



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN TESTİKÜLER
HASARDA SİLİMARİNİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. İSMAİL EYÜP DİLEK**

DÜZCE-2024



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİKLOFOSFAMİDLE İNDÜKLENEN TESTİKÜLER
HASARDA SİLİMARİNİN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. İSMAİL EYÜP DİLEK
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ YUSUF ŞENOĞLU
2.TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ DURSUN BABA**

DÜZCE-2024

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında bana yol gösteren, uzmanlık eğitimim süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyen bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan tez danışmanlarım ve değerli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Yusuf ŞENOĞLU'na ve Dr. Öğretim Üyesi Dursun BABA'ya

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Muhammet Ali KAYIKÇI'ya,

Klinik tecrübeleriyle yardımcı olan ve yegane desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Alpaslan YÜKSEL'e, Dr. Öğretim Üyesi Ekrem BAŞARAN'a, Dr. Öğretim Üyesi Arda Taşkın TAŞKIRAN'a, Dr. Öğretim Üyesi Ahmet Yıldırım BALIK'a,

Laboratuvar çalışmalarında ve örneklerimin saklanması konusunda bana yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ersin BEYAZÇİÇEK'e,

Histopatolojik çalışmalarda ve değerlendirmelerde yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Hakan SOYLU'ya

Birlikte eğitim aldığım, birlikte öğrendiğim, beraber iyi ve kötü günler geçirdiğimiz ama her zorluğu beraber atlattığımız asistan arkadaşlarım Dr. Necati EKİCİ'ye, Dr. Emre EDİZ'e, Dr. Burak AYVACIK'a, Dr. Mehmet Burak GÜRPINARLI'ya, Dr. Melih BALÇIN'a ve Dr. Ali İbrahim İZULA'ya

Asistanlık süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım tüm poliklinik, servis ve ameliyathane ekibine,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, maddi manevi beni sürekli destekleyen ve evlatları olmaktan gurur duyduğum aileme, ağabeyime ve kardeşime teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Giriş ve amaç: Deve diken (Silybum marianum) bitkisinden elde edilen bir flavanoid olan silimarin serbest oksijen radikallerinden koruyan kuvvetli bir antioksidan maddedir. İnsan ve hayvan modellerinde bu maddenin antioksidan, anti-enflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Siklofosfamid (CYP) alkilleyici ilaçlar grubunda yer alan, immünsüpresan ve kanser önleyici bir ilaçtır. CYP rejimleri alan erkeklerde testiküler atrofi, infertilite ve azospermi insidansının arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız ratlarda siklofosfamidle indüklenen testiküler hasar modelinde silimarinin testiküler dokuda koruyucu ve tedavi edici etkilerini biyokimyasal belirteçler ve histopatolojik sonuçlar açısından araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada toplam 47 Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Kontrol grubunda 5, diğer deney gruplarında her biri 7 adet olacak şekilde (1 kontrol ve 6 deney grubu) planlama yapıldı. Deneyde siklofosfamid tek doz intraperitoneal ve silimarin (SMN) günde 2 defa oral gavaj ile verildi. Denekler 14. günün sonunda sakrifiye edildi. Serum folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH), testosteron, total antioksidan kapasite (TAS), total oksidatif kapasite (TOS), malondialdehit (MDA) aktivitesi ölçümleri yapıldı. Sağ testis histopatolojik inceleme için, sol testis TAS, TOS, MDA aktivitesi ölçümü için kullanıldı. Histolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin, Gomori Trikrom boyama yapıldı. Johnsen skorlamasıyla testiküler hasar değerlendirildi.

Bulgular: Yapılan analiz sonuçlarına göre testis ağırlıkları, ağırlık indeksi ve hacimlerinde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Deneklerin ağırlık değişimlerine bakıldığında SMN koruyucu olarak verildiğinde kilo değişimini anlamlı ölçüde azalttığı ancak normal seviyeye çıkaramadığı görüldü. SMN' nin koruyucu ve tedavi edici olarak kullanımının oksidatif stres indeksini anlamlı düzeyde düşürdüğü izlendi. Serum ve doku MDA düzeylerinde anlamlı farklılık izlenmedi. Silimarinin hormonal dengeyi korumada etkin olduğu görülmüştür.

Sonuç: Çalışmamızda silimarin siklofosfamidin neden olduğu testiküler hasarda histopatolojik ve biyokimyasal iyileşme sağlamıştır. Ayrıca testiküler hasarı önlemede silimarinin tedavi edici etkisinin, koruyucu etkisine göre daha güçlü olduğu ve artan dozlarla iyileşme oranının da arttığı görülmüştür. Gelecekte

yapılacak randomize prospektif çalışmalar, silimarinin testis hasarında özellikle fertilitenin korunması ve tedavisi için kullanımı açısından yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Siklofosfamid, silimarin, testiküler hasar



ABSTRACT

Introduction and objective: Silymarin, a flavonoid derived from the plant milk thistle (*Silybum marianum*), is a potent antioxidant that protects against free oxygen radicals. Its antioxidant and anti-inflammatory effects have been demonstrated in both human and animal models. Cyclophosphamide (CYP), a member of the alkylating agents group, is an immunosuppressive and anticancer drug. It has been shown that men undergoing CYP regimens experience increased incidence of testicular atrophy, infertility, and azoospermia. The aim of this study is to investigate the protective and therapeutic effects of silymarin on testicular tissue in a cyclophosphamide-induced testicular damage model in rats, using biochemical markers and histopathological outcomes.

Materials and Methods: A total of 47 male Wistar-Albino rats were used in this study. The study was planned with one control group consisting of 5 rats and six experimental groups, each comprising 7 rats. Cyclophosphamide was administered as a single intraperitoneal dose, while silymarin (SMN) was given twice daily via oral gavage. At the end of day 14, the rats were sacrificed. Measurements included serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone, total antioxidant capacity (TAS), total oxidative capacity (TOS), and malondialdehyde (MDA) activity. The right testis was used for histopathological examination, while the left testis was used for TAS, TOS, and MDA activity measurements. For histological analysis, Hematoxylin-Eosin and Gomori Trichrome staining were performed. Testicular damage was evaluated using Johnsen's scoring system.

Results: According to the analysis results, no significant differences were observed between the groups in testicular weight, weight index, and volume. Regarding weight changes in the subjects, it was noted that silymarin (SMN), when administered as a protective agent, significantly reduced weight loss but did not restore it to normal levels. The use of SMN as both a protective and therapeutic agent was found to significantly reduce the oxidative stress index. No significant differences were observed in serum and tissue malondialdehyde (MDA) levels. Silymarin was shown to be effective in maintaining hormonal balance.

Conclusion: Our study demonstrated that silymarin provided histopathological and biochemical improvement in cyclophosphamide-induced testicular damage. Furthermore, the therapeutic effect of silymarin in preventing testicular damage was found to be more potent than its protective effect, with higher doses correlating with an increased rate of recovery. Future randomized prospective studies will be instrumental in guiding the use of silymarin for the prevention and treatment of testicular damage, particularly in preserving fertility..

Keywords: Cyclophosphamide, silymarin, testicular damage



İçindekiler

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
ŞEKİL DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ	viii
GRAFİK DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TESTİS	3
2.1.1. Testis Embriyolojisi	3
2.1.2. Testis Anatomisi ve Histolojisi	6
2.2. KANSER VE ANTİKANSER İLAÇLAR	11
2.2.1. Alkilleyici Ajanlar	12
2.3. SİLİMARİN	16
2.4. OKSİDATİF STRES	19
2.4.1. TAS, TOS ve OSI Oranı	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. ETİK KURUL KARARI	24
3.2. DENEY HAYVANLARI	24
3.3. DENEY TASARIMI	24
3.3.1. Deneyden elde edilen veriler	26
3.3.2. Deneyde Kullanılan Ölçüm Malzemeleri	27
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZ YÖNTEMİ	28
3.4.1. Serum ve Dokudan TOS, TAS ve OSI ölçümü	28
3.4.2. Serum ve Dokudan Malondialdehit (MDA) nmol/ml ölçümü	29
3.4.3. Hormonal Analizler	30
3.5. MORFOMETRİK VE HİSTOLOJİK ANALİZLER	30
3.5.1. Rutin Parafin Takibi	31
3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	32
3.5.3. Gomori-Trikrom Boyama Protokolü	32
3.5.4. Johnsen Skorum Protokolü	33
3.6. İSTATİSKSEL ANALİZ	33
4. BULGULAR	34

4.1. DENEK AĞIRLIKLARI	34
4.2. TESTİS AĞIRLIKLARI	36
4.3. TESTİS AĞIRLIK İNDEKSİ(TAİ)	36
4.4. TESTİS HACİMLERİ	37
4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	38
4.5.1. Serum TOS seviyeleri.....	38
4.5.2. Testis TOS seviyeleri.....	39
4.5.3. Serum TAS seviyeleri	40
4.5.4. Testis TAS seviyeleri	42
4.5.5. Serum OSI değerleri	44
4.5.6. Testis OSI değerleri.....	45
4.5.7. Serum MDA Seviyeleri.....	47
4.5.8. Testis MDA Seviyeleri.....	50
4.6. HORMONAL ANALİZLER	51
4.6.1. Serum LH seviyeleri	51
4.6.2. Serum FSH seviyeleri	52
4.6.3. Serum Total Testosteron seviyeleri.....	54
4.7. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	55
4.7.1. Johnsen Skorlamaları	60
5. TARTIŞMA.....	63
5.1. Araştırmanın sınırlılıkları	70
6.SONUÇ.....	70
7.KAYNAKÇA.....	71

