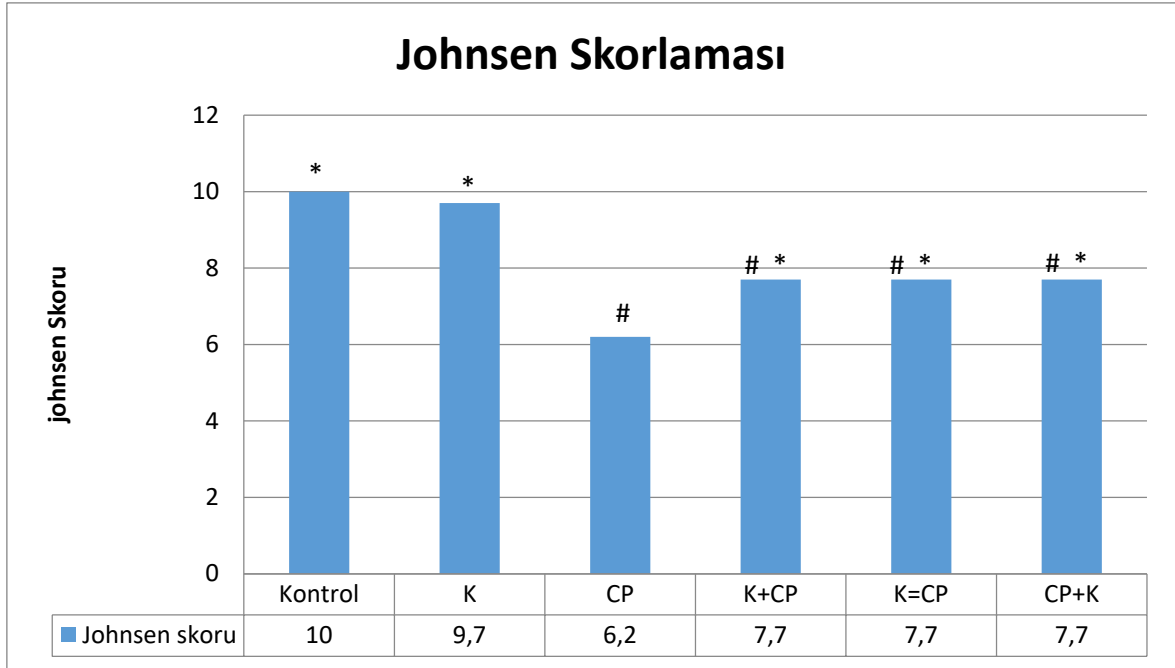


Şekil 20. Önce karnozin sonra siklofosfamid verilen gruba ait olan testis histolojik görüntüsü. (20x) (H-E) **kırmızı ok** germinal epitel hücreleri arasında vakuolizasyon.

4.9.1.1. *Johnsen Skorlaması*

Johnsen skorlamasında hematoksiyen-eozin boyalı preparatlar üzerinden seminifer tübüllerin histolojik özellikleri değerlendirilmek suretiyle tüm deney gruplarına puanlar verildi. One Way ANOVA istatistik testi kullanılarak skorlar değerlendirildi. Siklofosfamidle hasar sonrası tedavi amaçlı, öncesinde profilaktik olarak ve siklofosfamidle eş zamanlı olarak karnozin verilen gruplarda; sadece siklofosfamidle hasar oluşturulan gruba göre anlamlı şekilde yüksek skorların verildiği görüldü.

Kontrol ve sadece karnozin verilen grup arasında anlamlı fark görülmezken bu iki grup diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek skorlar almıştır. Siklofosfamidin karnozinle birlikte verildiği üç grubun birbiri arasında fark görülmezken; kontrol ve karnozin gruplarından anlamlı düşük skorlar aldıkları saptandı (Şekil 21). ($p < 0,05$ anlamlılık düzeyi)



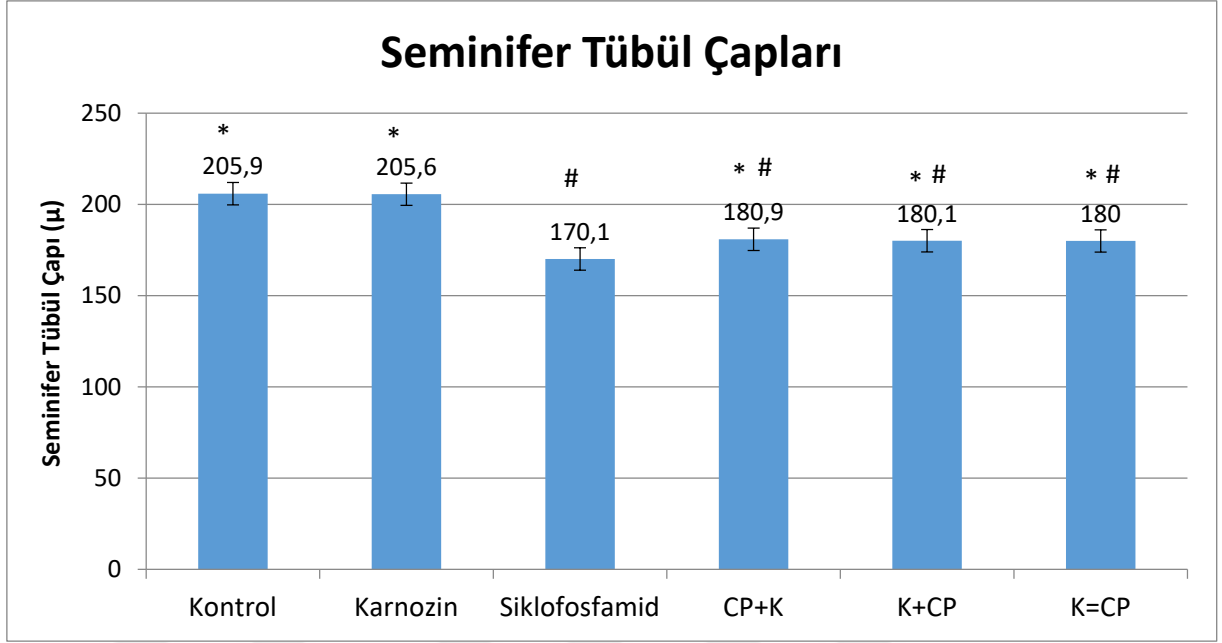
Şekil 191. Seminifer tübüllerin Johnsen skorlamasına göre karşılaştırılması

- *CP grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p<0,05$)
- # Kontrol grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p<0,05$)

4.9.1.2. *Seminifer Tübül Çaplarının Değerlendirilmesi*

Çalışmamızdaki bütün deneklerin tübül çapları hematoksilin-eozin ile boyanan kesitlerden her grup için rastgele seçilen 100 tübülde 20x'lik büyütmeyle görüntülendi. Ölçümler için image j programı kullanıldı. Çalışma gruplarının seminifer tübül çapları ortalama değerleri; kontrol grubunda $205,90 \pm 2,57 \mu\text{m}$, karnozin grubunda $205,60 \pm 2,37 \mu\text{m}$, siklofosfamid grubunda $170,17 \pm 3,39 \mu\text{m}$, CP+K grubunda $181,02 \pm 2,13 \mu\text{m}$, CP=K grubunda $180,01 \pm 1,45 \mu\text{m}$, K+CP grubunda $180,11 \pm 1,68 \mu\text{m}$ olarak saptandı (Şekil 22).

Tabloda seminifer tübül çaplarının gruplara göre ortalama değerleri sütünlara yazılmıştır. Kontrol ve karnozin gruplarının seminifer tübül çapları diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 9). Karnozin ve siklofosfamidin birlikte kullanıldığı grupların kendi aralarında fark saptanmazken, siklofosfamid grubu ile tübül çapları açısından anlamlı yüksek değerler saptanmıştır. ($p<0,05$ anlamlılık düzeyi)



Şekil 202. Seminifer tübül çaplarının karşılaştırılması

- *CP grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p < 0,05$)
- # Kontrol grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p < 0,05$)

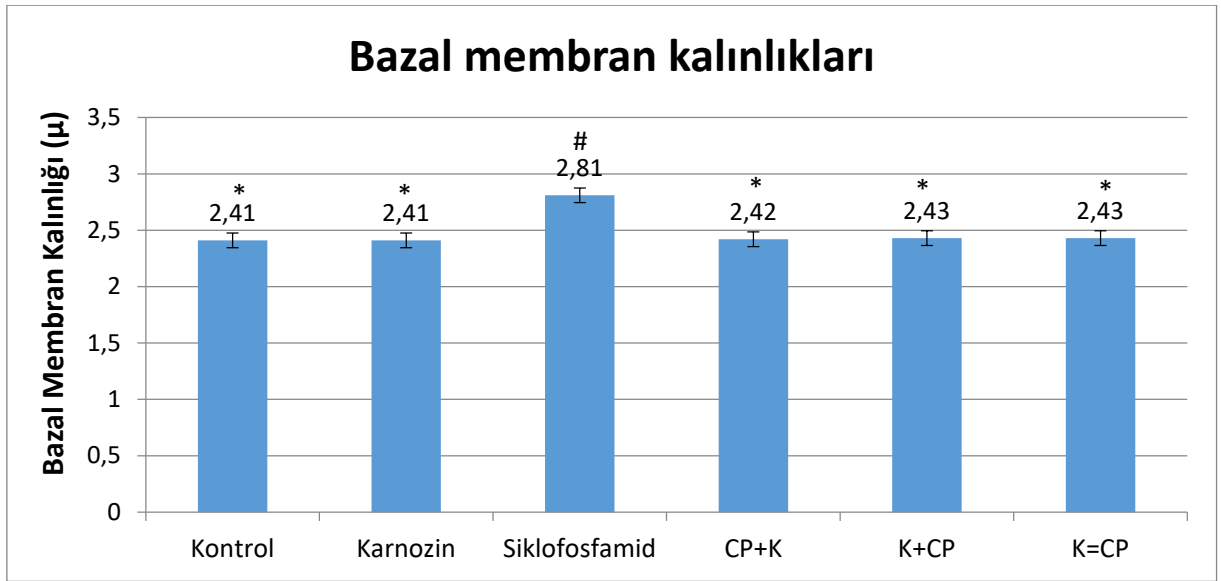
Tablo 9. Seminifer tübül çaplarının istatistiksel değerlendirilmesi. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve tabloda koyu yazıldı.

Gruplar	P Değeri
CP – CP+K	0,007
CP-CP=K	0,006
CP-K+CP	0,006
CP-K	0,001
CP- Kontrol	0,001
CP+K- CP=K	0,923
CP+K - K+CP	0,448
CP+K –K	0,001
CP+K - Kontrol	0,001
CP=K - K+CP	0,568
CP=K –K	0,001
CP=K – Kontrol	0,001
K+CP –K	0,001
K+CP – Kontrol	0,001
K-Kontrol	0,962

4.9.2. PAS Boyaması Değerlendirilmesi

4.9.2.1. Bazal Membran Kalınlıklarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızdaki bütün deneklerin seminifer tübül bazal membran kalınlıkları PAS ile boyanan kesitlerden her grup için rastgele seçilen 100 tübülde 100x'lik büyütmeyle görüntülendi. Ölçümler için image j programı kullanıldı. Çalışma gruplarında seminifer tübül bazal membran kalınlıklarının ortalama değerleri; kontrol grubunda $2,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$, karnozin grubunda $2,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$, siklofosfamid grubunda $2,81 \pm 0,01 \mu\text{m}$, CP+K grubunda $2,42 \pm 0,01 \mu\text{m}$, CP=K $2,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$, K+CP grubunda $2,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$ olarak saptandı (Şekil 23).



Şekil 23. Seminifer tübül bazal membran kalınlıklarının karşılaştırılması

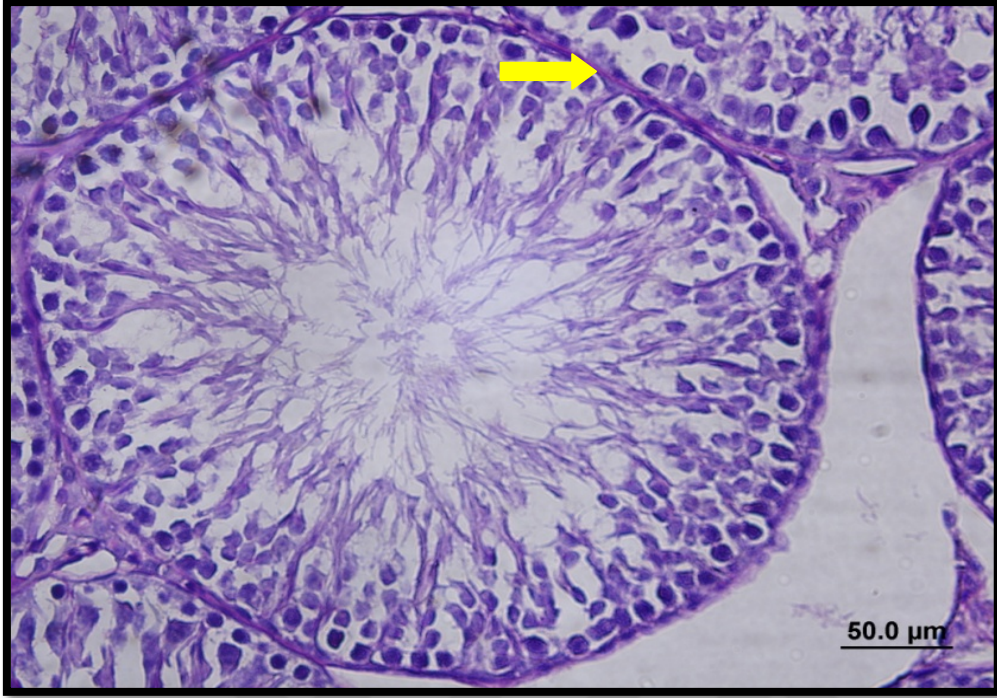
- *CP grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p < 0,05$)
- # Kontrol grubuna göre anlamlı farkı olanlar ($p < 0,05$)

Siklofosfamid ile oluşturulan hasar grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı şekilde artmış bazal membran kalınlığı belirlendi. Siklofosfamid ve karnozinin birlikte verildiği gruplar arasında bazal membran kalınlığı açısından anlamlı fark saptanmadı. Bu grupların değerleri siklofosfamid hasar grubundan anlamlı şekilde düşük saptanırken; kontrol ve karnozin gruplarında anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 10). ($p < 0,05$ anlamlılık düzeyi)

Tablo 10. Bazal membran kalınlıklarının istatistiksel değeriendirilmesi. $p<0,05$ olan değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve tabloda koyu yazıldı.