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Testiküler gelişim evrelerinin	5
Şekil 2. Testiküler iniş ve gubernakulum	6
Şekil 3. Testis ve eklerinin anatomisi.....	7
Şekil 4. Kan testis bariyeri ve sertoli hücreleri bağlantıları	10
Şekil 5. Siklofosfamidin kimyasal yapısı ve metabolizması.....	15
Şekil 6. Devedikeni bitkisi	16
Şekil 7. Silimarin ana bileşenlerinin moleküler yapıları.....	18
Şekil 8. Silimarin farmakokinetiği	19
Şekil 9. Oksidatif denge ve etkileri	20
Şekil 10. Lipit peroksidasyonu ve metabolitleri.....	22
Şekil 11. Gruplar ve kafes düzenleri	26
Şekil 12. Silimarin çözeltisi ve ratın oral gavajla beslenmesi.....	26
Şekil 13. Ağırlık ve uzunluk ölçüm aletleri	28
Şekil 14. Silimarin ve enjeksiyona hazır siklofosfamid	28

Şekil 15. Tam kan ve santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri.....	30
Şekil 16. Platelere görünümü	30
Şekil 17. Orşiektomi materyali ve temizlenmiş testis dokuları	31
Şekil 18. Kontrol grubuna ait testisin normal histolojik görüntüleri	56
Şekil 19. CYP grubuna ait testisin histolojik görüntüleri.....	56
Şekil 20. SMN grubuna ait testisin normal histolojik görüntüsü	57
Şekil 21. SMN+CYP grubuna ait testisin histolojik görüntüsü	57
Şekil 22. 2xSMN+CYP grubuna ait testisin histolojik görüntüsü.....	58
Şekil 23. CYP+ SMN grubuna ait testisin histolojik görüntüsü	59
Şekil 24. CYP+ 2xSMN grubuna ait testisin histolojik görüntüsü.....	59

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Johnsen Skorum Protokolü.....	33
Tablo 2. Deney başlangıç günü ağırlıkları	34
Tablo 3. Deney 8. gün ağırlıkları.....	34
Tablo 4. Deney son günü ağırlıkları	35
Tablo 5. Deneyin son günü ve başlangıç günü ağırlık değişimi ortalamaları.....	35
Tablo 6. Testis ağırlıkları grup ortalamaları.....	36
Tablo 7. Testis ağırlık indeksi (TAİ) ve grup ortalamaları	37
Tablo 8. Testis hacimleri, grup ortalamaları.....	37
Tablo 9. Serum TOS seviyeleri grup ortalamaları	38
Tablo 10. Testis TOS seviyeleri grup ortalamaları	39
Tablo 11. Serum TAS seviyeleri grup ortalamaları	41
Tablo 12. Testis TAS seviyeleri grup ortalamaları	43
Tablo 13. Serum OSI değerleri grup ortalamaları	44
Tablo 14. Testis OSI değerleri grup ortalamaları	46
Tablo 15. Serum MDA seviyeleri grup ortalamaları	48
Tablo 16. Testis MDA seviyeleri grup ortalamaları	50
Tablo 17. Serum LH seviyeleri grup ortalamaları	51
Tablo 18. Serum FSH seviyeleri grup ortalamaları	53
Tablo 19. Serum Total Testosteron seviyeleri grup ortalamaları	54
Tablo 20. Johnsen skoru ölçümlerinin karşılaştırılması.....	60

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1. Serum TOS seviyeleri	39
Grafik 2. Testis TOS seviyeleri	40
Grafik 3. Serum TAS seviyeleri	42
Grafik 4. Testis TAS seviyeleri.....	43
Grafik 5. Serum OSI değerleri.....	45
Grafik 6. Testis OSI değerleri.....	47
Grafik 7. Serum MDA seviyeleri	49

Grafik 8. Testis MDA seviyeleri.....	50
Grafik 9.Serum LH seviyeleri	52
Grafik 10. Serum FSH seviyeleri	53
Grafik 11. Serum Total Testosteron seviyeleri)	55
Grafik 12. Johnsen skoru	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)

ALDO: Aldofosfamid

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

AMH: Anti Müllarian Hormonu

CH₂: Metilen (-CH₂)

CYP: Siklofosfamid

DÜBAP: Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü

FDA: United State Food and Drug Administration- Amerika Birleşik Devletleri
Gıda ve İlaç Dairesi

FSH: Folikül Stimulan Hormon

HNE: Hidroksinonenal

HPG: Hipotalamik-Pitüiter-Gonadal

insI3: İnsülin Benzeri Hormon-3

LH: Lüteinize Edici Hormon

LOOH: Lipid Hidroperoksitler

MDA: Malondialdehit

MTX: Metotreksatın

OH•: Hidroksil

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

PSK: Primer Cinsiyet Kordonuna

ROS: Reaktif Oksijen Radikalleri

SRY: Sex Determining Region Y

TAS: Total Antioksidan Seviye

TBA: Tiobarbitürik Asit

TOS: Total Oksidan Seviyesi



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Siklofosfamid (CYP) alkileyici ilaçlar grubunda yer alan, Non-hodgkin lenfomalar, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) gibi hematolojik malignitelerde, küçük hücreli akciğer kanserlerinde, over kanseri, meme kanseri ,çocukluk çağı neoplastik-non-neoplastik hastalıklarda, solid tümörlerde, otoimmün hastalıklarda ve çeşitli romatolojik hastalıklarında kullanılan immünsüpresan (bağışıklık baskılayıcı) ve anti kanser bir ilaçtır (1). CYP karaciğerde aktif metabolitlerine dönüşür. Bu metabolitler kan akımı yoluyla kanserli hücrelere ulaştırılır, Graham ve arkadaşları kanser ilaçlarının metabolizmasıyla ilgili yaptıkları çalışmalarda bu yollardan bahsetmektedirler (2). Sağlıklı ve kanserli hücrelerin DNA'sındaki negatif yüklü iyonlara bağlanır ve antineoplastik etkisi olan alkillenme işlemi gerçekleşir. Alkileyici ilaçlar ayrıca enzim ve proteinleri etkileyerek hücresel solunumu da bozarlar. Diğer doku ve sistemlerde çıkan yan etkiler bu mekanizma sonucunda ortaya çıkar (3–5). CYP'ye bağlı akut toksisite sitotoksik etkilerine bağlı ortaya çıkmaktadır. Alkileyici bir ajan olmasından dolayı hızlı çoğalan dokularda toksik etkileri daha fazla ortaya çıkar. Bu nedenle CYP alan hastalarda yaygın görülen toksisiteler bulantı, kusma, immünosupresyon , alopesi ve gonadal hasardır (6,7). 4 aylık tedaviden sonra sperm sayısının sıfıra düşebileceğini ve 6 ay veya daha uzun süre tedavi edilen tüm hastalarda azospermi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (8).

Silimarin (SMN) deve diken (Silybum marianum) bitkisinden elde edilen bir flavanoiddir. Silimarin hücrelerde hasara neden olan serbest oksijen radikallerinden koruyan kuvvetli bir antioksidan maddedir. Gerek insan gerekse hayvan modellerinde bu maddenin antioksidan, antienflamatuvar etkileri gösterilmiştir (9). Silimarin tedavisinin kadmiyum ve alkole bağlı testiküler toksisitede testis koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Semen kalitesi ve üreme fonksiyonlarıyla ilişkili hormonlar üzerindeki olumsuz etkiyi de azalttığı bildirilmiştir (10).

Yapılan literatür araştırmasında siklofosfamide bağlı testiküler hasar modellerinde testis koruyucu etkinliği olan farklı moleküller çalışılmış olup

silimarinin tedavici edici, koruyucu etkisini doz bağımlı inceleyen literatür verisine rastlanılmamıştır.

Bu çalışmadaki amacımız siklofosfamidle indüklenen testiküler hasarda silimarinin koruyucu ve tedavi edici etkisini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS

2.1.1. Testis Embriyolojisi

İnsan embriyosunda cinsiyet spermin taşıdığı cinsiyet kromozomuna (X veya Y) göre belirlenir. Döllenmeden 7 hafta sonra embriyodaki cinsiyete bağlı morfolojik değişimler başlar ve devam eder. Bu nedenle embriyonun ilk 7 haftasında cinsiyetler arasındaki farklılaşma henüz başlamadığı için bu döneme “farklanmamış dönem” ve gonadlara “farklanmamış gonad” denir (11,12).

Gonadlar üç kaynaktan gelişir. Bunlar posterior abdominal duvar mezoteli, altındaki mezenşimal doku ve primordiyal germ hücrelerdir. Gonadlardaki yapısal farklılaşma mezotel epitel ve mezenkimal dokunun bir araya gelip yoğunlaşarak gelişimin ortalama 5. haftasında oluşturdukları “genital ridge- genital kabartı” ile başlar. Yüzey epiteli parmaksı uzantılar şeklinde iç kısımdaki mezenkime uzanarak gonadal kordonları oluşturur. Gelişim bu aşamasında dış hücre tabakası korteksi, iç hücre tabakası medullayı oluşturur. Hücre genetiğinde XY kromozomu olması durumunda erkek gonadı olarak şekillenme devam eder. Bu yapısal şekillenme devamında medulla testiküler kordonu oluşturmak üzere gelişimine devam eder ve testisi oluşturur, korteks kısmı ise dejenere olur (11–13).

Primordial germ hücreleri 4. haftadan sonra yolk kesesinin endoderm hücre tabakasından ortaya çıkarlar. Son barsağın dorsal mezenterisi boyunca ilerler ve genital kabartılara 5. haftada ulaşır. 6. haftada mezenkimal tabaka içinde ilerleyerek primer cinsiyet kordonuna (PSK) katılırlar (11).

Cinsiyete bağlı doku ve sistemsel değişikliklerin olması birçok genin görev aldığı kompleks bir süreçtir. Ve bu süreç cinsiyet kromozomu da denilen, oositi dölleyen spermin X veya Y kromozomlarında hangisine sahip olduğuna göre belirlenir. Y kromozomuyla döllenmiş oositler XY cinsiyet kromozomuna sahip olurlar ve erkek fenotip olarak gelişmeye başlarlar. Bu gelişimde etkin olan gen bölgesi Y kromozomunun kısa kolunda bulunan “testis determining factor” ve bu bölgede yer alan “sex determining region Y (SRY)” genidir (14).

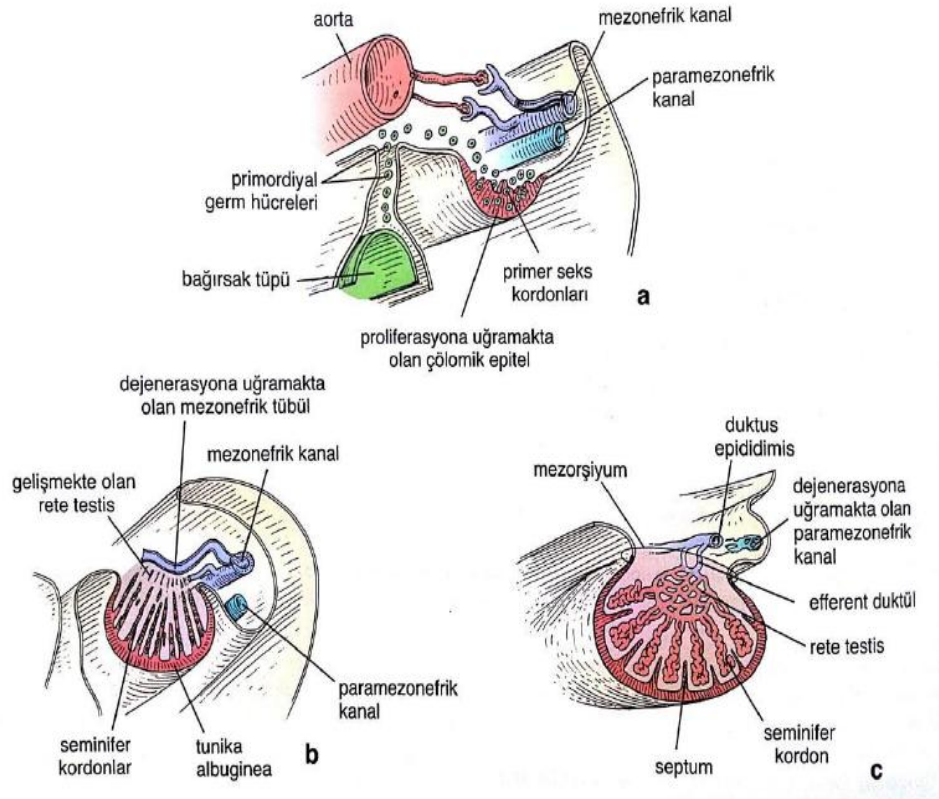
SRY geni erkek gelişimini sağlayacak yolaklarda aktivasyon yaparken dişi gelişiminden sorumlu yolaklarda inhibisyon yaparak erkek gonadal sistem gelişimi sağlar. Dişilerde Wingless-tipe MMTV integration site family 4 ekspresyonu inhibe edilir ve erkeklerde SRY-Box 9 ekspresyonu yapılarak bu sağlanır (14,15).

SRY geni etkisiyle PSK hücreleri testis olarak şekillenir. Bu genin etkisiyle gonodal kordonlar seminifer tübüllerin ilk formu olan primordiyal seminifer tübüllere dönüşür. Daha sonra primordiyal seminifer tübüllerden rete testis, tübülü rekti ve seminifer tübüller oluşur. Embriyolojik gelişimin yaklaşık 4. ayında at nalına benzeyen testiste tübüller puberteye kadar kapalı haldedir. Puberteyle birlikte lümen oluşumu başlar ve seminifer tübüller üreme hücresi taşınmasından sorumlu diğer kanallarla bağlantı kurmaya başlar.

Fetal testiste bulunan diğer bir hücre grubu sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri spermatik hücreleri destekleyen küp-prizma şekline sahip hücrelerdir. Aynı zamanda paramezonefrik kökenli olan müllerian kanal gelişimini inhibe eden anti müllerian hormonu (AMH) salgılar. Bu hormon puberteye kadar salgılanmaya devam eder (11,16).

Testiste yer alan başka bir hücre grubu ise leydig hücreleridir. Mezenkimal dokuda yer alır. Sekizinci haftadan sonra androjenik hormonların salgılanmasından sorumludur. Androjenik hormonlar ve AMH dış genitalyanın erkek cinsiyet yönünde farklılaşmasını sağlar (11,16).

Gonadal gelişimin son evresinde tek katlı mezotel yer alır. Mezotel tabakası yassı yüzey epitelinin farklılaşması sonucunda oluşur (11).



Şekil 1. Testiküler gelişim evrelerinin şematik gösterimi : a; 5 haftalık embriyodaki farklılaşmamış gonad evresi, b; primer seks kordonunun seminifer kordonuna farklılaşması, c ;testiküler gelişimin son evresi (17)

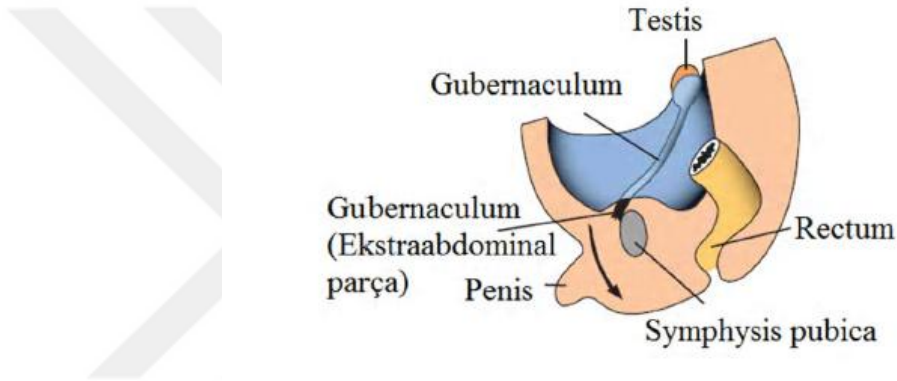
Testiküler iniş

Testis ve ekleri intrauterin çağın başında batında yer alırken doğuma yaklaştıkça skrotuma göç eder. Mezonefroz evresinde L3-L5 seviyesinde yer alır. Gelişimin ikinci ayında mezonefrozla birlikte testisler batin duvarının arka yaprağında yer alır. Mezonefroz geriledikten sonra bu yapı kaudal ligamant haline gelir. Bu yapıdan testisin inişinde öncü olarak kabul edilen gubernakulum oluşur. Gubernakulum testis inmeden önce eksternal-internal oblik kasları arasında yer alır. Testis inişi başladığında inguinal kanaldan geçerek skrotuma yerleşir ve testisin bu yollardan geçerek skrotuma inmesini sağlar (inguino-skrotal faz) (18).

Testis inişi kompleks yollar ve birden fazla faktörle yönetilmektedir. Testis göçünü açıklamaya çalışan ve etki eden faktörleri inceleyen çalışmalar mevcuttur. Batin içi organların büyümesi ve buna bağlı basınç artışının testis inmesinde sebep olabileceği ifade edilmiştir. Diğer bir faktör androjenik

hormonların gubernakulumu uyarması ve testis inişini indüklemesidir. İnsülin benzeri hormon-3 (insl3) , AMH ve androjenik hormonların etkisiyle kranial süspansör ligaman süprese olur ve gubernakulumun inguinokrotal fazi başlar (18). Bu faz direkt olarak androjenlerin etkisiyle , indirekt olarak da genitofemoral sinir ve salgıladığı calcitonin gene-related peptide ile yönetilir (18). Testis ve eklerinin inişi 32.-34. haftalar arasında tamamlanmış olur.

Testisler batin içinde çıktıkları yolculuğu inguino-skrotal faza geçtikten sonra skrotuma ulaşarak tamamlarlar (11).