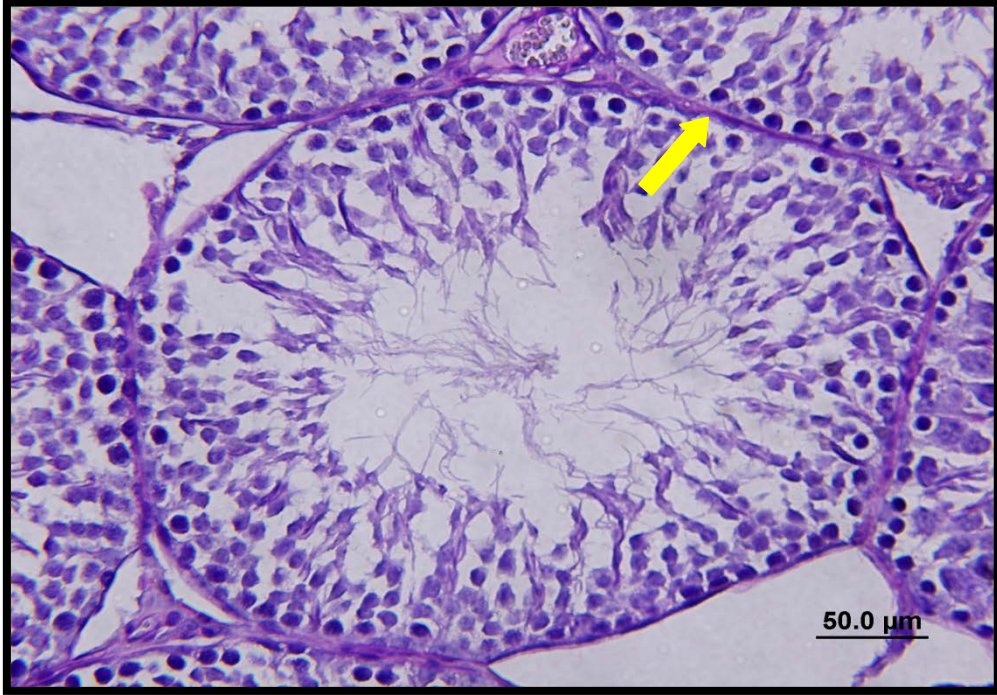
Gruplar	P Değeri
CP - CP+K	0,001
CP - CP=K	0,001
CP - K+CP	0,001
CP - K	0,001
CP - Kontrol	0,001
CP+K - CP=K	0,535
CP+K - K+CP	0,805
CP+K - K	0,383
CP+K - Kontrol	0,366
CP=K - K+CP	0,805
CP=K - K	0,165
CP=K - Kontrol	0,073
K+CP - K	0,165
K+CP - Kontrol	0,295
K - Kontrol	0,731

Kontrol grubu; histolojik kesitler değeriendirildiğinde testis seminifer tübül bazal membran kalınlığının normal olduğu görüldü (Şekil 24).



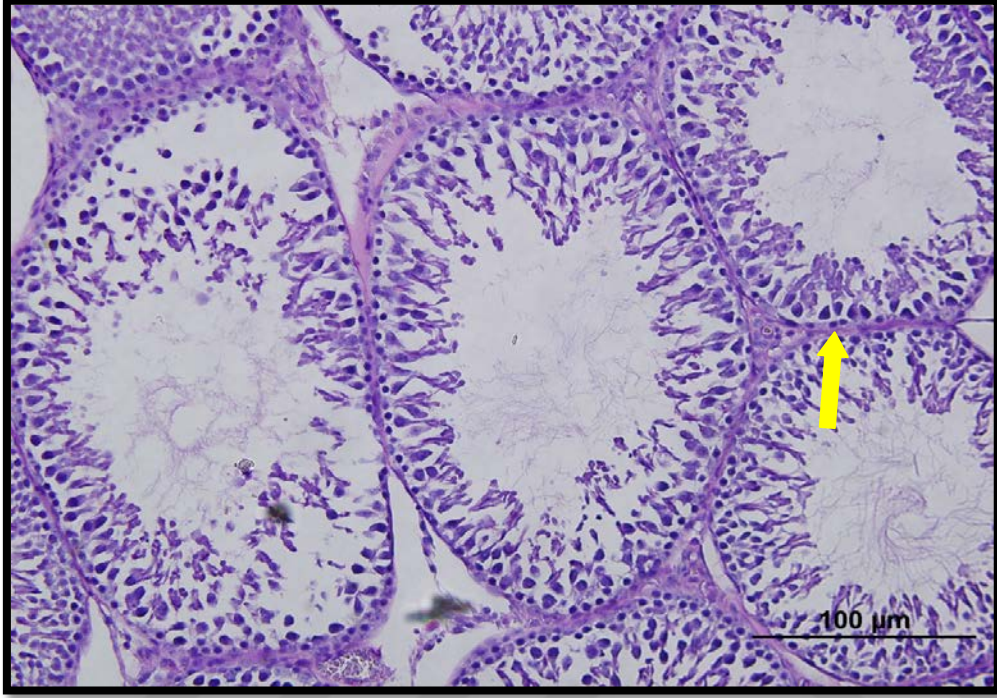
Şekil 24. Kontrol grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok testis seminifer tübülünün bazal membranını göstermektedir.

Karnozin grubu; histolojik kesitler değerlendirildiğinde testis seminifer tübül bazal membran kalınlığının normal olduğu görüldü (Şekil 25).



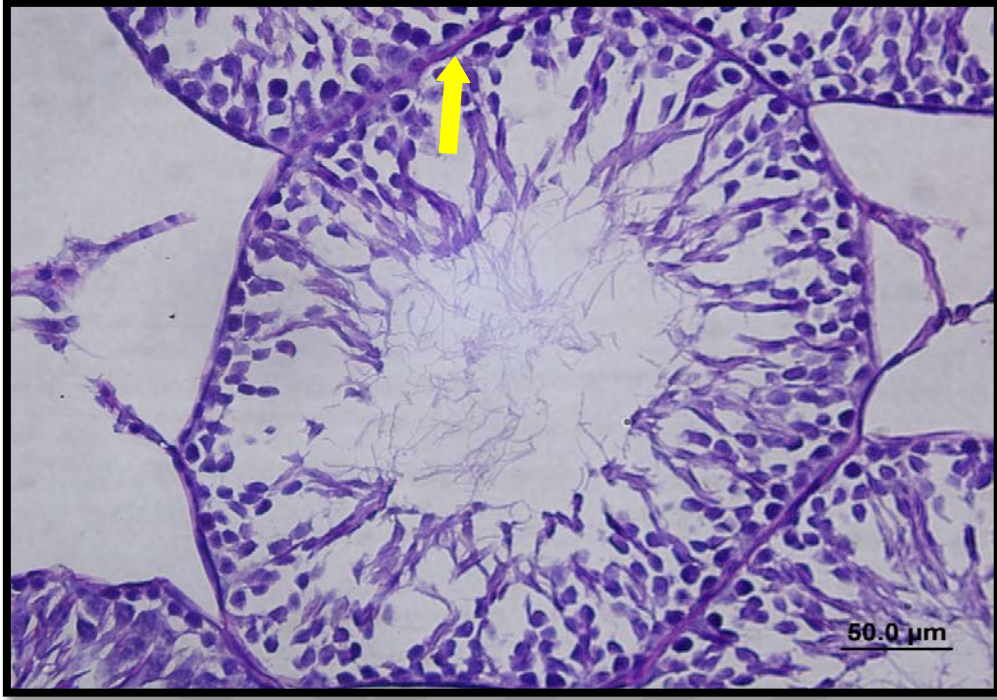
Şekil 25. Karnozin grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok testis seminifer tübülünün bazal membranını göstermektedir.

Siklofosfamid grubu; histolojik kesitler değerlendirildiğinde testis seminifer tübül bazal membran kalınlığının kontrol grubundan fazla olduğu görüldü (Şekil 26).



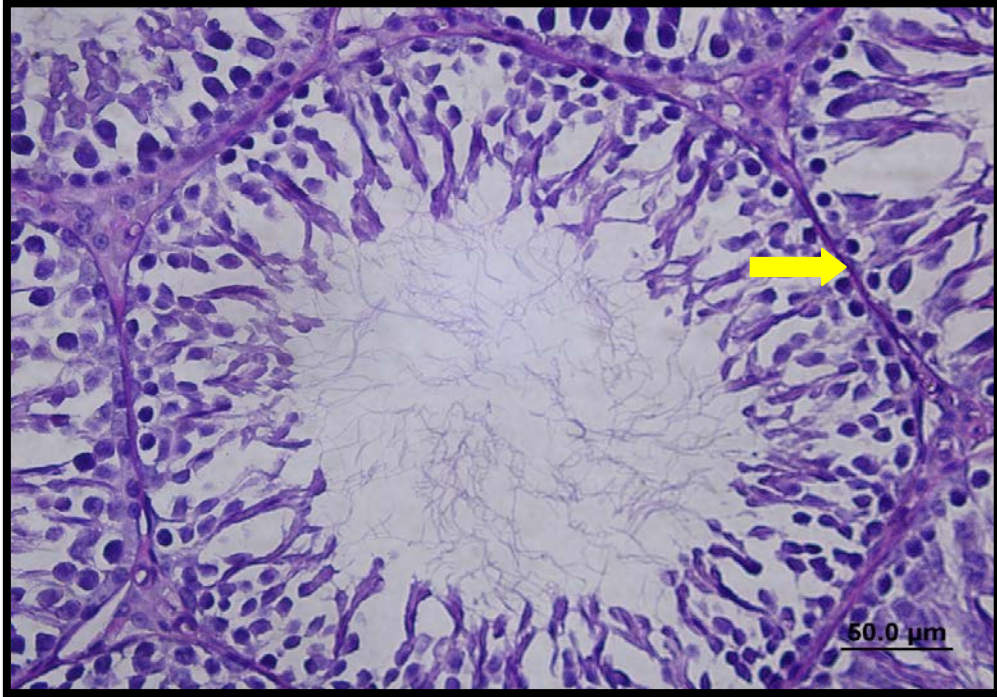
Şekil 26. Siklofosfamid grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü (20x). Sarı ok testis seminifer tübülünün bazal membranını göstermektedir

Karnozin + siklofosfamid grubu; histolojik kesitler değerlendirildiğinde testis seminifer tübül bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın şekilde normal olduğu görüldü (Şekil 27).



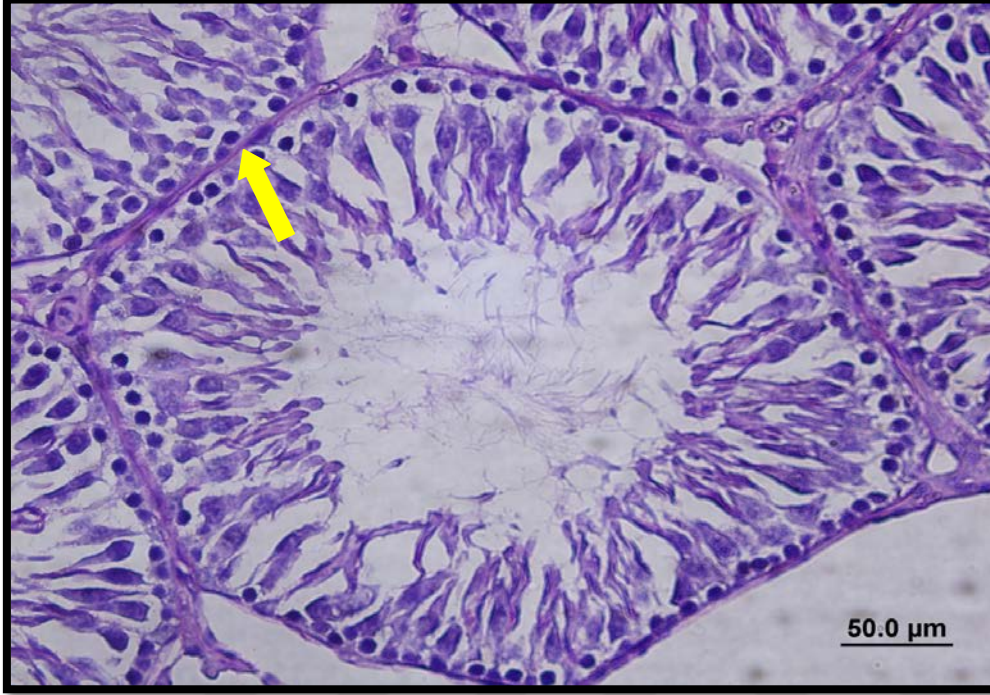
Şekil 27. K+CP grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü (40x). Sarı ok testis seminifer tübülünün bazal membranını göstermektedir

Karnozin = siklofosamid grubu; histolojik kesitler değerlendirildiğinde testis seminifer tübül bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın olduğu görüldü (Şekil 28).