Şekil 2. Testiküler iniş ve gubernakulum izlediği yolun şematik gösterimi (22)

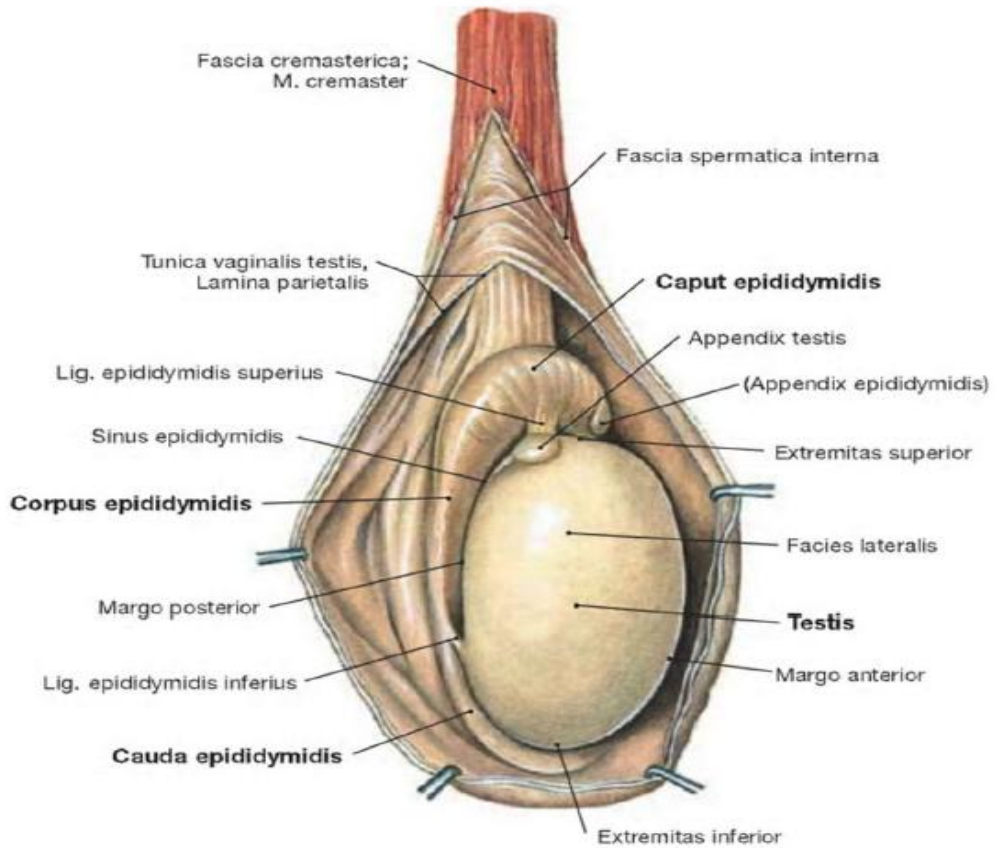
2.1.2. Testis Anatomisi ve Histolojisi

2.1.2.1. Testis Anatomisi

Testisler ve ekleri erkek üreme hücreleri üretimi ve iletiminden sorumlu olup testisler, iletim organları ve yardımcı bezler olmak üzere üç kısma ayrılmaktadır. İletim organları seminifer tübüller, tübüli rekti, rete testis, epididimis, vaz deferens ve ejakülator duktus olarak sıralanabilir. Semene sıvı veren bez ve organları seminal vezikül, prostat ve bulboüretral bezler yardımcı üreme bezleri olarak sayılabilir.

Erişkin erkek bireyin testisleri ortalama 4x3x2.5 cm boyutlarında, 20-25 cc hacmindedir. 10-15 gram ağırlığındadır ve oval şekliyle fasulyeyi andırır. Testisin anatomik olarak lateral-medial yüzleri, anterior-posterior kenarları ve süperior-inferior uçları mevcuttur. Sağlıklı bir erkekte skrotumda çift olarak bulunur. Sol testis sağa kıyasla yaklaşık 1 cm aşağıda yer alır. Erkek üreme hücrelerinin üretimi ve gonadal hormonların üretiminden sorumludurlar. Sağlıklı bir gonadal hücre ve hormon üretimi olabilmesi için testis sıcaklığının 34-35 Celcius arasında olması gerekmektedir. Skrotumun fibromuskuler katları sayesinde bu ayarlamalar yapılmaktadır.

Testislerin süperior ucunda appendiks testis denen yapı mevcuttur. Posterior kenarında epididimis yer alır. Epididimis medialinde funikulus spermaticus yer alır. Testisin postero-lateral kısmını periton kaplar, medial kısmını periton kaplamamaktadır. Peritonun visseral yaprağı ise testisin diğer kenar ve yüzlerini



Şekil 3. Testis ve eklerinin anatomisi (23)

kaplar. Peritonsuz olan medial kısma ise epididimis tutunur, damar, sinir ve vas deferens de buradan geçmektedir.

Testis skrotumda birden fazla tabakayla sarmalanmış halde bulunur. Bu katlardan bir tanesi tunika vaginalistir. Tunika vaginalisin paryetal ve visseral olmak üzere iki katmanı bulunur. Paryetal katmanı skrotumun iç yüzünü döşer, visseral katman ise testisi sarar. İki katman arasında testisin su içinde yüzmesini ve rahat hareket etmesini sağlayan sıvı bulunur.

Testisler beyaz renkli, kalın duvarlı tunika albuginea denilen kapsülle sarılmıştır. Kapsül testisin posterior kenarından içeri girerek mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis vasküler yapıları, rete testisi aynı zamanda testisi çok sayıda küçük lobçuklara bölen uzantıları içerir. Bu lobçukların sayısı 250-300 arasında değişmektedir. Lobçukların içinde 1-4 arasında sayıya ulaşan seminifer tübülleri mevcuttur. Seminifer tübüllerin arasında gevşek bağ dokusundan oluşan interstisyel doku vardır. Leydig hücreleri bu bağ dokuda bulunur ve testosteron hormonu üretiminden sorumludur. Seminifer tübülleri testisin posterior kenarına doğru uzanarak düz tübül haline gelirler. Mediastinum testiste düz tübülleri tübülü rekti ve devamında rete testisi oluştururlar (24). Seminifer tübüllerde sperm hücreleri üretilir. Daha sonra tübülü rekti ve rete testise geçen spermier ductus efferensten geçer ve epididimise ulaşır.

Testislerin vasküler dolaşımı v.testicularis ve a.testicularisten sağlanır. A.testicularis abdominal aortadan köken alır. Sol v.testicularis sol v.renalis, sağ v.testicularis ise v.cava inferiora açılır. Testislerin posteriorundan çıkan küçük venler birleşerek spermatik kordu ağ gibi saran plexus pampiniformisi oluşturur. Testisin lenfatik dolaşımı spermatik kordla beraber batına girerek nod.aortici laterales ve nod.preaorticiye dökülür.

Testis inervasyonu pelvik ve inferior mezenterik plexustan köken alan inferior spermatik sinirler ve superior spermatik sinirler tarafından sağlanır (25).

2.1.2.2. Testis Histolojisi

Testis erbezi olarak da anılan egzokrin ve endokrin salgı görevleri olan bir bezdir. Testisleri çepeçevre saran üç katmanla korunmaktadır. Bu katmanlar tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskülozadır. Leydig hücreleri tarafından endokrin salgı olan testosteron salgılanır. Egzokrin salgısı ise üremeden sorumlu olan seminifer tübülerden atılan spermiumlardır.

Tunika vaginalis testiküler migrasyonda sürüklenen periton yapraklarıdır. Visseral ve paryetal iki katmandan oluşur. Bu katmanlar mezotelyum epiteli ile döşenmiştir.

Tunika albuginea testisin posterior kenarından içeri girerek mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis vasküler yapıları, rete testisi aynı zamanda testisi çok sayıda küçük lob-lobçuklara bölen uzantıları içerir. Beyaz, fibroelastik dokudan oluşmaktadır.

Tunika vazküloza gevşek bağ dokusu yapısındadır ve vasküler yapılardan zengindir.

Seminifer tübülün uzunluğu 30 -80 cm, çapı 150-250 mikron ölçülerindedir. Tübüller oldukça kıvrımlıdır ve kör bir ucla başlarlar. Seminifer tübüller testisin posterior kenarına doğru uzanarak düz tübül haline gelirler. Mediastinum testiste düz tübüller tübülü rekti ve devamında rete testisi oluştururlar (24). Seminifer tübüllerde sperm hücreleri üretilir. Daha sonra tübülü rekti ve rete testise geçen spermler ductus efferensten geçer ve epididimise ulaşır. Seminifer tübüller çok katlı epitelden oluşur ve tunika propria ile sarılmıştır. Çok katlı epitel sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerden oluşur. Sertoli hücreleri puberteye kadar oransal olarak daha yoğundur, puberteyle beraber çoğalmaları durur. Puberteden sonra spermatogenik hücreler artar ve oransal olarak yoğunlaşır.

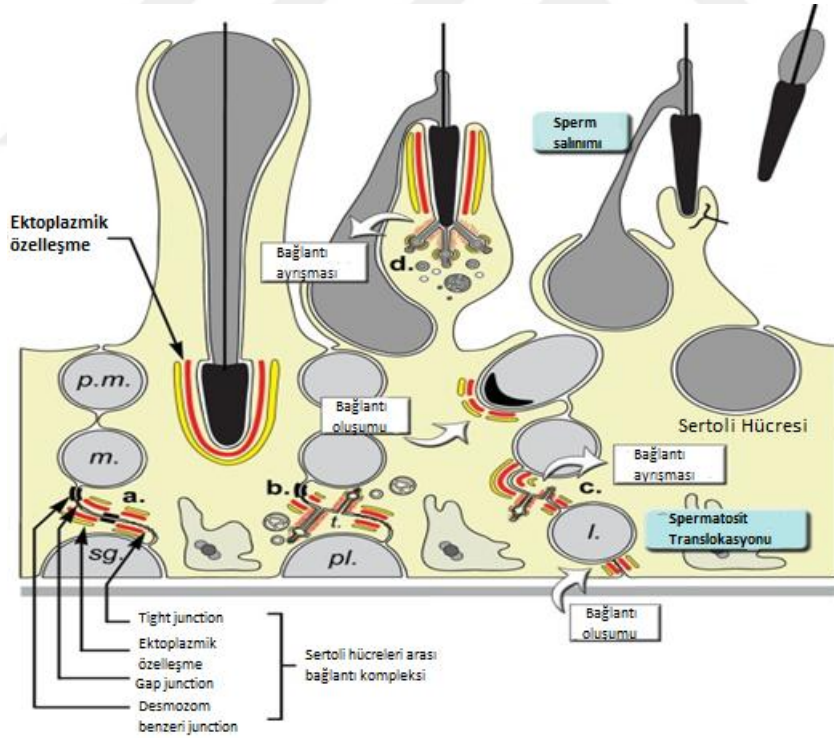
2.1.2.2.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri destekleyen, prizmatik yapılı ve apikal-lateral uzantıları bulunan hücrelerdir. Sertoli hücreleri puberteye kadar oransal olarak daha yoğundur, puberteyle beraber çoğalmaları durur. Yakın komşulukları bulunan spermatogenik hücreleri destekler. Beslenme ve korunmasına yardımcı olurlar. Sertoli hücrelerinin birbiri arasında sıkı bağlantı kompleksleri bulunmaktadır. Bu bağlantılar sayesinde kan-testis bariyeri oluşmaktadır (Şekil 4) (26).

Sertoli hücrelerinin destek işlevlerinden birisi de sperm taşınmasını sağlayan sıvı salgılamalarıdır. Aynı zamanda fagositoz işlevleri de vardır. Sperm sitoplazmasının artık kısımlarını, anormal gelişimli, genetik ve hücresel defektli spermiumları fagosit ederler.

Sertoli hücrelerinin hormonal ve salgısal görevleri de vardır. Salgı yönetimi endokrin ve parakrin faktörlerden oluşan karmaşık bir ağ ve testiküler-jukstakrin çapraz iletişimlerle sağlanır. Bu iletişimde folikül stimülan hormon (FSH) endokrinal, testosteron ise parakrin etkiden sorumlu olan ana hormondur. Bu iletişimlerin sonucunda androjen bağlayan protein, inhibin-alfa, inhibin-beta , doku tipi plazminojen aktivatörü, epidermal büyüme faktörü benzeri protein-8, plakoglobin, haptoglobin ve transferrin sertoli hücreleri tarafından salınmaktadır (27). Aynı zamanda erkekte müllerin kanal gelişimini önleyen AMH salgılanmasından da sorumludur.

Spermatogenik hücreler spermatogenez sürecinde farklılaşmayla eş zamanlı olarak tübül lümenine doğru ilerlerler. Bu ilerleme ve farklılaşma sürecinde sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasında devamlı bağlantı vardır. Bu bağlantılar desmozom ve aktin benzeri bağlantılardır. Bağlantıların sağlanamaması , ilerleme sürecinde yarıda kalması durumunda olgunlaşmamış germ hücreleri lümene atılır ve infertilite ortaya çıkabilir (26,28).



Şekil 4. Kan testis bariyeri ve sertoli hücreleri bağlantıları (26)

2.1.2.2.2. Spermatogenik Hücreler

Sperm hücrelerini oluşturan öncü hücrelere spermatogenik hücreler denir. Spermatogenik hücreler kümelenmiş ve 4-8 adet hücreden oluşur. Spermatogenik hücrelerden olgun bir sperm oluşumuna kadar geçen süreç spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatogenez spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı (spermiyogenez) olarak üç aşamaya ayrılabilir. Bu süreç puberte öncesinde başlar ve ömür boyu devam eder. Endokrin ve parakrin etkiyle yönetilir ve spermatogonyumun bölünme süresiyle beraber yaklaşık 74 gündür (29).

2.1.2.2.3. İnterstisyel Bağ Doku

Testiste seminifer tübüllerin çevre dokusunu oluşturan interstisyel bağ dokuda kollajen fiberler, peritübüler-miyoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreler) ve leydig hücreleri bulunmaktadır.

Peritübüler dokuda fibroblast bulunmaz bunun yerine kollajen sentezinden sorumlu hücreler peritübüler miyoid hücrelerdir. Miyoid hücrelerin histoloji preparatlarındaki bol granüllü endoplazmik retikulumdan zengin görünümü buna kanıt olarak gösterilebilir. Miyoid hücrelerin ritmik kasılması aktin flamanlar sayesinde gerçekleşmektedir. Sperm hücrelerinin epididimise ulaşana kadarki süreçteki hareketi bu peristaltik harekete bağlıdır.

Leydig hücrelerinin diğer bir ismi interstisyel hücredir. Leydig hücrelerinin parakrin ve otokrin işlevleri vardır. Gebelikte plasentadan salınan human koryonik gonadotropinler leydig hücrelerini uyarak gerekli testosteronun salgılanmasını sağlar. Gebeliğin 12. haftasında aktivitesi giderek azalır. Puberteyle beraber hipofizden salgılanan lüteinize edici hormon (LH) sayesinde yeniden androjen sentezine başlar.

2.2. KANSER VE ANTİKANSER İLAÇLAR

Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) paylaştığı son verilere göre tüm yılda tahmini olarak 20 milyon (mn) yeni kanser

vakası ve kansere bağlı 9.7 mn ölüm meydana geldi. Hastaların kanser teşhisini takip eden 5 yıl içinde hayatta kalan hasta sayısı 53.5 mn olarak belirlenmiştir. Antikanser ilaçların ve çok ajanlı kombinasyonların kullanılmasıyla beraber 5 yıllık yaşam beklentisi artmaktadır. Antikanser ilaçların hedefleri yüksek bölünme ve metabolik hıza sahip olan tümör hücrelerine etki ederek bölünmeyi durdurmaktır. Bununla beraber sitotoksik özelliklerinden ötürü kanser hücrelerinin yanından bölünme-çoğalma özellikleri yüksek olan hücrelerde de harabiyet oluşturmakta ve buna bağlı toksik özellikler ortaya çıkmaktadır.

Antikanser (kemoteröpotik) ilaçlar hücreye etki ettiği yerlere, enzimatik yollara, mekanizmaya ve etki kinetiğine göre sınıflandırılmaktadır. Kemoteröpotik ilaçların etki mekanizmasının ve tümör hücrelerine hangi aşamada etki edeceğinin bilinmesi kanser spesifik tedavi protokollerinin oluşturulmasında büyük öneme sahiptir. Somatik hücreler yaşam döngüsü (hücre siklusu) G1,G2,S,M olmak üzere 4 faza ayrılır. Kemoteröpotikler de siklus bağımlı (siklusun tüm aşamalarına etki eder) ve faz bağımlı olmak üzere (siklusun belli bir fazına etki eden) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (31).

Kemoteröpotikler kimyasal orijinleri ve etki mekanizmalarına göre 6 kategoride sınıflanabilir. Bunlar;

- 1-Alkilleyici ajanlar
- 2-Bitkisel Alkaloidler
- 3-Antimetabolitler
- 4-Antitümör antibiyotikler
- 5-Hormonlar ve hormon antagonistleri
- 6-Diğer ilaçlar

2.2.1. Alkilleyici Ajanlar

Antikanser etkisi olan sitotoksiteyi hücrelerde yer alan nükleik asitlere kovalent bağlanarak gerçekleştirirler. Bir ön ilaç olarak vücuda girerler ve hücre içerisinde etilenimonyum ve karbonyum türevlerine dönüşürler. Hücredeki son ürün hali olan karbonyum türevleri DNA'nın negatif yüklü organik gruplarına

irreversible olarak bağlanır. Böylece hedeflenen antikanser etki ortaya çıkar ve alkillenme gerçekleşmiş olur (31).

Alkillenmenin sonucunda DNA transkripsiyonu ve replikasyonunda bozulmalar gerçekleşir. Aynı zamanda enzim ve proteinleri de etkileyerek hücresel solunumu da bozmaktadır. Alkillenme işlemi çoğunlukla guanin nükleik asitinin 7. azot atomu üzerinden olur. Bunun sonucunda DNA da birkaç mekanizmayla dejenerasyonlar ortaya çıkar. Bu işlem sonrasında hatalı baz eşleşmesi olur ve guanin, sitozin yerine adenin ile eşleşir. İmidazol halkası bozulan guanin halkasında parçalanma olur ve DNA yapısından kırılmalara yol açabilir. DNA zincirindeki alkillenmiş nükleik asitler birbirleri arasında beklenmedik eşleşmeler kurarak DNA'nın zincir yapısında bozulmalara yol açabilir(31,32).

Alkilleyici ilaçlar lenfoid doku ve kemik iliğinde süpresyon yapar, bu etkilerini tek dozda dahi göstermektedir. Bu etkilerin ortaya çıkma ve devam etme süresi seçilen alkilleyici ajana göre değişkenlik gösterir. Bu etkilere bağlı kan parametrelerinde değişim ve immünsüpresyon ortaya çıkar.

Alkilleyici ajanların ortak yan etkisi kemik iliği supresyonudur. Uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak infertilite ve lösemi ortaya çıkabilmektedir. Gastrointestinal etkilerine bağlı lümen mukozalarında ülserasyona kadar gidebilen yan etkiler ortaya çıkabilir. Bulantı, kusma, iştahta azalma gibi şikayetler ortaya çıkabilmektedir(33).

Kemoteropötik ajanlardan gonadal toksisitesi en çok ön plana çıkan grup alkilleyici ajanlardır. Alkilleyici ajanların içinde en yüksek gonadotoksik yan etkiye sahip olan ise siklofosfamiddir.