Şekil 28. K= CP grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü (40x). Sarı ok testis seminifer tübülünün bazal membranını göstermektedir.

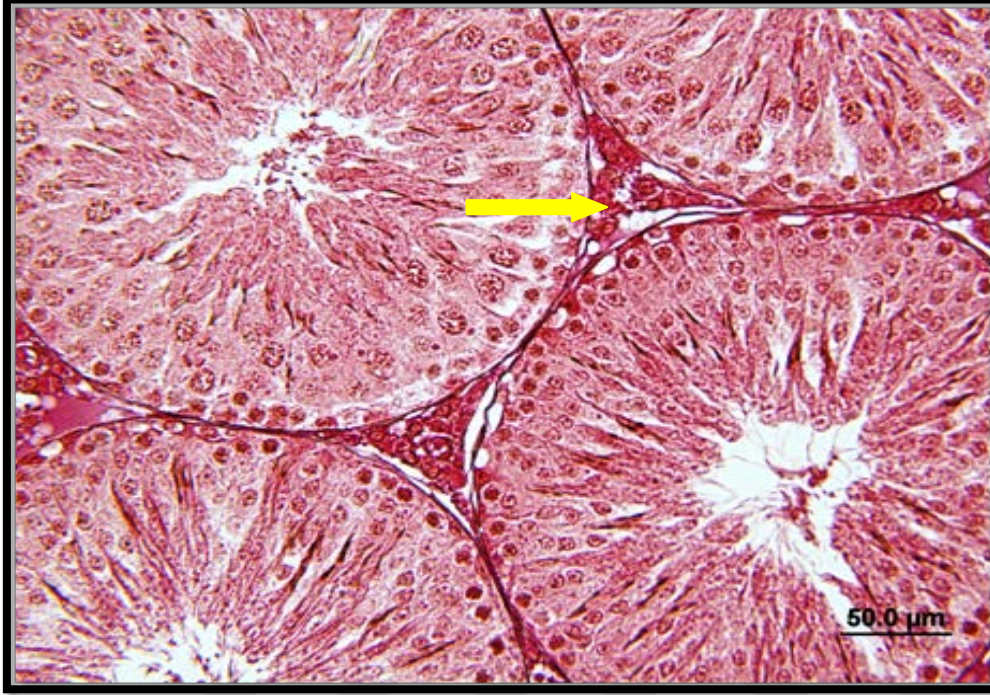
Siklofosfamid + karnozin grubu; histolojik kesitler değerlendirildiğinde testis seminifer tübül bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın olduğu görüldü (Şekil 29).



Şekil 29. CP+K grubunun PAS boyaması yapılan histolojik görüntüsü (40x). Sarı ok testis seminifer tübülünün bazal membranını göstermektedir

4.9.3. Masson Trikrom Boyaması Değerlendirilmesi

Kontrol grubu; değerlendirildiğinde histolojik kesitler testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunun normal olduğu görüldü (Şekil 30).



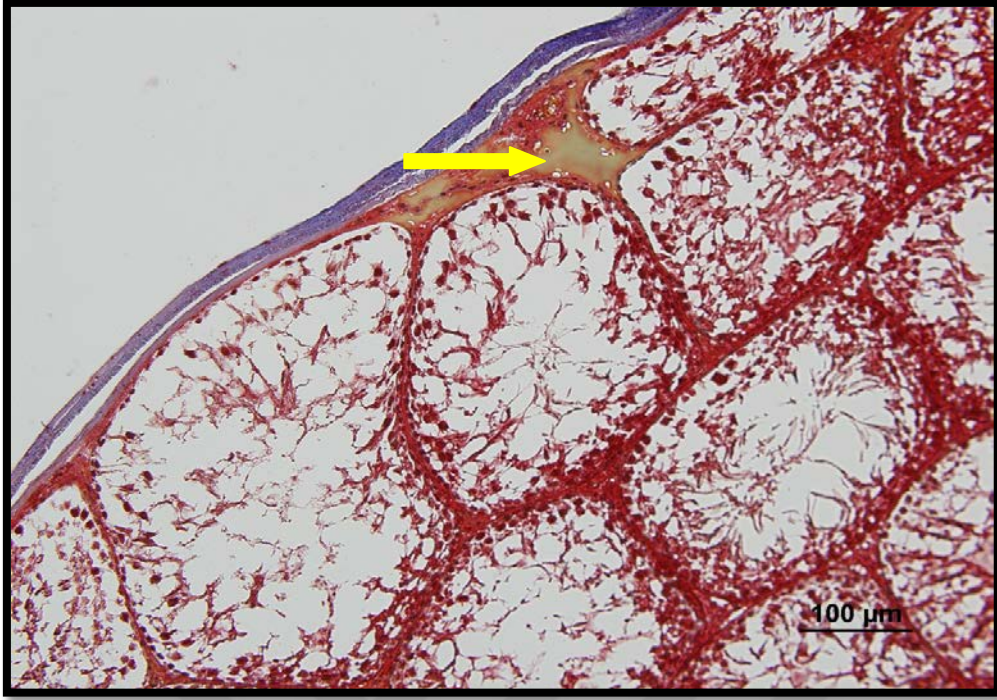
Şekil 30. Kontrol grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü (40x). Sarı ok testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunu göstermektedir.

Karnozin grubu; değerlendirildiğinde histolojik kesitler testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunun normal olduğu görüldü (Şekil 31).



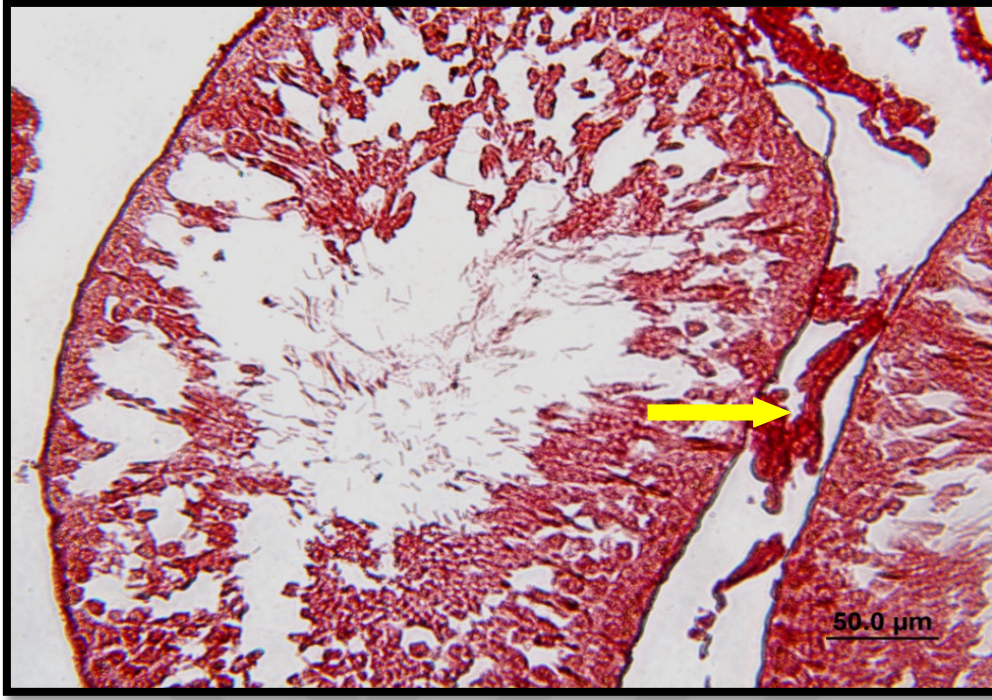
Şekil 31. Karnozin grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü (40x). Sarı ok testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunu göstermektedir

Siklofosfamid grubu; histolojik kesitlerde testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusu görülmektedir. (Şekil 32).



Şekil 32. Siklofosfamid grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunu göstermektedir. (20x)

Karnozin + siklofosfamid grubu; değerlendirildiğinde histolojik kesitler testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunun normale yakın şekilde siklofosfamid grubundan az olduğu görüldü (Şekil 33).



Şekil 33. K+CP grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunu göstermektedir (40x).

Karnozin = siklofosfamid grubu; değerlendirildiğinde histolojik kesitler testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunun normale yakın şekilde siklofosfamid grubundan az olduğu görüldü (Şekil 34).



Şekil 34. K=CP grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunu göstermektedir (40x).

Siklofosamid + karnozin grubu; değerlendirildiğinde histolojik kesitler testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunun normale yakın şekilde siklofosamid grubundan az olduğu görüldü (Şekil 35).



Şekil 35. CP+K grubunun Masson Trikrom boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok testis seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel bağ dokusunu göstermektedir (40x).

4.10. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.10.1. Aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama değerlendirmesi

Değerlendirmeleri Image J programı ile gerçekleştirdik. Elde edilen dokularda, her denek için 10 ayrı tübülde immün pozitif boyanma derecesini sıfır en az boyanan, üç en çok boyanan olmak üzere skorladık. **Kontrol grubu;** değerlendirildiğinde çok nadir olarak bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücelere rastlandı. Seminifer tübüllerin histolojik yapısının hematoxilen-eozin kesitlerinde olduğu gibi düzgün şekilde korunduğu görüldü (Şekil 36).

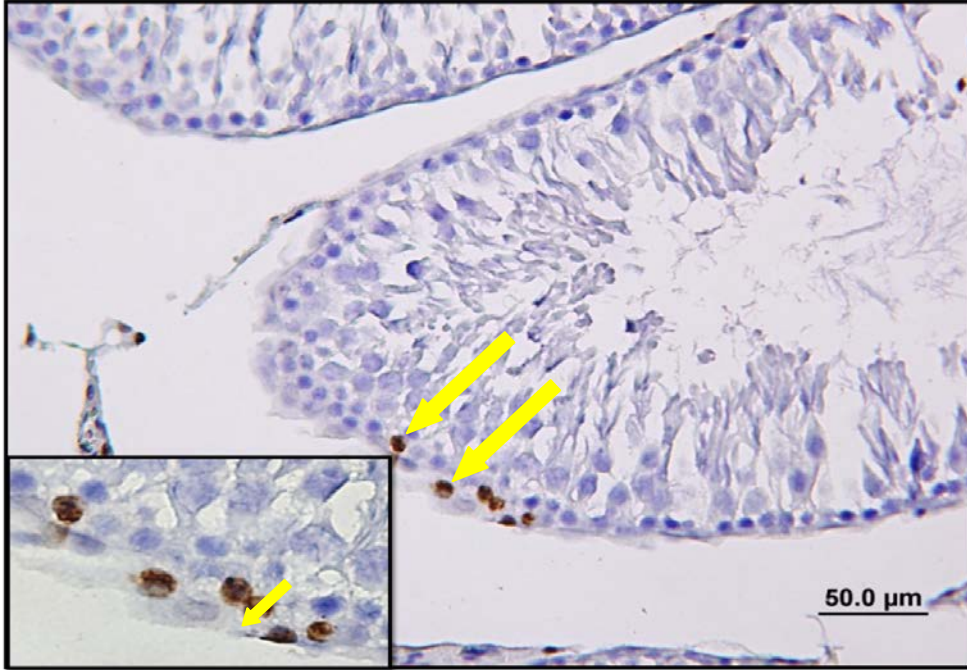


Şekil 36. Kontrol grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile apoptoz saptanan hücreler gösterilmektedir (40x).



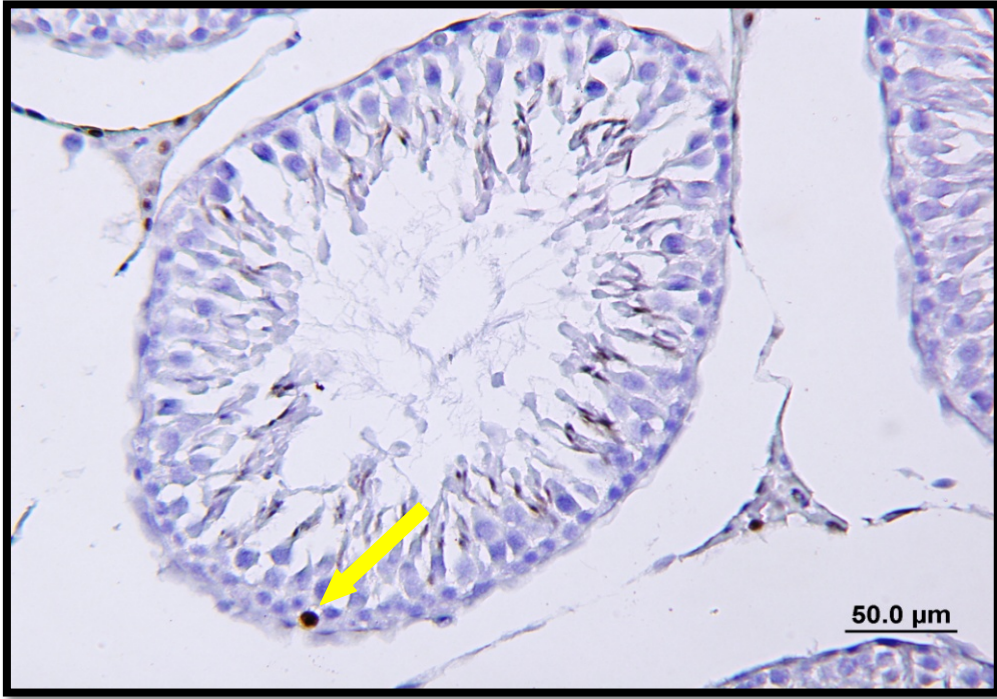
Şekil 37. Karnozin grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile apoptoz saptanan hücreler gösterilmektedir (40x).