2.2.1.1. Siklofosfamid

Siklofosfamid (CYP) alkilleyici ajanlar kategorisinde yer alan antikanser bir ilaçtır. Kokusuz, beyaz renkli kristal yapıda toz olarak sentezlenmektedir. Siklofosfamid monohidratın moleküler formülü $C_7H_{15}Cl_{12}N_2O_2P.H_2O$ şeklindedir ve azotlu hardal gurubunda yer almaktadır. Malignansiler için farklı rejim protokolleri olmakla beraber 100-200 mg oral veya 3-4 haftada bir 600-1000

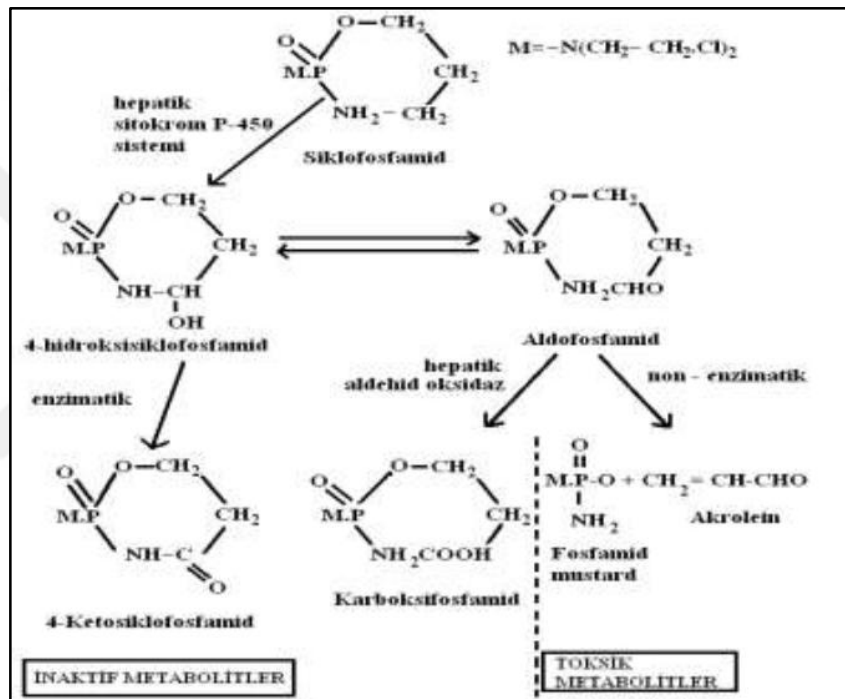
m2/kg dozda intravenöz olarak verilmektedir. Maksimum plazma konsantrasyonuna 1 saatte ulaşır. CYP karaciğerde aktif metabolitleri olan aldofosfamid (ALDO), fosfamid hardalına (4-hidroksisiklofosfamid) dönüşür ve hücrel sitotoksiteden bu metabolit sorumludur (Şekil 5). İlacın yaklaşık %10 'u değişmeden idrarla atılır. Eliminasyon yarı ömrü 5-8 saat arasındadır. Normal böbrek ve hepatik fonksiyona sahip hastalarda eliminasyonu yaklaşık 5,4 l/saat hızla gerçekleşir (3,34,35).

Farklı doz ve rejimlerde çeşitli endikasyonlarda kullanım alanı bulmuştur. Kanser tedavisinde ilk klinik denemeleri 1958'de yapılmış ve 1959'da FDA (United State Food and Drug Administration) tarafından antikanser ilaç olarak onaylanmıştır. Non-hodgkin lenfomalar, ALL gibi hematolojik malignitelerde, küçük hücreli akciğer kanserlerinde, over kanseri, meme kanseri, çocukluk çağı neoplastik-non-neoplastik hastalıklarda, solid tümörlerde antikanser özelliklerinden dolayı kullanım alanı bulmuştur. İmmünsüpresan etkilerinden dolayı otoimmün hastalıklarda ve çeşitli romatolojik hastalıklarda da kullanılmaktadır (1).

Fosfamid hardalının etkisiyle kanser hücreleri ölürken aynı zamanda bir dezavantaj olarak sağlam hücrelerde de toksisite meydana gelir. Bu toksisiteden fosforamidle beraber akrolein denen başka bir metabolitte sorumludur. Fosforamid DNA'nın alkilenmesine yol açarak DNA'da kırık ve diğer mekanizmalarla hücre ölümüne sebep olur. Akrolein ise DNA tamir proteinlerine etki ederek toksisiteye neden olur ve etkisi apoptoz, nekroz gibi yollar üzerinden ortaya çıkar(3,34,35).

Yan etkilerine bakıldığı zaman alkilleyici ajanların ortak yan etkisi olan kemik iliği supresyonu, gastrointestinal etkilerine bağlı lümen mukozalarında ülserasyona kadar gidebilen yan etkiler, bulantı, kusma, iştahsızlık gibi şikayetler ortaya çıkabilmektedir. Aynı zamanda üriner sisteme spesifik yan etkisi olarak hemorajik sistit ortaya çıkabilmektedir. Uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak infertilite ve lösemi ortaya çıkabilmektedir. 4 aylık CYP tedavisinden sonra sperm sayısının sıfıra düşebileceğini ve 6 ay veya daha uzun süre tedavi edilen tüm hastalarda azospermi olduğunu gösterilen çalışmalar mevcuttur (8). Deney

hayvanlarında yapılan çalışmalarda CYP kullanımına bağlı sperm parametrelerinde bozulma, serum testosteron ,LH düzeylerinde düşme ve FSH düzeylerinde artma saptanmıştır(36,37). Testisin morfolojik ölçümlerinde testis ağırlıklarında azalmaya yol açtığı bildirilmektedir. Yine bu deneysel çalışmalarda testis dokularının histolojik incelemelerinde spermatogenezde arrest ve mikroçevre -bağ dokuda değişimler olduğu saptanmıştır. Seminifer tübül epitelinde dejenarasyon, spermatogenezde arrest, germinal epitelde ayrışma, lümene dökülme, tübül epitelinde vakuolizasyon , interstisyel aralıkta hemoraji gibi değişimler ışık mikroskopisinde görülen değişiklikler olarak sıralanabilir (38).



Şekil 5. Siklofosfamidin kimyasal yapısı ve metabolizması

Siklofosfamide bağlı infertilite gelişiminde DNA alkilenmesi, oksidatif strese artış ve bunların etkisiyle ortaya çıkan inflamasyon ve nekrotik süreç etkilidir. İnfertiliteyi engellemeye yönelik daha önce birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda CYP'in oksidatif hasarını önlemeye yönelik olarak antioksidan maddeler denenmiştir. Bazı antioksidan maddelerin CYP' ye bağlı infertiliteyi önlemede yardımcı olabileceği gösterilmiştir (39–42).

2.3. SİLİMARİN

Asteraceae familyasının bir üyesi olan süt devedikeni “*Silybum marianum*” ülkemizde yaygın bir şekilde kullanılmakta ve yöresel olarak devedikeni veya kenger otu olarak da anılmaktadır ( ekil 6.). Deve dikenini ve meyveleri 2000 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır(43). Bitkinin yaprakları ve diğer tedavi edici etkileri içeriğindeki silimarin, flavonolignans silydianin, silychristinin izometrik karışımlarından gelmektedir (43). Bu izometrik karışımın A ve B olmak üzere iki diastereoizomerik formda bulunmaktadır. Bu formlar silybin A -B ve izosilybin A-B olmak üzere 4 formda bulunmaktadır. Bu bileşiklerin moleküler biyosentezi peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Fenilpropanoid koniferil alkol ve flavonoid taksifolin arasındaki oksidatif bağlanma ile gerçekleşir(43).



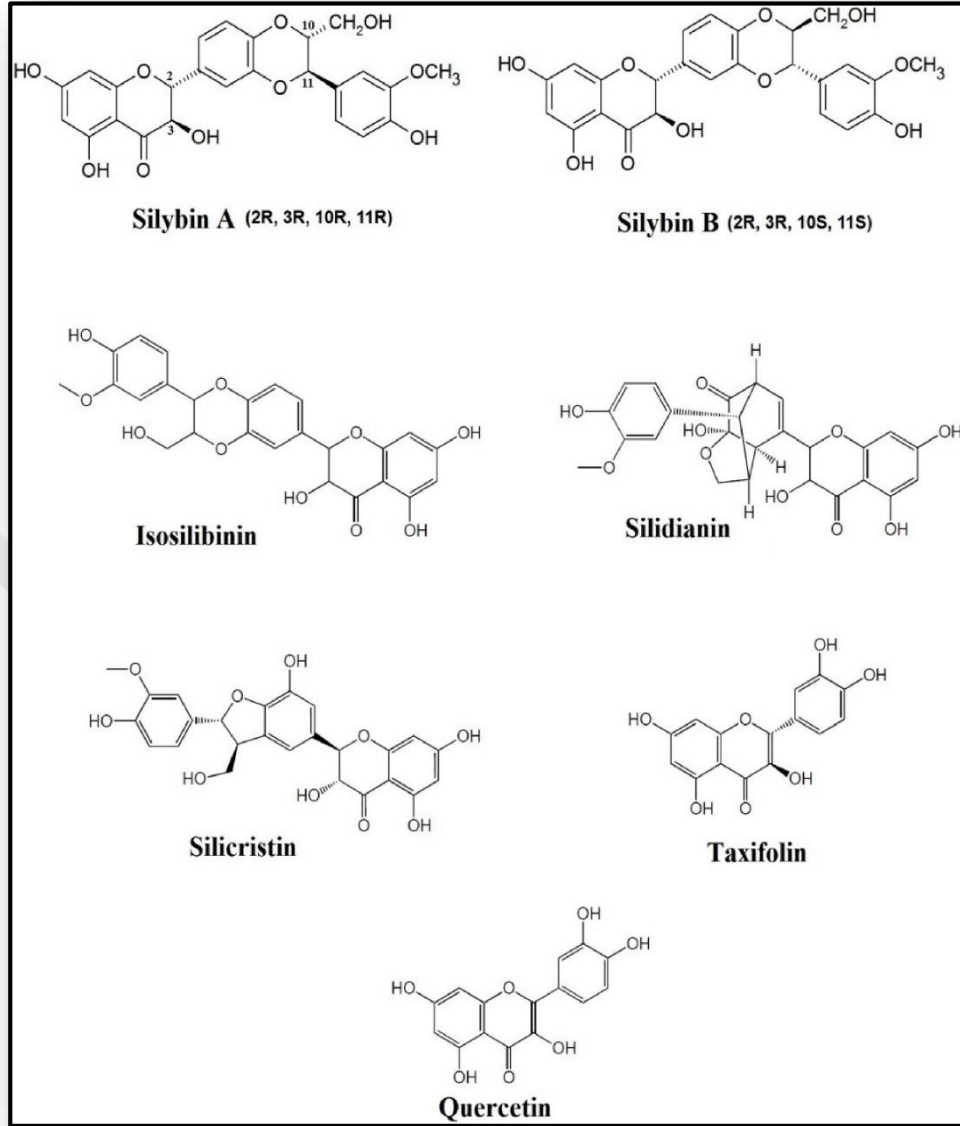
Şekil 6. Devedikeni bitkisi

Devedikeni meyvelerindeki silimarin içeriği devedikeni çeşidine, yeti ti i coğrafya ve iklim koşullarına bağlıdır. Silimarin geleneksel olarak karaciğer hastalıklarında kullanılmıştır. Yapılan  alı malar in-vivo ve in-vitro ortamlarda silimarinin protein sentezini arttırdığı, hücre yenilenmesini uyardığı ve antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak toksik karaciğer

hastalıklarının tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır (43,44). Silimarinin kimyasal olarak indüklenen hücresel karsinogenezi engellediği, antidiyabetik, antienflamatuvar, hipolipidemik ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (45–48).

Silimarinin farklı kimyasallara bağlı gelişen infertilite , over toksisitesi ve testiküler hasarı koruyabileceği gösterilmiştir (49,50). Sisplatin, doksorubisin , metotreksat, streptozotocin, alkol ve kadmiyumla indüklenen testiküler hasarlarda koruyucu rolü olabileceği gösterilmiştir(10,51–53).

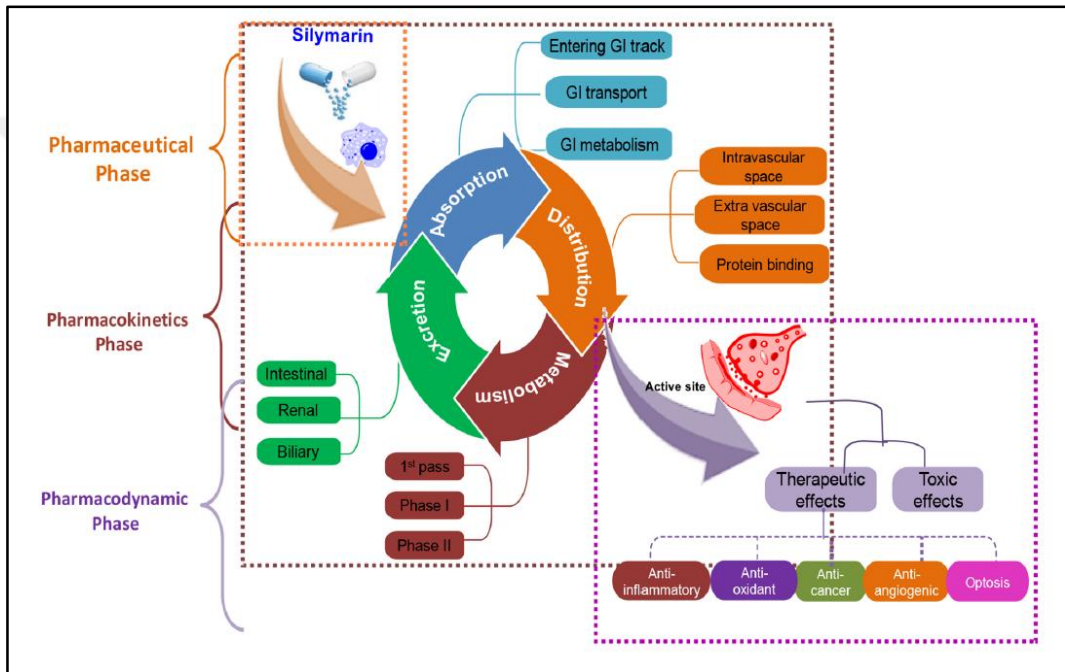
Silimarinin ve diğer polifenollerin antioksidan aktivitesinin vücut savunma sistemine doğrudan katkısı olduğu gösterilmemekle beraber antioksidan aktivitenin indüklenmesini sağlayarak etki ettiği düşünülmektedir. Bu konuda sınırlı çalışmalar mevcuttur. Nrf2 ve NF- κ B ve ilgili gen ve proteinlerinin etkisiyle antioksidan ve antikanser etkilerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (54). Aynı zamanda EGFR-MAPK/ERK1/2 sinyal yollarında inhibisyon , Rb ve E2F proteinleri aktivasyonu ve IGF-reseptör sinyal yollarında değişikliklerden de sorumludur (55).



Şekil 7. Silimarín ana bileşenlerinin moleküler yapıları (56):

Silimarín ve bileşenlerinin suda çözünürlüğü azdır ve bu nedenle ağızdan alınan toz eksrat formlarının 30 dk sonra kan serum düzeyinde 20 ng/mL kadar artış sağlayabildiği gösterilmiştir. Silibinin bir haftaya kadar günde 1.44 grama kadar güvenli olarak oral yolla alınabilir(57). Dolaşımda serumda yer alan silimarinin en aktif bileşeni silibininidir ve kanda konjuge silibin olarak taşınır (58). Silibinin böbreklerde idrardan geri emilimi toplam dozun %3 'ten azını oluşturmaktadır (59).

Silimarinin içindeki baskın molekül silibinindir ve vücuttaki farmakokinetik olarak emilimin Faz 1 ve 2 de olduğu kolayca metabolize olduğu gösterilmiştir. Faz 2 de konjugasyon gerçekleşir, idrar ve safra ile elimine edilir. Silibinin renal atılımı minimal düzeydedir ve oral dozajın 24 saatteki itrahının %1-2'lik kısmına katkıda bulunur. Safra konsantrasyonu dolaşımdaki konsantrasyonun 100 katına yakındır ve safradan atılım gerçekleşir(60). Diğer flavonoidler gibi entero-hepatik bir farmakokinetik tutulum sergiler (Şekil 8).



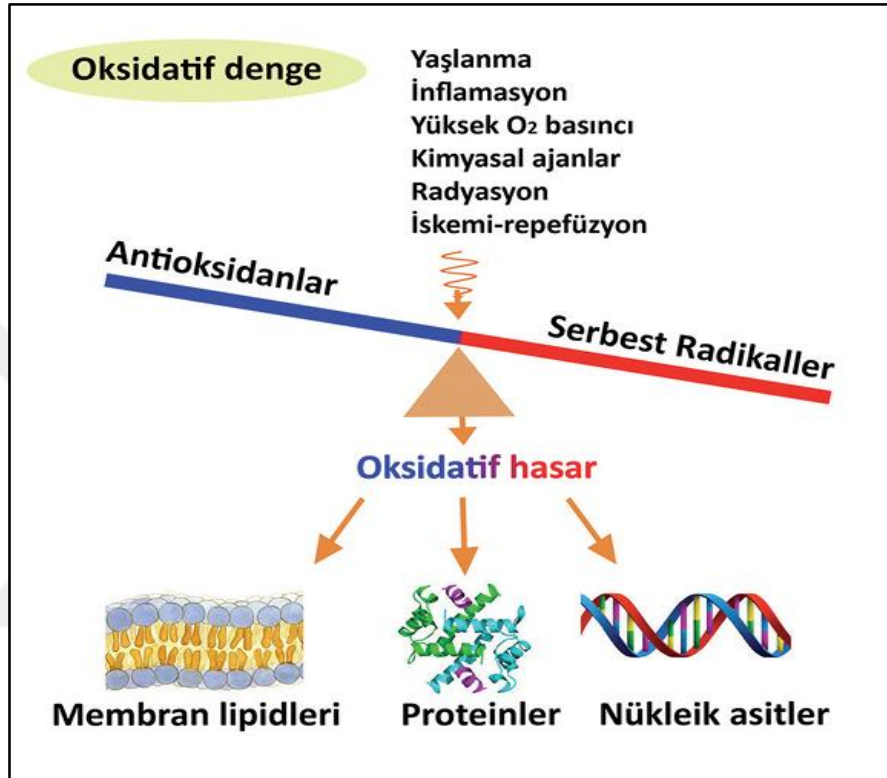
Şekil 8. Silimarın farmakokinetiği(57)

2.4. OKSİDATİF STRES

İlk kez yaşlanma üzerine yapılan çalışmalarda oksidatif stres kavramından bahsedilmiştir. Sistemik tanımı 1985 yılında Sies tarafından yapılmıştır (61). Oksidatif stres in-vivo veya in-vitro sistemlerde serbest radikaller ile bunları temizleyici etkiye sahip olan antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (62).

Dengenin serbest radikallere kaymasıyla beraber artan oksidatif stres sonucunda hücre organellerinde değişimler oluşmaya başlar. Hücre işleyişinin

normal seyrinde reaktif oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Hücresel yaşlanma, iskemi-reperfüzyon, radyasyona maruziyet, yüksek oksidatif maddeye maruziyet gibi sebeplerden de reaktif radikaller artmaktadır. Oksidatif stres kronik inflamasyona sekonder ortaya çıkan patolojilerden sorumludur. Diyabet, nörovasküler hastalıklar, koroner arter hastalığı, kanser vb. hastalıkların patogenezinin sorumludur(62–65).