Siklofosfamid grubu; değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre fazla oranda bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücreler görüldü (Şekil 38).



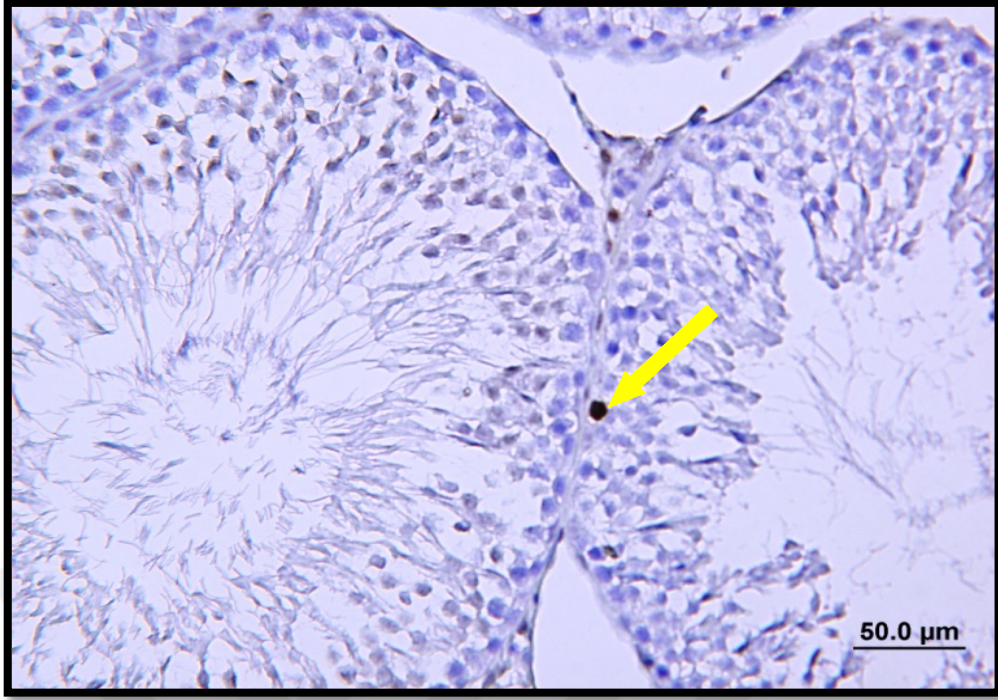
Şekil 38. Siklofosfamid grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile apoptoz saptanan hücreler gösterilmektedir (40x).

Karnozin + Siklofosfamid grubu; değerlendirildiğinde kontrol grubuna benzer oranda bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücreler görüldü (Şekil 39).



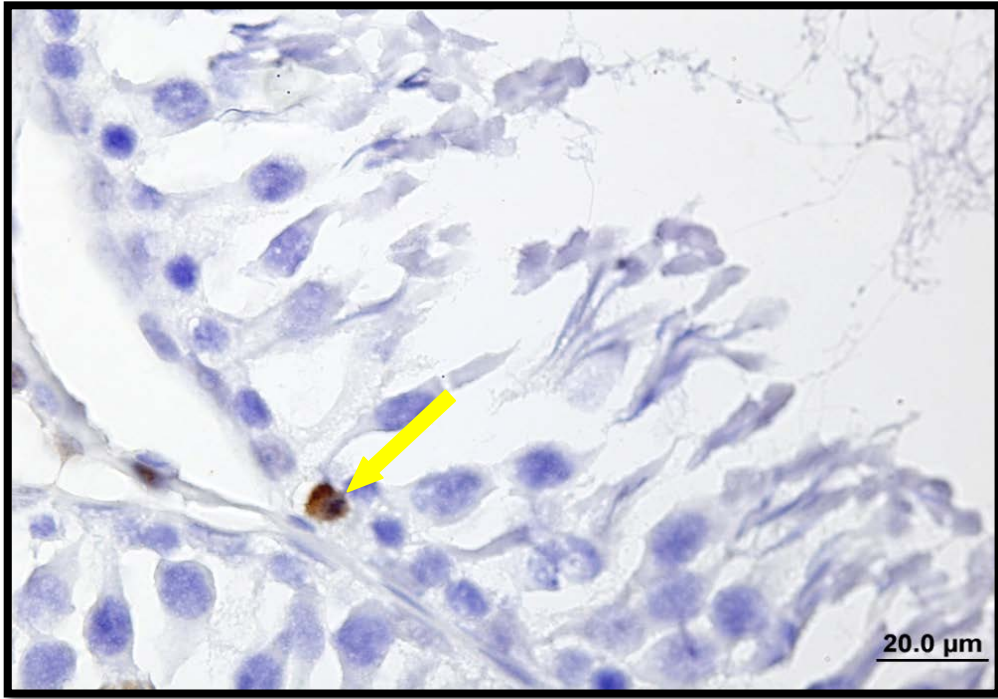
Şekil 39. K+CP grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile apoptoz saptanan hücreler gösterilmektedir (40x).

Siklofosfamid = Karnozin grubu; değerlendirildiğinde kontrol grubuna benzer şekilde germinal epitelde az sayıda apoptotik hücre görüldü (Şekil 40).



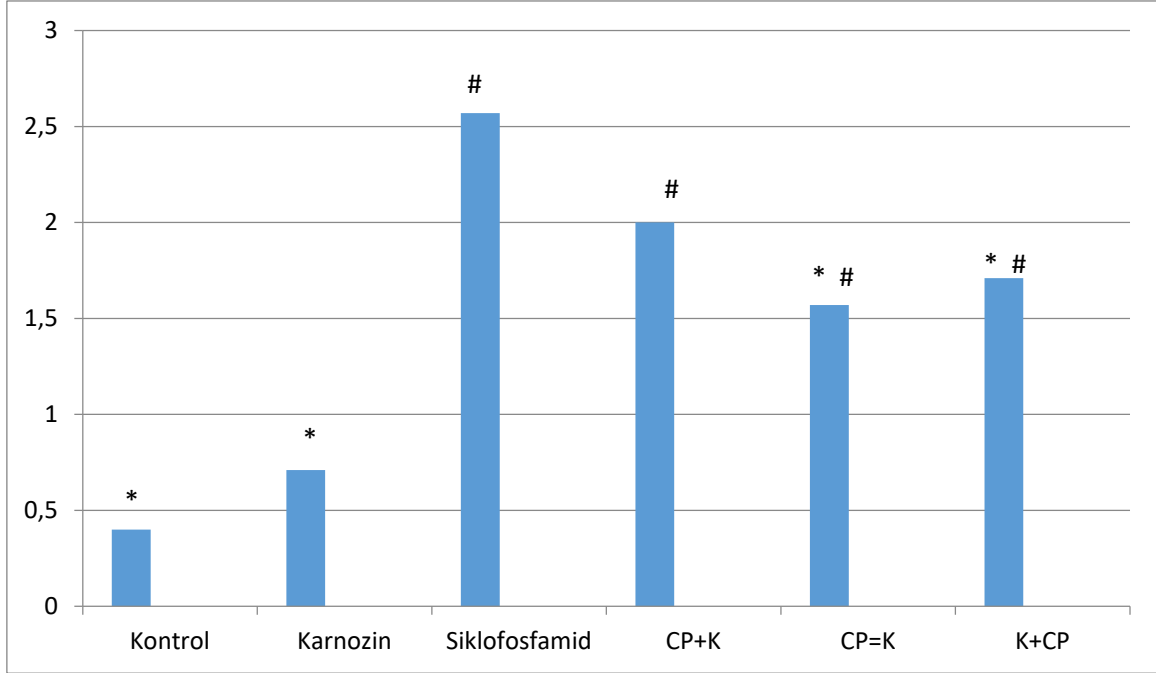
Şekil 40. K=CP grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile apoptoz saptanan hücreler gösterilmektedir (40x).

Siklofosfamid + Karnozin grubu; değerlendirildiğinde kontrol grubuna benzer oranda bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücreler görüldü (Şekil 41).



Şekil 41. CP+K grubunun Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile apoptoz saptanan hücreler gösterilmektedir (100x).

Gruplar arası aktif kaspaz-3 reaktivite skorları değerlendirildiğinde; siklofosfamid grubunda CP+K grubu hariç diğer gruplardan anlamlı yüksek değerler saptanmıştır. Karnozin ve kontrol grubu arasında fark gözlenmezken tedavi gruplarında kontrolden yüksek değerler saptanmıştır. Tedavi gruplarının arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 42).



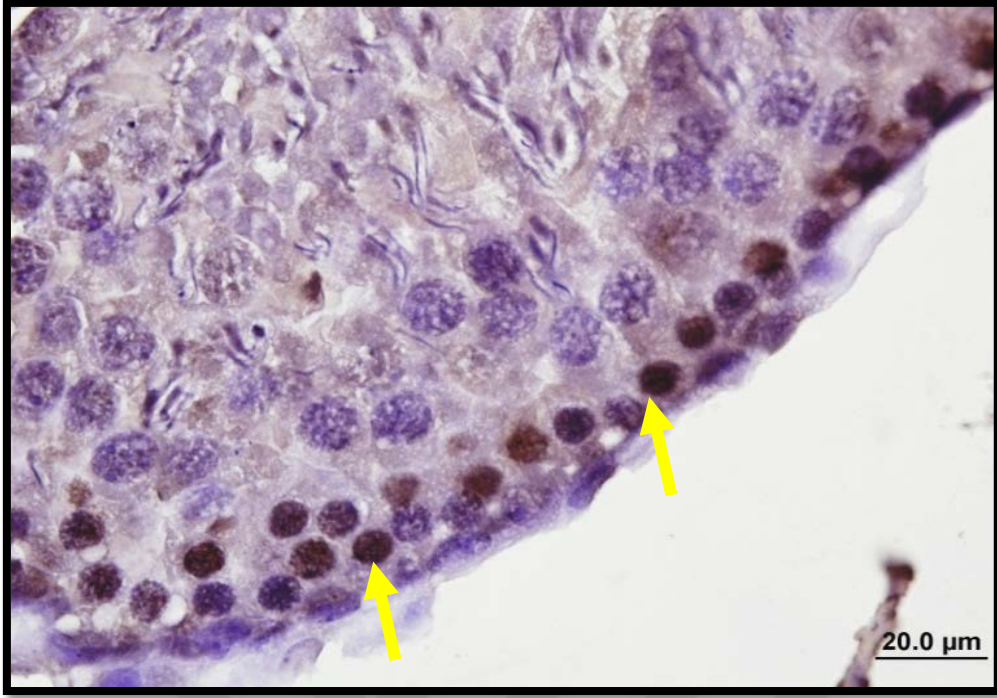
Şekil 42. Gruplar arası aktif kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme skorları.

* CP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.05$)

Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.05$)

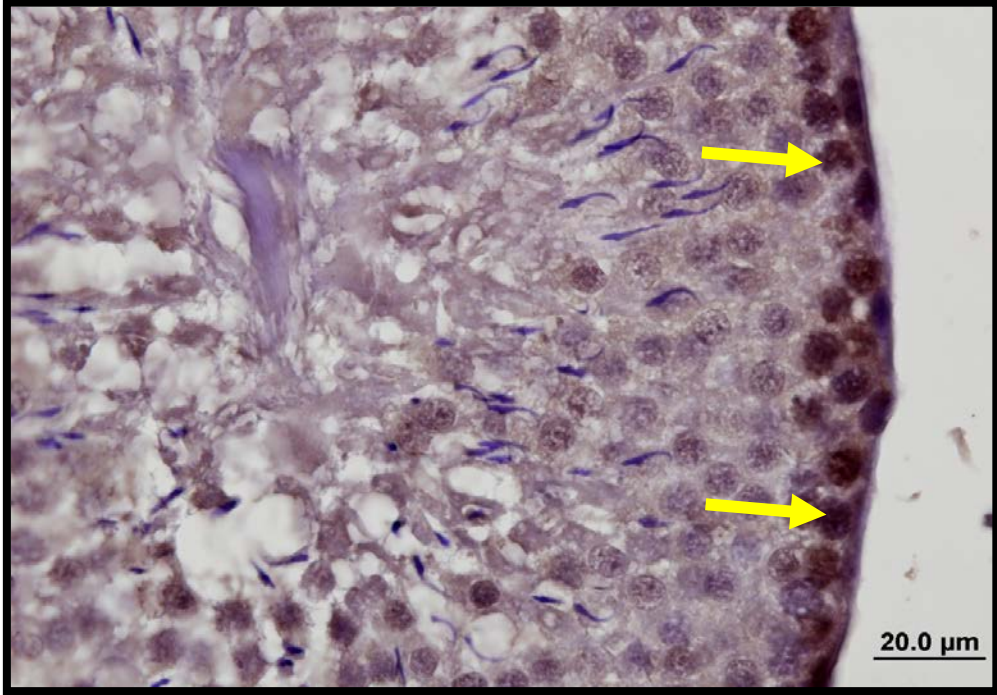
4.10.2. Anti-klaudin5 immünohistokimyasal boyama değerlendirmesi

Değerlendirmeleri Image J programı ile gerçekleştirdik. Elde edilen dokularda, her denek için 10 ayrı tübülde immün pozitif boyanma derecesini sıfır en az boyanan, üç en çok boyanan olmak üzere skorladık. **Kontrol grubu;** değerlendirildiğinde klaudin5 ekspresyon kaybının olmadığı, spermatogenik hücrelerin immün pozitif işaretlendiği görülmektedir (Şekil 43).



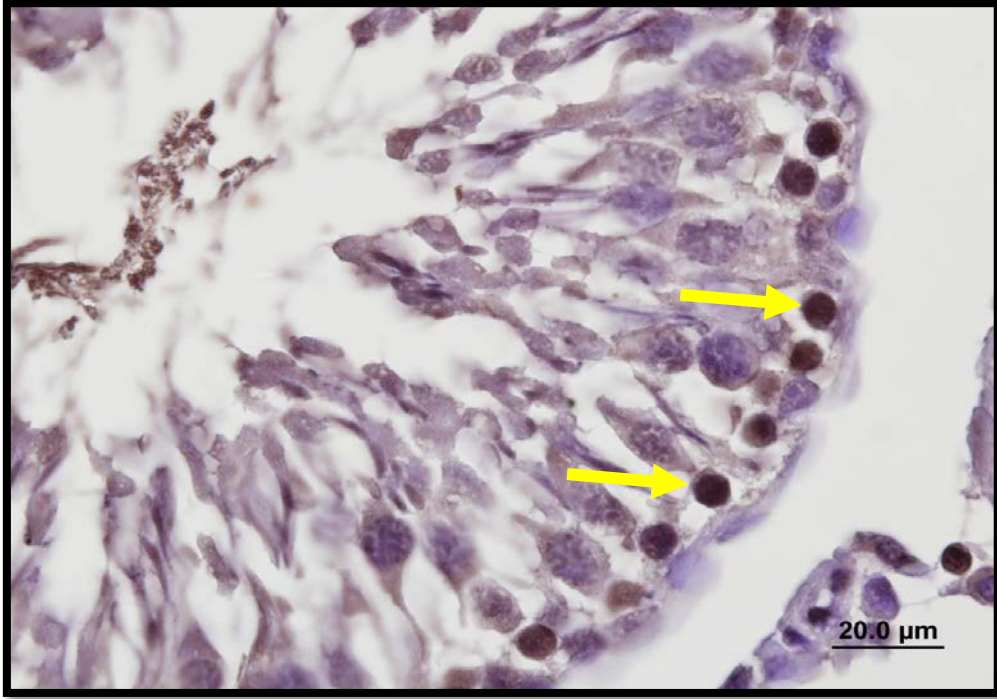
Şekil 43. Kontrol grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile klaudin5 immünreaktivitesi gösteren hücreler belirtilmektedir (100x).

Karnozin grubu; değerlendirildiğinde kontrol grubuna benzer şekilde klaudin5 ekspresyon kaybının olmadığı, spermatogenik hücrelerin immün pozitif işaretlendiği görülmektedir (Şekil 44).



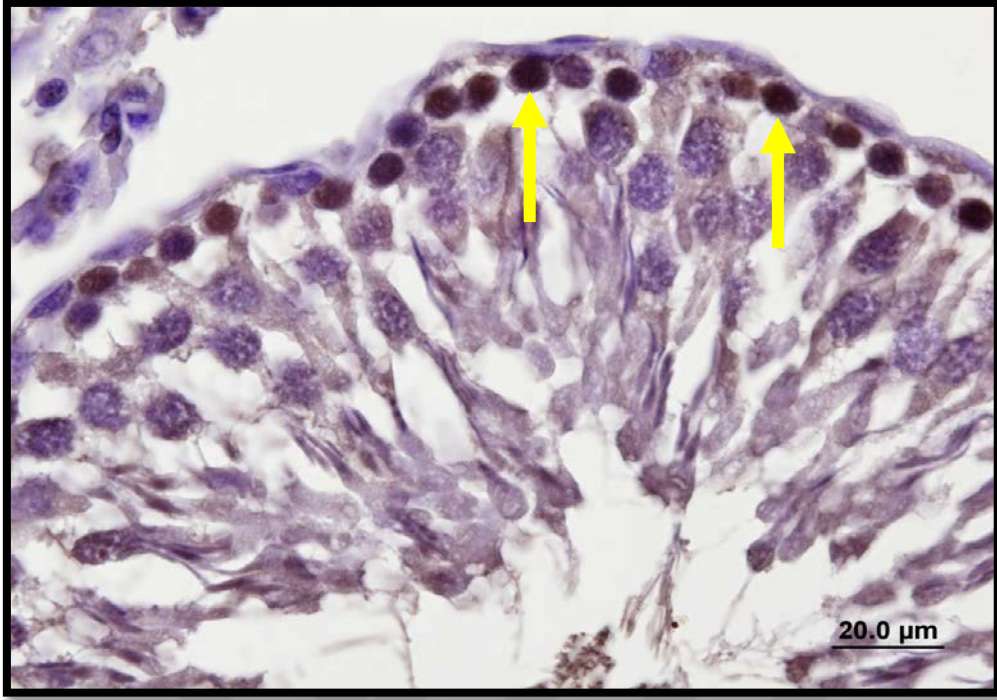
Şekil 44. Karnozin grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile anti-klaudin5 immünreaktivitesi gösteren hücreler belirtilmektedir (100x).

Siklofosfamid grubu; değerlendirildiğinde spermatogenik hücrelerde klaudin5 ekspresyon kaybının olduğu, immün pozitif işaretlenen hücre sayısının kontrole göre azaldığı görülmektedir (Şekil 45).



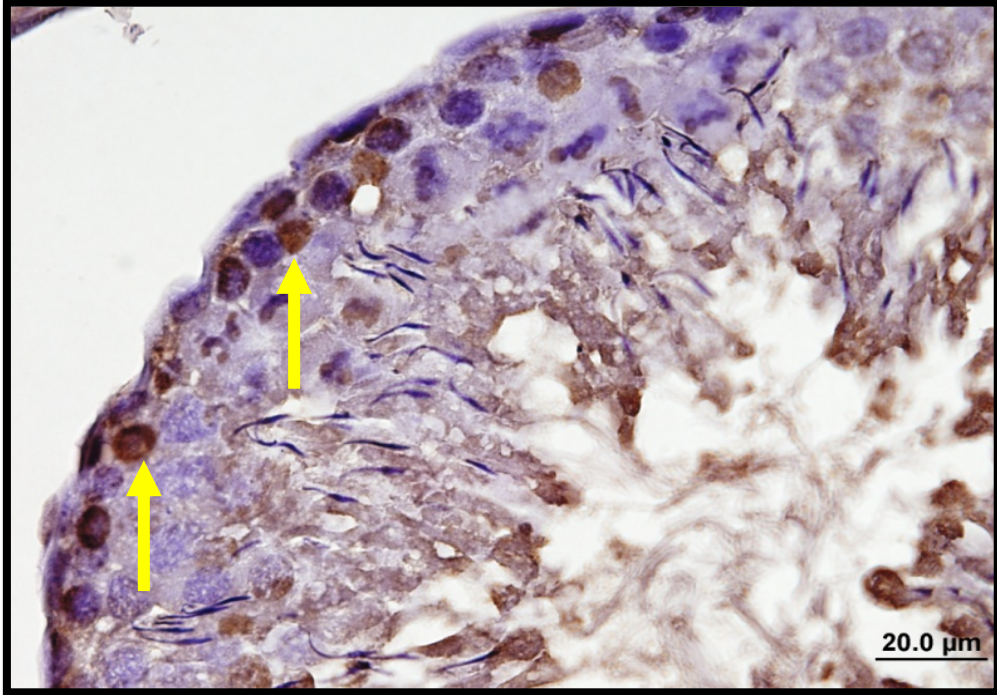
Şekil 45. Siklofosfamid grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile anti-klaudin5 immünreaktivitesi gösteren hücreler belirtilmektedir (100x).

Karnozin + Siklofosfamid grubu; değerlendirildiğinde karnozinin profilaktik olarak verilmesiyle klaudin5 ekspresyon kaybının azaldığı, hasar grubunun aksine spermatogenik hücrelerin birçoğunun immün pozitif işaretlendiği görülmektedir (Şekil 46).



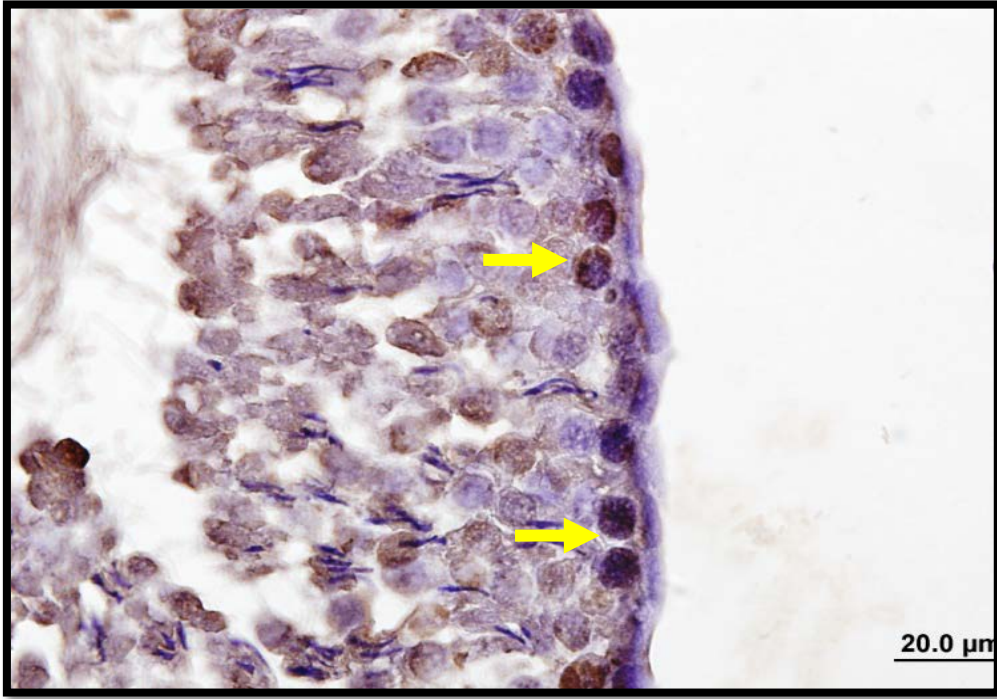
Şekil 46. K+CP grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile klaudin5 immünreaktivitesi gösteren hücreler belirtilmektedir (100x).

Siklofosfamid = Karnozin grubu; değerlendirildiğinde kontrol grubuna yakın şekilde klaudin5 ekspresyon kaybının az olduğu, spermatogenik hücrelerin birçoğunun immün pozitif işaretlendiği görülmektedir (Şekil 47).



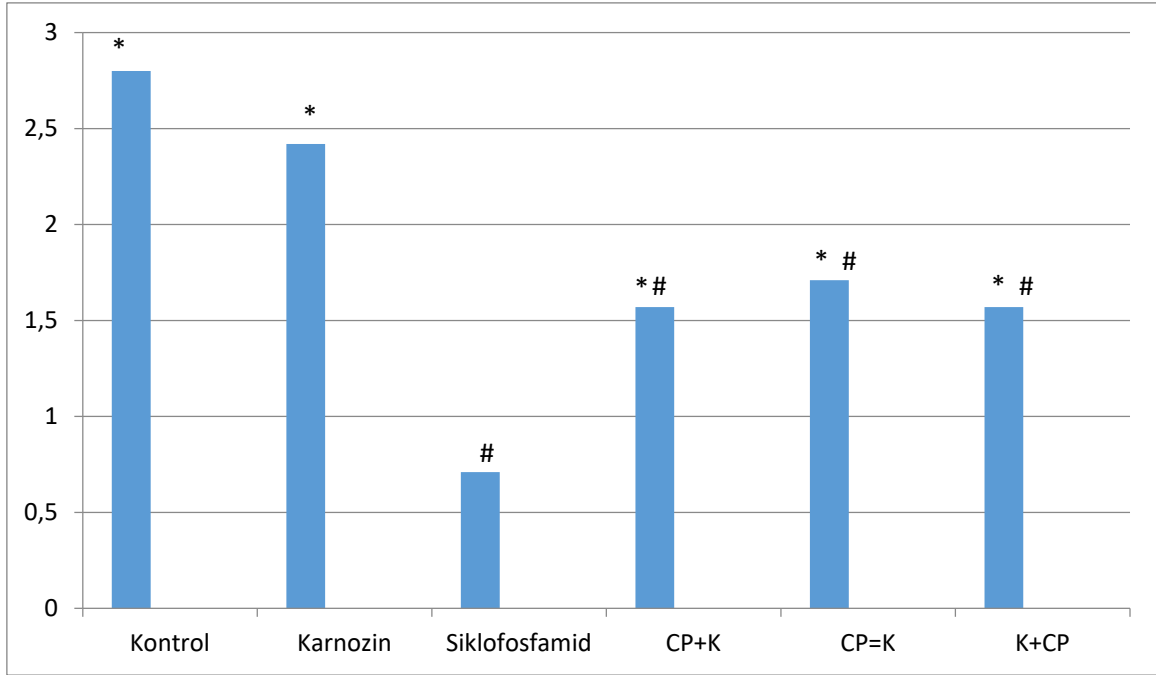
Şekil 47. CP=K grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile anti-klaudin5 immünreaktivitesi gösteren hücreler belirtilmektedir (100x).

Siklofosfamid + Karnozin grubu; değerlendirildiğinde spermatogenik hücrelerin birçoğunun immün pozitif işaretlendiği görülmektedir (Şekil 48).



Şekil 48. CP+K grubunun Anti-klaudin5 immün boyaması yapılan histolojik görüntüsü. Sarı ok ile klaudin5 immünreaktivitesi gösteren hücreler belirtilmektedir (100x).

Gruplar arası anti-klaudin5 reaktivite skorları değerlendirildiğinde; siklofosfamid grubundaki diğer gruplardan anlamlı düşük değerler saptanmıştır (Tablo 11). Karnozin ve kontrol grubu arasında fark gözlenmezken tedavi gruplarında kontrolden düşük değerler saptanmıştır. Tedavi gruplarının arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 49).



Şekil 49. Gruplar arası anti-klaudin5 immüreaktivite değerlendirme skorları.

* CP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

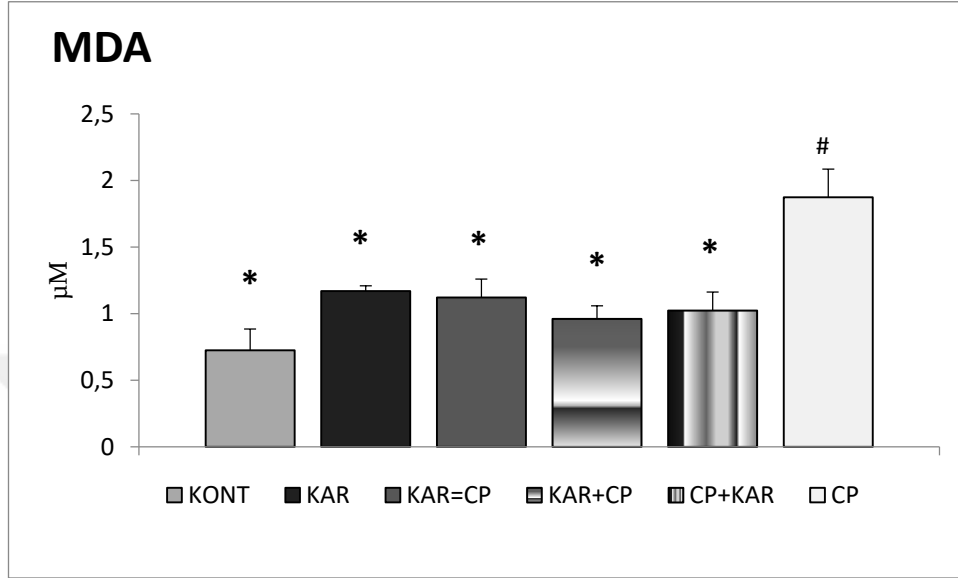
Tablo 11. Gruplara ait anti-klaudin5 ve aktif kaspaz-3 skrolama değerleri.

Grup	anti-klaudin5	aktif kaspaz-3
KONT	2.80 ± 0.20	0.40 ± 24
KAR	2.42 ± 0.20	0.71 ± 0.18
CP	0.71 ± 0.18	2.57 ± 0.20
KAR+CP	1.57 ± 0.20	2.00 ± 0.30
KAR=CP	1.71 ± 0.18	1.57 ± 0.20
CP+KAR	1.57 ± 0.20	1.71 ± 0.18

4.5. Biyokimyasal Bulgular

MDA değerleri: Tüm grupların MDA değerleri Tablo 12’de, ortalama MDA sonuçları Şekil 50’de gösterilmektedir. CP grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). KAR, KAR=CP, KAR+CP ve CP+KAR gruplarında MDA değerleri CP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

KAR=CP, KAR+CP ve CP+KAR grupları arasında MDA değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Kontrol ve ilaç grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$), (Şekil 50).

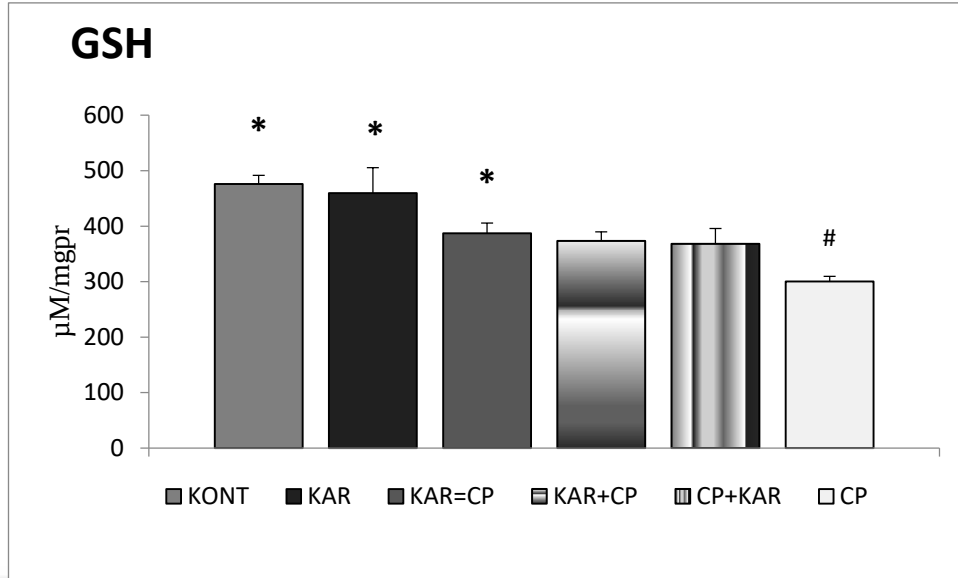


Şekil 50 . Gruplar arası MDA değerleri karşılaştırılması

* CP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$)

Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$)

GSH değerleri: Tüm grupların GSH değerleri Tablo 12’de, ortalama GSH sonuçları Şekil 51’da gösterilmektedir. CP grubunun GSH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). KAR ve KAR=CP gruplarında GSH değerleri CP grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). KAR+CP ve CP+KAR grupları CP grubuna göre daha yüksek GSH değerlerine sahip olmakla birlikte, bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). KAR=CP, KAR+CP ve CP+KAR grupları arasında GSH değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Kontrol ve KAR grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$), (Şekil 51).



Şekil 51. Gruplar arası GSH değerleri karşılaştırılması.

* CP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$)

Tablo 12. Gruplara ait MDA ve GSH değerleri

Grup	MDA (µM)	GSH (µM/mgpr)
KONT	0.72 ± 0.16*	475.95 ± 15.76*
KAR	1.17 ± 0.03*	459.60 ± 45.89*
KAR=CP	1.12 ± 0.13*	387.21 ± 18.41*
KAR+CP	0.96 ± 0.09*	373.27 ± 16.58
CP+KAR	1.02 ± 0.13*	367.99 ± 27.74
CP	1.87 ± 0.21 [#]	300.29 ± 9.27 [#]

* CP grubuna göre anlamlı olarak farklı

Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı

5. TARTIŞMA

Siklofosfamid antineoplastik ya da immünsüpresan olarak kullanılabilen sitotoksik alkileyici bir ajandır. Multiple myeloma, lösemi, lenfoma, romatoid artrit tedavisinde ve kemik iliği transplantasyonuna hazırlıkta kullanılır. Testis ve akciğeri de içeren birçok organda toksik yan etkiler oluşturmaları deneysel ve klinik çalışmalarda kullanımını sınırlamaktadır. Apoptoz, nekroz ve sekonder kanser gelişimi gibi yan etkilerin gelişimi siklofosfamidin vücutta oluşturduğu metabolitleri fosforamid hardalları ve akrolein sebebiyledir. Siklofosfamidin oluşturduğu toksik etkinin patofizyolojisinde oksidatif stres merkezi bir rol alır. Akrolein canlı dokusunun doğal antioksidan defans mekanizmasının çalışmasını engeller. Sonuç olarak yüksek derecede reaktif oksijen ürünleri oluşur. Serbest radikaller yapısal membranlarda lipid peroksidasyonunu indükler, ayrıca diğer biyomoleküllerle etkileşerek enzimlerin, iyon pompalarının ve reseptörlerin normal fonksiyonlarının dışında aktive ya da inhibe olmalarına neden olurlar. Oksidatif strese bağlı süperoksid iyon dengesinin bozulması fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler yaratarak bazı hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna neden olurlar. Bu aktivasyon neticesinde hücrelerde apoptoza yol açan proinflatuar sitokinlerin sentezi uyarılır. İnflamasyon testis toksisitesindeki başlıca sebeptir. Toksiteye yol açan proinflatuar sitokinlerin başında tümör nekroz faktör alfa ve dönüştürücü büyüme faktörü beta gelmektedir.

Karnozin antioksidan aktivitesini metal iyon şelasyonu, ROS ve peroksil radikalleri temizlenmesi gibi farklı mekanizmalarla gerçekleştirebilir. Karnozin serbest radikalleri temizlemesinin yanısıra bunları üreten enzim sistemlerinin de aktivitelerinin düzenleyicisidir. Karnozin iyi bir metal iyon şelatörüdür. Bakır, çinko, kobalt, demir iyonlarıyla birleşip kompleks oluşturabilir. Bu iyonlara bağlı reaksiyonları inhibe eder. Örneğin demir iyonlarıyla şelasyon yapması sonucunda lipid peroksidasyonu baskılanır (54,55). Karnozin yaşlanma ve ilişkili patolojilerde görülen protein oksidasyonu, glikasyon ve ileri glikasyon son ürünleri oluşumunu baskılar. Memelilerde antioksidan, antiglikasyon etkili, serbest oksijen radikalleri temizleyicisi, ph tamponlayıcısı ve metal iyonu şelatörü molekül olarak bilinir (48). İçerdiği imidazol halkası sayesinde iyi bir ph tamponlayıcısıdır (49).

Vücut ve testis, ağırlığı yönünden yapılmış olan çalışmalar değerlendirildiğinde; Lamiaa ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada iki gün üst üste 150 mg/kg/gün dozda i.p. yolla siklofosfamid verdikleri sıçanlarda yedinci gün sonunda vücut ve testis ağırlıklarını ölçmüşlerdir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında siklofosfamid grubunda daha düşük değerler elde edilmiştir. Kontrol grubunda testis ağırlık ortalaması $1,97 \pm 0,11$ iken CP grubunda $0,91 \pm 0,1$ olarak ölçülmüştür. Deney sonu vücut ağırlıkları ise kontrol grubunda $201,70 \pm 2,00$ gram CP grubunda ise ortalama $150,71 \pm 4,70$ g olarak hesaplanmıştır (67). Sung ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada 150 mg/kg/gün dozda i.p. yolla siklofosfamid verdikleri sıçanlarda onuncu gün sonunda vücut ve testis ağırlıklarını ölçmüşlerdir. Kontrol grubuna kıyasla CP grubunda anlamlı oranda testis ve vücut ağırlığı kaybı saptanmıştır (68). Biz de çalışmamızda siklofosfamid grubunda tüm gruplara göre anlamlı düşük testis ağırlığı tespit ettik. Karnozin ve kontrol grupları arasında fark görülmezken tedavi gruplarında kontrolden düşük testis ağırlıkları saptadık. Tedavi gruplarının hepsinde testis ağırlığı hasar grubundan anlamlı yüksekti. Hasar grubundaki bu düşüklük testis dokusundaki atrofiye bağlı olabilir. Karnozinin siklofosfamid ile eş zamanlı verildiği grupta diğer tedavi gruplarına göre anlamı yüksek testis ağırlığı saptandı. Bu durum karnozinin yarılanma ömrünün kısa olmasına bağlanabilir. Deney öncesi ve sonrasındaki vücut ağırlık farkları açısından değerlendirildiğinde; siklofosfamid grubu hariç tüm gruplarda anlamlı artış olurken siklofosfamid grubunda anlamlı azalma olmuştur. Bu kilo azalması siklofosfamidin sitotoksik etkisine bağlı olabilir.

Histomorfolojik değişiklikler açısından yapılan çalışmalarda; Sung ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada siklofosfamid uygulanan sıçanlarda testis germ hücre epitelinde dökülmeler, vakuolizasyon, spermatositlerin sayısında azalma ve dejenerasyon belirlenmiştir (68). Ayman ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada siklofosfamid uygulanan sıçanların testislerinde seminifer tübüller arasında hemoraji, germ hücrelerinde vakuoller, spermatogenik seriye ait hücrelerin organizasyon bozukluğu ve birbirinden ayrılması gibi ciddi hasarlar tespit etmişlerdir (69). Ommati ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada kurşun ile hasar verdikleri sıçan testislerini karnozin ile tedavi ettiklerinde hasar grubuna göre histolojik olarak anlamlı iyileşme saptanmıştır (70). Biz de çalışmamızda kontrol ve karnozin grubunda normal testis histolojik yapısı gözledik. H-E boyamada; siklofosfamid grubunda belirgin germinal epitel hasarı olduğunu gördük. Seminifer tübülün germinal epitelinin bazal membrandan ayrıldığı (bazal membran ondülasyonu) görüldü. K+CP,

K=CP ve CP+K gruplarında bazı seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel alanda eritrosit görülmekle birlikte birçok seminifer tübülde germinal epitelin düzenli olduğu ve dizilim bozukluğunun azaldığı gözlemlendi.

Yapılan çalışmalarda seminifer tübül çapları ve Johnsen kriterleri değerlendirilmiş. Fereshte ve ark. (2017) Wistar Albino ratlarda siklofosfamid ile testis hasarı oluşturdukları gruplarda seminifer tübül çapı azalması ve Johnsen skor düşüklüğünü içeren histolojik değişiklikler saptamışlardır. Kontrol grubunda Johnsen skor ortalaması 9.52 ± 0.10 iken siklofosfamid grubunda 7.45 ± 0.27 olarak saptanmıştır. Seminifer tübül çap değerleri ise kontrolde ortalama 295.14 ± 5.69 iken hasar grubunda 207.00 ± 11.07 olarak bulunmuştur(71). Aydın ve ark. (2018) tarafınca yapılan çalışmada D-galaktoz ile hasar verilen sıçan testislerinde öncesinde i.p. 250 mg/kg dozda karnozin uygulanan gruplarda Johnson skorları açısından anlamlı koruyucu etki sağlanmıştır(72). Biz de çalışmamızda CP grubundaki seminifer tübül çap değerlerini kontrol grubuna göre düşük bulduk ($p=0.001$). Karnozinle birlikte siklofosfamidin verildiği üç grupta ise CP grubuna göre anlamlı yüksek değerler saptadık. K+CP ile CP+K arasında ($p= 0.448$), CP+K ile CP=K ($p=0.923$), K+CP ile CP=K ($p= 0.568$) arasında anlamlı fark saptamadık($p>0.05$).

Testis seminifer tübül bazal membran kalınlıklarının değerlendirildiği çalışmalarda; Selvakumar ve ark. (2006) siklofosfamid ile hasar verilen testislerde seminifer tübül bazal membran kalınlıklarının artmış olduğunu bildirmişlerdir (73). Siklofosfamidin testiste oluşturduğu toksik etki sebebiyle seminifer tübül bazal membranında kalınlık artışına yol açan hyalin birikimi ve fibrotik değişiklikler olur. Bizim çalışmamızda da PAS boyaması yaparak incelediğimiz kesitlerde tüm grupların bazal membran kalınlık değerlerinin siklofosfamid grubundan anlamlı düşük olduğunu saptadık. Hasar grubu dışındaki gruplar arasında farklılık izlenmedi. Karnozinin siklofosfamidle birlikte verilmesinin bazal membran kalınlaşmasını azalttığı tespit edildi.

Seminifer tübül bazal membran kalınlığının artmasının infertiliteye yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca doğal yaşlanma sürecinde de bazal membran kalınlığı artar ve fertilite azalır. Böylelikle siklofosfamid kemoterapisi alan hastalarda görülen infertiliteye yol açan bazal membran kalınlık artışı karnozin kullanılarak azaltılabileceğini gösterdik. Doğal yaşlanma sürecinde de karnozin kullanımı antioksidan etkisiyle bazal membran kalınlık artışını azaltabilir. Doğal bir antioksidan olması da yaşlı hastalarda yan etki oluşturmaması açısından olumlu bir özelliktir.

Klaudin 1-3-5 ve 7'yi içeren klaudin protein ailesi ve okludinler kan testis bariyerinin sıkı bağlantı kompleksinin ana bileşenlerini oluşturur (74). Klaudin5 özellikle kan testis bariyerindeki mikrodamarların endotelinde bulunur (75). Yuanchao ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada siklofosfamid uygulamasının erkek farelerde kan testis bariyerine hasar verdiğini göstermişlerdir. İmmünohistokimyasal boyama yapıldığında siklofosfamid grubunda kontrol grubuna kıyasla okludin immünreaktivite azalması olduğu saptanmıştır (74). Huimin ve ark. (2012) beyin iskemi modeli oluşturdukları çalışmada bir antioksidan olan luteolinin etkilerine bakmışlar. Serebral iskemi olan grupta kan beyin bariyerinde bulunan klaudin-5 ekspresyonu ciddi oranda azalırken, luteolin verilen grupta klaudin-5 ekspresyon kaybının az olduğu saptanmıştır (76). Biz de çalışmamızda güçlü bir antioksidan olan karnozinin, siklofosfamide bağlı oluşan hasar ile kan testis bariyerinin önemli bir komponenti olan klaudin5 proteini kaybını azalttığını saptadık. Karnozin grubunda anti-klaudin5 ekspresyonunun siklofosfamid grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulduk ($p=0.001$). Tedavi grupları arasında anlamlı immünreaktivite skor farkı saptamadık. K+CP ile CP+K arasında ($p= 0.432$), CP+K ile CP=K ($p=0.343$), K+CP ile CP=K ($p= 0.256$) arasında anlamlı fark saptamadık($p>0.05$).

Antioksidanlar reaktif oksijen ürünleri ve diğer oksidanların zararlı etkisini azaltarak antiapoptotik etki sağlayabilmektedirler. Potnuri ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada; siklofosfamidin ve bir antioksidan olan crocinin fertilitateye etkisini ratlarda incelemişler. Testis homojenatında kaspaz-3 enzim aktivitesi bakıldığında siklofosfamid grubunda kontrole göre aktivite artışı izlenmiştir. Antioksidanla birlikte verildiğinde ise kaspaz-3 enzim aktivitesi ve apoptoz azalmıştır (77). Kim ve ark. (2016) çalışmalarında; siklofosfamid ve antioksidan disüfitler kullanarak rat testislerinde aktif kaspaz 3 immünreaktivitesini ve apoptotik hücre miktarı saptanmıştır. Siklofosfamid uygulanan grupta kaspaz-3 immünreaktivitesi kontrole göre fazla bulunmuştur. Ayrıca siklofosfamidle antioksidanın birlikte verildiği grupta siklofosfamid grubuna göre immünreaktivite ve apoptoz azalmıştır (68). Alaeel ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada; sıçanlara arsenit ve karnozin uygulanarak testis dokuları incelenmiştir. Arsenit ve karnozin uygulanan sıçanlarda, sadece arsenit uygulanan sıçanlara göre testis homojenatında daha az kaspaz-3 aktivitesi belirlenmiştir (78). Abbasoğlu ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada; testis torsiyonu ile iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçan testisleri

değerlendirilmiştir. Torsiyon önce sinde karnozin uygulaması yapılan grupta uygulanmayanlara göre testiküler spermatogenezde belirgin artış olduğu saptanmıştır (79).

Haeri ve ark. (2013) çalışmalarında gama radyasyon vererek fare testislerine hasar verdikleri çalışmada TUNEL ile apoptotik hücre değerlendirmesi yapmışlardır. Radyasyondan önce karnozin uygulanan farelerde uygulanmayanlara göre apoptozun artığını bildirmişlerdir (81). Biz de çalışmamızda aktif kaspaz3 immünohistokimyasal boyaması yaparak testis dokusunda immün pozitif boyanma derecesini skorladık. Kontrol grubunda CP grubuna göre anlamlı düşük skor saptadık ($p=0.001$) . K+CP ile CP+K arasında ($p= 0.535$), CP+K ile CP=K ($p=0.383$), K+CP ile CP=K ($p= 0.710$) arasında anlamlı fark saptamadık ($p>0.05$). Karnozin antioksidan etkisi sayesinde; testisi siklofosfamid verilmesiyle oluşan reaktif oksijen ürünleri ve diğer prooksidan moleküllerin oluşturabileceği apoptotik hasardan korumuştur.

Siklofosfamid vücutta metabolize edilirken reaktif oksijen ürünleri açığa çıkar. MDA lipid peroksidasyon son ürünüdür. MDA düzeylerinin artışı lipid peroksidasyonu ve doku hasarına işaret etmektedir. SOD, GPx, katalaz gibi antioksidan savunma mekanizmalarıyla vücut oksidatif hasardan korunmaya çalışır. Oksidan ve antioksidan denge bu enzimlerin biyokimyasal ölçümleriyle saptanabilir. Çeribaşı ve ark. (2010) siklofosfamidin testis üzerindeki toksik etkilerini araştırdıkları çalışmada plazma MDA seviyelerini ölçtüklerinde, siklofosfamid verilen grupta kontrole göre çok daha yüksek seviyelerde olduğunu göstermişlerdir (82). Sung ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada siklofosfamid uygulanan sıçanlarda kontrole göre GSH ve glutatyon redüktaz seviyelerinde azalma MDA'da ise artış tespit etmişlerdir (68). Lamiaa ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada siklofosfamid uygulanan ratlarda kontrole kıyasla azalmış GSH seviyeleri saptamışlardır (67). Ayman ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada siklofosfamid uygulanan sıçanların testislerinde biyokimyasal incelemeler sonucunda ciddi oranda azalmış GSH, GPx ve SOD(süperoksit dismutaz) miktarları tespit etmişlerdir (69). Ommati ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada kurşun ile hasar verdikleri sıçan testislerine karnozin tedavisi uygulamışlardır. Karnozin ile tedavi uygulanan grupta hasar grubuna göre anlamı oran yüksek glutatyon seviyeleri saptanmıştır(70). Biz de çalışmamızda karnozin uygulaması yapılan gruplarda siklofosfamid grubuna göre yüksek glutatyon ve düşük MDA seviyeleri tespit ettik.

Glutasyon superoksit radikaline karşı hücrel savunma sisteminin kilit bileşenidir. GSH seviyelerinin süperoksit radikali ile süperoksit kökenli diğer bileşenlerin yarattığı lipid peroksidasyon miktarıyla ters orantılı olduğu gösterilmiştir(83). Gruplar arasındaki glutasyon değerlerini karşılaştıracak olursak CP=K grubunda CP(hasar) grubuna göre anlamlı yüksek değerler saptanırken ($p=0.001$) diğer tedavi gruplarında anlamlı yüksek değerler saptanmadık ($p>0.05$). Karnozin siklofosfamid ile eş zamanlı verildiğinde diğer uygulama şekillerine göre daha fazla etkin olduğunu bulduk. Böylelikle karnozinin antioksidan koruyucu etkisi biyokimyasal olarak da desteklenmiş bulunmaktadır.

Siklofosfamid toksisitesiyle ilgili biyokimyasal ve histopatolojik olaylar çokça çalışılmış olmasına rağmen toksisiteyi önleyici etkili bir tedavi henüz bulunamamıştır (67). Çalışmamızda doğal bir antioksidan dipeptid olan karnozin kullanarak bu toksisiteyi hem önlemeyi hem de tedavi etmeyi planladık.

Fouad ve ark.(2007) çalışmalarında farelere tek doz i.p. 20 mg/kg sisplatin uygulamadan üç gün öncesinden başlayarak altı gün boyunca oral karnozin 10/mg/kg/gün dozda uygulamışlar ve renal toksisitenin azaldığını belirtmişlerdir(84). Noori ve ark. (2010) ratlarda yaptıkları çalışmalarında sisplatin uygulamasından beş gün öncesinden başlayarak on gün boyunca oral karnozin profilaktik tedavisi vererek böbrek hasarını değerlendirmişlerdir. Karnozinin nefrotoksisiteden koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir(85). Aydın ve ark. (2010) çalışmalarında yaşlı ratlardaki oksidatif karaciğer hasarının karnozin tedavisiyle azaldığını, MDA değerlerinin azatlığını SOD değerlerinin arttığını göstermişlerdir(86). Literatürde yapılan birçok çalışma karnozinin oksidatif hasara karşı hem koruyucu hem de tedavi edici etkinliği olduğu gösterilmiştir.

Karnozin plazmada bulunan karnozinaz enzimiyle saniyelerle ölçülecek kadar kısa sürede yıkılır. Karnozinin yarılanma ömrünü uzatacak bir bileşikle birlikte verilmesi siklofosfamid kemoterapisi öncesinde profilaktik tedavi olarak verilebilmesini sağlayabilir. Karnozinaz enzimini inhibe eden moleküllerin kullanımı da bu amaca hizmet edebilir. Ancak biz çalışmamızda tek başına kullandık ve siklofosfamidle eş zamanlı verilmesinin oksidatif hasardan koruyan antioksidan etkisinin diğer tedavi gruplarımızdan daha etkili olduğunu gördük. Literatürde daha önce siklofosfamidin testiste oluşturduğu toksik hasara karnozinin etkisi araştırılmamıştır. Sonraki çalışmalarda karnozinin etkisini uzatan yöntemlerle profilaktik tedaviye yönelik daha ileri çalışmalar yapılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda siklofosfamidin testiküler hasara yol açtığını histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak gösterdik. Siklofosfamidin oluşturduğu oksidatif stres sebebiyle testis spermatogenik hücrelerinde apoptoz ve testiküler dokuda hasar oluşturduğunu belirledik. Testis dokusunda oluşan bu hasarın doğal bir antioksidan olan karnozin kullanılarak azaltılabileceğini tespit ettik.

Literatürde siklofosfamid ile oluşturulan testiküler hasara karnozinin etkisini gösteren bir çalışma olmamaktadır. Karnozinin bu hasara karşı koruyucu ve önleyici etkisini ilk kez çalışmamızda hematoksilen-eozin, Masson-trikrom, PAS, aktif kaspaz-3 ve antiklaudin-5 boyamaları ve GSH, MDA biyokimyasal analizleriyle gösterdik.

Sonuç olarak siklofosfamid kemoterapisi alan kanser hastalarında fertilitenin korunması açısından karnozinin umut verici bir koruyucu ve önleyici tedavi olabileceğini gösterdik. Ancak bunun için destekleyen daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla birlikte tedavi öncesi ve sonrası spermiyumun yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi de elde edilen verileri güçlendirecektir.

7. **KAYNAKLAR**

1. Moore KL, Persaud TVN, Lond F. 1 Introduction to the Developing Human. 1998;323-341.
2. Sadler TW. Medical Embryology. 12th Ed. 2013;53(9):1689–99.
3. Ross M, Pawlina W. (Çeviri Baykal B.) Histoloji konu anlatımı ve atlas. 6. baskı. Palme yayıncılık; 2014;784-803.
4. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Güneş tıp kitabevleri; 2014. 330-333 .
5. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel anatomi. 9. baskı. ODTÜ yayıncılık; 2015. 291-293 .
6. Netter FH.(Çeviri Cumhur M.) İnsan anatomisi atlası. 6. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri; 2015.
7. Yıldırım M. Topografik Anatomi. 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri; 2016.
8. Paker Ş. Histoloji. 2. baskı. 1993.
9. Junqueira L.C., Carneiro J. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
10. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. Teknik yayıncılık; 1998.
11. Öztürk, F. Genel İnsan Embriyolojisi Ders Notları 2013; 1-6.
12. Kayaalp O. Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 13. baskı. Pelikan kitabevi; 2012.
13. Türker A, Dizdar Ö. Mised, meslek içi eğitim dergisi, Kemoterapötikler, 2005, 11-12.
14. Hadidi AHFA, Coulter CEA, Idle JR. Phenotypically Deficient Urinary Elimination of Carboxyphosphamide after Cyclophosphamide Administration to Cancer Patients. Cancer Res. 1988;48(18):5167–71.
15. Dooley JS, James CA, Rogers HJ, Stuart-Harris R. Biliary elimination of cyclophosphamide in man. Cancer Chemother Pharmacol . 1982;9(1):26–9.
16. Graham M, Riley RJ. Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. Pharmacol Ther. 1991;51(2):275–89.
17. Byrne J, Mulvihill JJ, Myers MH, Connelly RR. ve ark. Effects of treatment on fertility in long-term survivors of childhood or adolescent cancer. N Engl J Med 1987;317:1315–21.

18. Shamberger RC, Sherins RJ, Rosenberg SA. The effects of postoperative adjuvant chemotherapy and radiotherapy on testicular function in men undergoing treatment for soft tissue sarcoma. *Cancer* 1981;47:2368–74.
19. Lentz RD, Bergstein J, Steffes MW, Brown DR ve ark. Postpubertal evaluation of gonadal function following cyclophosphamide therapy before and during puberty. *J Pediatr* 1977;91:385–94.
20. Jaffe N, Sullivan MP, Ried H, Boren H ve ark. Male reproductive function in long term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 1988;16:241–7.
21. Shalet SM, Hann IM, Lendon M, Morris Jones PH ve ark. Testicular function after combination chemotherapy in childhood for acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dis Child* 1981;56:275–8.
22. Lendon M, Hann IM, Palmer MK, Shalet SM ve ark. Testicular histology after combination chemotherapy in childhood for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1978; 26:439–41.
23. Fairly KF, Barrie JV, Johnson W. Sterility and testicular atrophy related to cyclophosphamide therapy. *Lancet* 1972;11: 568–9.
24. Kumar R, Biggart JD, McEvoy J, McGeown MG. Cyclophosphamide and reproductive function. *Lancet* 1972;1:1212–4.
25. Buchanan JD, Fairley KF, Barrie JU. Return of spermatogenesis after stopping cyclophosphamide therapy. *Lancet* 1975; 26:156–7.
26. Watson AR, Rance CP, Bain J. Long term effects of cyclophosphamide on testicular function. *BMJ* 1985;291:1457–60.
27. Diplock, A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 1998;59:189-211.
28. Nawar, W.W. . Lipids. In “Food Chemistry”, O.R. Fennema (Ed), 1996: 225-319.
29. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol* 1980; 492:153-168.
30. Kehre J P, Smith J V. Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; 1994:25-62.
31. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 2004, 15(1-2); 91-96.

32. Knight, JA, Disease related to oxygen-derived free radicals. *Ann. Clin.Lab.Sci.*1995; 25:111-21.
33. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31:1287–1312.
34. Berk M., Dean O, Dodd S., Bush A. ve ark. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Science*,2008; 29, 346-351.
35. Wildburger, R., Mrakovcic L., Stroser M., Andrisic L. ve ark. Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence: Review Citation. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2009;29, 189193.
36. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M ve ark. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*: 160, 1-40, 2006.
37. White AC., Sousa AM., Blumberg J., Ryan HF. ve ark Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2006;38(7), 513-520.
38. John MC, Halliwell. B.G. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press, 1999; 1-29.
39. Sikka SC, Rajasekaran M , Hellstrom JG. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology* 2013; 16(4): 464.
40. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. In: fifth edit. Oxford: University Press.; 2015; 77–79.
41. Silva PFN. *Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm*. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine 2006; 25-26.
42. Cross J. The genetics of preeclampsia: a fetoplacental or maternal Problem Clinical genetics, 2003; 64(2): 96-103.
43. Burtis CA, *Textbook of Clinical Chemistry*. WB. Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia, 1999;1245-1301.
44. Gulewitch WS, Amiradzibi S. Uber das carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes. *Ber Deutsch Chem Ges* 2006;33: 1902–1903.
45. Vistoli G, Straniero V, Pedretti A, Fumagalli L ve ark. Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis. *Chirality* 2012;24: 566–576.

46. Hipkiss AR. Would carnosine or a carnivorous diet help suppress aging and associated pathologies? *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067(1):369–74.
47. Suyama M, Maruyama M. Identification of methylated beta-alanylhistidine in the muscles of snake and dolphin. *J Biochem* 1969;66: 405–407.
48. Ponist S, Slovak L, Fedorova T, Drafi F ve ark. Protective effects of carnosine and its derivative trolox-carnosine against inflammation and oxidative stress in experimental arthritis, carrageenan induced hind paw edema, chondrocytes under H₂O₂ injury and degradation of hyaluronan. *Carnosine: Physiological Effects and Research Insights.* 2016.
49. Sale C, Saunders B, Harris RC. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. *Amino Acids* 2010;39: 321–333,
50. Guney Y, Ozel Turkcü U, Hicsonmez A, Nalca Andrieu M ve ark. Carnosine may reduce lung injury caused by radiation therapy. *Med Hypotheses.* 2006;66(5):957–9.
51. Hipkiss AR. Glycation, ageing and carnosine: Are carnivorous diets beneficial? *Mech Ageing Dev.* 2005;126(10):1034–9.
52. Ponist S, Academy S, Pharmacology E. Protective effects of carnosine and its derivative trolox-carnosine against inflammation and oxidative stress in experiment. 2017; 308:23-26
53. Fu Q, Dai H, Hu W, Fan Y ve ark. Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2008;28: 307–316.
54. Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H ve ark. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2003; 474:261-267.
55. Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Vachova MM ve ark. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1999;19-1:45-56.
56. Klebanov GI, Teselkin Y, Babenkova IV, Popov IN ve ark. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *Biochem Mol Biol Int* 1997;43: 99–106.
57. Ko JK, Leung CC. Ginger extract and polaprezinc exert gastroprotective actions by anti-oxidant and growth factor modulating effects in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25: 1861–1868.

58. Hill TL, Blikslager AT. Effect of a zinc L-carnosine compound on acid-induced injury in canine gastric mucosa ex vivo. *Am J Vet Res* 2012;73: 659–663.
59. Fujii T, Takaoka M, Tsuruoka N, Kiso Y ve ark. Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28: 361–363.
60. Dobrotvorskaya I, Fedorova T, Dobrota D, Berezov T. Characteristics of oxidative stress in experimental rat brain ischemia aggravated by homocysteic acid. *Neurochem J* 2011;5: 42–46,.
61. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiol Rev* 2013;93(4):1803–45.
62. Ririe DG, Roberts PR, Shouse MN, Zaloga GP. Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 2000;16: 168–172,.
63. Aydin AF, Çoban J, Doğan-Ekici I, Uysal M. ve ark. Carnosine and vitamin E - a promising pair in the combat against testicular oxidative stress in aged rats. *Andrologia*. 2015;47(10):1131–8.
64. Perini P., Calabrese M., Rinald L., Gallo P. The safety of profile cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opin Drug Safety*, 2007; 6: 183-190.
65. Johnsen SG. Testicular biopsys score corecount-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and resuts in 335 hypogonadal males *Hormones* 1970;1(1):2-25.
66. Sisman AR, Kiray M et all. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: Nervegrowth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Hindawi Publishing Corporation* 2014; DOI:10.1155/2014/108106.
67. Ahmed LA, El-Maraghy SA, Rizk SM. Role of the KATP channel in the protective effect of nicorandil on cyclophosphamide-induced lung and testicular toxicity in rats. 2015;5:1–11.
68. Kim SH, Lee IC, Ko JW, Shin IS ve ark. Mechanism of protection by diallyl disulfide against cyclophosphamide-induced spermatotoxicity and oxidative stress in rats. *Mol Cell Toxicol*. 2016;12(3):301–12.
69. Mahmoud AM, Soilman HA, El-hameed A. Wheat germ oil attenuates cyclophosphamide induced testicular injury in rats. 2016;5(5):40–52.

70. Ommati MM, Jamshidzadeh A, Heidari R, Sun Z ve ark. Carnosine and Histidine Supplementation Blunt Lead-Induced Reproductive Toxicity through Antioxidative and Mitochondria-Dependent Mechanisms. *Biol Trace Elem Res.* 2018;1–12.
71. Torabi F, Malekzadeh Shafaroudi M, Rezaei N. Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. *Int J Reprod Biomed* (2017;15(7):403–12.
72. Doğru-abbasoğlu A, Koçak M. Carnosine prevents testicular oxidative stress and advanced glycation end product formation in D- - induced aged rats. 2018;(October 2017):1–9.
73. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clin Chim Acta.* 2006;367(1–2):114–9.
74. Centre IN. Council for Innovative Research Council for Innovative Research. 2016;11(January):3552–6.
75. Kamimura Y, Chiba H, Utsumi H, Gotoh T, Tobioka H, Sawada N. Barrier function of microvessels and roles of glial cell-line derived neurotrophic factor in the rat testis. *Med Electron Microsc.* 2002;35:139–45.
76. Qiao H, Dong L, Zhang X, Zhu C, Zhang X, Wang L, et al. Protective effect of luteolin in experimental ischemic stroke: Upregulated SOD1, CAT, Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression. *Neurochem Res.* 2012;37(9):2014–24.
77. Potnuri AG, Allakonda L, Lahkar M. Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomed Pharmacother .* 2018;101(February):174–80.
78. ALaqeel NK. Carnosine Treatment Attenuates Testicular Toxicity Induced by Arsenic in Rats. 2017;14(2).
79. Abbasoğlu L, Kalaz EB, Soluk-Tekke M, Olgaç V ve ark. Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatr Surg Int.* 2012;28(11):1125–31.
80. Naghshvar F, Abianeh SM, Ahmashrafi S, Hosseinimehr SJ. Chemoprotective effects of carnosine against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Cell Biochem Funct.* 2012;30(7):569–73.

81. Haeri SA, Rajabi H, Fazelipour S, Hosseinimehr SJ. Carnosine mitigates apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from gamma-radiation-induced injury in mice. *Andrologia*. 2014;46(9):1041–6.
82. Çeribaşı AO, Türk G, Sönmez M, Sakin F ve ark. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;107(3):730–6.
83. Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans*. 1983;11:793-794
84. Fouad A, Mohamed A, Wafaey G Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008;25: 292–297
85. Noori S, Mahboob T. Antioxidant effect of carnosine pretreatment on cisplatin-induced renal oxidative stress in rats *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2010; 25: 86-91
86. Aydın F ,Kuşukgergin C, Özdemirler G, Koçak N ve ark. The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats *Biogerontology* 2010; 11:103–109

8. EKLER

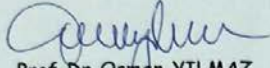
EK-1 Etik Kurul Onayı

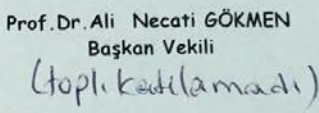
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

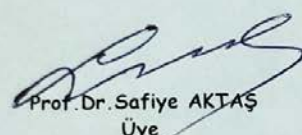
Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/05/2017 35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234
Toplantı Tarihi : 07 Mart 2017

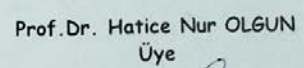
Sayın, Prof.Dr.Bekir Uğur ERGÜR
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

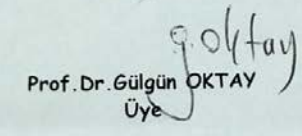
08/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sıçanlarda siklofosfamide bağlı olarak oluşturulan testis hasarında karnozinin etkisi" isimli; Başak Baykara, Umut Demirdelen, Müge Kiray'ın araştırmacı olduğu, 40 adet Wistar Albino suşu talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

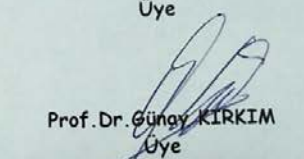

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

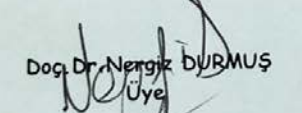

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili
(Topl. Katılmadı)

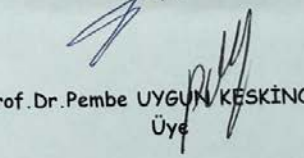

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

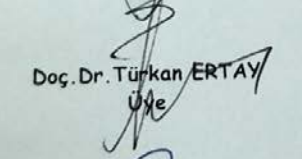

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

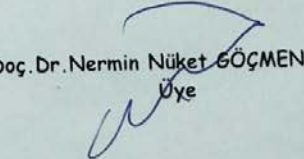

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

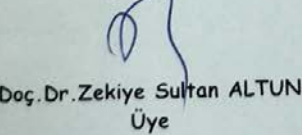

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye

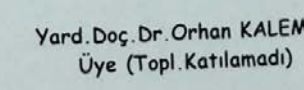

Doç.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye

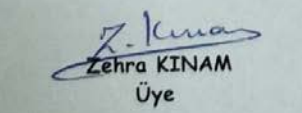

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

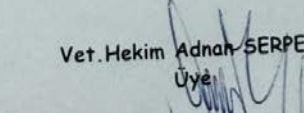

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye


Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye


Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye (Topl. Katılmadı)


Zehra KINAM
Üye


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

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

EK-2 Özgeçmiş

Tc Kimlik No: 18316146022

Doğum Tarihi: 16.03.1986

Yazışma Adresi: Korutürk mah. Murat sk. No 3 D1 Balçova/İzmir

Telefon: 536 6269733

E-posta: drumutdemirdelen@hotmail.com

Eğitim bilgileri:

Adana Fen Lisesi 2003

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp (ingilizce) 2009

İş Tecrübesi:

Fatih Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Ar. Gör. Dr. (Aralık 2009)

Gaziantep Arıl Sağlık Ocağı Pratisyen Hekim (Mayıs-Ağustos 2010)

İzmir Atatürk EAH Göz Hastalıkları 1.Kliniği Ar. Gör. Dr. (Ağustos 2010- Ekim 2013)

Çukurova Üniversitesi Göz Hastalıkları ABD Ar. Gör. Dr. (Ekim 2013- Ekim 2014)