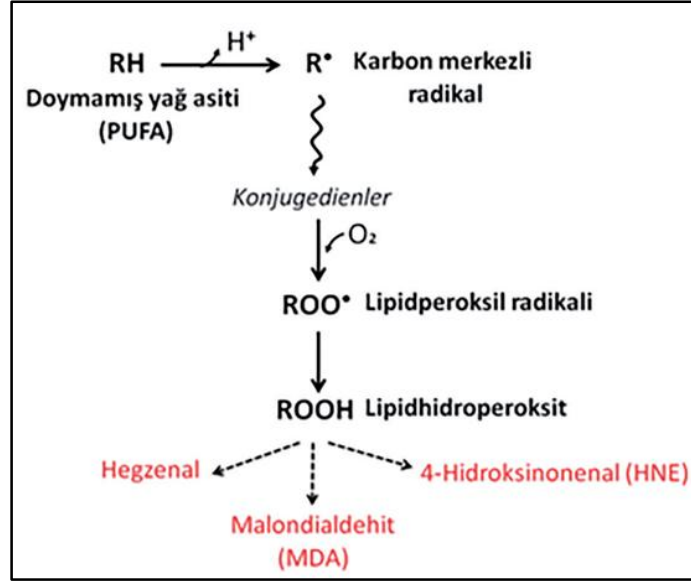
Şekil 9. Oksidatif denge ve etkileri(62)

Serbest oksijen radikalleri hücre içi ve dışı olaylarda birçok maddenin metabolizması sonucunda oluşabilir. Bu maddelerin başında nitrojen ve oksijen içeren moleküller yer almaktadır(66). Bu moleküllerin yer aldığı kimyasal olaylar en çok endoplazmik retikulum, mitokondri, peroksizom ve lizozom organellerinde gerçekleşir. Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz, miyeloperoksidaz enzimleri serbest oksijen radikalleri oluşumdan sorumlu enzimlerdir (67,68)

Oksidatif hasar membran lipidleri, proteinler ve nükleik asitler üzerinde etkilerini gösterirler. Bu hasarların en büyük etkisi proteinlerin primer ve kuarterner yapılarında gözlenir. Primer ve kuarterner yapılarının değişmesi sonucunda protein yapıda olan enzimlerde işlevsel bozukluklar ortaya çıkar (69).

İşlevsel bozuklukların sonucundan hücrenin yaşamsal aktivitelerinden sorumlu olan hücresel sinyal iletim-reseptör mekanizmaları, solunum mekanizmaları ve taşıyıcı organeller-molekül sistemleri işlevlerini yerine getirememeye başlar. Mitokondride artmış reaktif oksijen radikalleri (ROS) üretimine bağlı olarak mtDNA'da mutasyon, kaspazlarda aktivasyon ve apoptozu tetiklenmesinden sorumlu olan sitokrom-c ve pro-apoptotik moleküller salınmaya başlar (67,70). Bu bozuklukların sonucunda antioksidan sistem bozulur ve oksidatif stres daha fazla artmaya başlar. Tüm bu zincirleme olayların sonucunda oksidatif denge sağlanamaz ise hücresel ölüm başlar.

Lipidler de oksidatif strese karşı hassastır. Lipid peroksidasyon ürünleri in-vivo oksidatif stres durumu ve bununla ilişkili hastalıklarda potansiyel biyobelirteçlerdir. Son zamanlarda, araşidonik asitten izoprostan, izoprostaglandin homologları, dokosaheksaenoik asitten nöroprostanlar, linoleik asitten hidroksioktadekadienoik asit ve kolesterolden oksisteroller, in vivo oksidatif stres durumu için potansiyel biyobelirteç çalışmaları yapılmaktadır(66). ROS biyolojik zarlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona yol açar ve lipit peroksidasyonunu başlatır (62). ROS içerisinde en güçlü reaktiviteye sahip olan radikal türü hidroksil radikalidir ($OH\bullet$). Temelde süreç yüksek reaktiviteye sahip radikallerin hücre membranlarında bulunan PUFA saldırarak bir H atomunu metilen gruptan ($-CH_2$) koparması ile başlar. Lipid oksidasyon hasarına bağlı hücre membranı, mitokondri iç zarı gibi membran PUFA ve lipidlerinden bol olan alanlarda membran akışkanlık ve geçirgenliğinde değişimler olur. Oksidatif stresin çok artmasına bağlı membranlar tam parçalanmaya kadar gidebilir. Hücre membran hasarlarına bağlı ortaya çıkan lipit peroksit metabolitleri inflamasyon süreçlerini başlatır, buna bağlı sistemik etkiler ortaya çıkar. Lipit peroksitin zincirleme etkisine bağlı olarak son ürün olarak 4-Hidroksinonenal (HNE), malondialdehit (MDA) ve hegzanal isimli aldehitlere dönüşür (Şekil 10).Meydana gelen bu zincirleme etki ortama zincir kırıcı etkisi olan bir antioksidan eklenene kadar devam eder.



Şekil 10. Lipit peroksidasyonu ve metabolitleri

ROS'ların DNA ve diğer nükleik asitler üzerine de etkileri mevcuttur. Oksidatif DNA hasarına bağlı karsinogenezin tetiklendiği bilinmektedir. Daha spesifik olarak iyonlaştırıcı radyasyonla yapılan çalışmalarda DNA'nın deoksiriboz çatısında ve baz dizilimlerinde çok sayıda Hidroksil iyonun tetiklediği yan ürünlerin ortaya çıktığı gösterilmiştir. ROS'taki artışa bağlı olarak p53 ve ataksi telenjektazi mutasyonu (ATM) proteinlerindeki modülasyon meydana gelir (71). Bu modülasyona bağlı olarak DNA tamir mekanizmalarında aksaklıklar ortaya çıkar ve DNA hasarı meydana gelir(72). Artan ROS ve azalmış antioksidanlara bağlı olarak oksidatif stres dengelenemez ise hücresel yaşlanma, artmış kronik inflamasyon, epigenetik modülasyonlara bağlı DNA da artmış metilasyon gerçekleşir(73). DNA da meydana gelen bu değişimlerin sonucunda normal hücrelerde artmış apoptoz , onkogenik hücrelerde ise azalmış apoptoz ve buna bağlı karsinogenez gelişebilmektedir (71–73).

2.4.1. TAS, TOS ve OSI Oranı

Oksidatif stres antioksidan ve oksidan sistemler arasındaki denge değişiminden dolayı olmaktadır. Plazma, serum veya dokudan antioksidan ve oksidan bir molekülün tayini için birden fazla yöntem mevcuttur fakat tüm

antioksidan-oksidan ajanların tek tek ölçümü maliyet ve zaman kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle hedeflenen doku-kan örneğinde total antioksidan seviyeleri(TAS) ve total oksidan seviyelerini (TOS) ölçen bir metod daha uygun bir seçim olacaktır(74,75). Henüz keşfedilmemiş oksidan ve antioksidan moleküller de göz önüne alındığında TAS ve TOS hesaplanması daha akılcıca ve doğru sonuç verecektir. TOS/TAS oranı oksidatif indeks skoru (OSI) olarak adlandırılmaktadır. Ve OSI değeri arttıkça TAS-TOS arasındaki dengenin TOS lehine değiştiği oksidatif stresin arttığını anlamına gelmektedir (74,76,77). Oksidatif dengeyi ölçmek için bir oran kullanma yönündeki ilk öneri, oksitlenmiş/indirgenmiş glutatyon (GSSG/GSH) idi. Hayvan modellerinde yapılan ilk çalışmalarda, oran artışının in vivo oksidatif stresin bir indeksi olduğunu gösterdi ve diğer parametrelerle beraber tamamlayıcı olarak kullanılabileceğini öne sürülmüştür. Klinikte uygulanması zor ve karmaşık hesaplamalardan kaçınmak için, oksidan molekül ile antioksidan arasındaki oranların kullanılmaya başlanmıştır. Bu anlamda en çok kullanılan oksidasyon belirteçleri malondialdehit (MDA veya TBARS) veya toplam lipid hidroperoksitler (LOOH) olarak ölçülen lipoperoksit seviyesi olmuştur, ancak antioksidanların ölçümü için antioksidan enzimler gibi çeşitli parametreler de kullanılmıştır. Oranı belirtmek için kullanılan isimle ilgili olarak, bazı yazarlar buna "oksidatif stres indeksi" (OSI) ismini kullanmayı seçmişlerdir. Becatti ve ark. oranlarını "redoks indeksi" olarak adlandırmış ve insanlarda redoks durumunun güvenilir bir tahmini olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL KARARI

Yapılan deneysel çalışma ve müdahaleler Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 8.9.2023 tarihinde alınan **2023/09/01** karar numarası ile etik kurul onayından geçmiştir . Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **2023.04.02.1444** numaralı proje desteği verilmiştir.

3.2. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından yetiştirilen ve ağırlıkları ortalama 430 ± 50 g olan 47 tane Wistar Albino ırkı erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Deney süresince hayvanlar kontrollü sıcaklık (23-25°C) ve 12/12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü ve %50-60 nem olan bir odada kafeste olacak şekilde takip edildi. Çalışma süresince sıçanlara limitsiz şekilde musluk suyu (ad libitum) ve standart kemirgen yemi verildi. Deneye başlanmadan önce 2 hafta beklenerek ortam şartlarına adaptasyonları sağlandı.

3.3. DENEY TASARIMI

Deneyde kullanılan hayvanlar bir grupta (kontrol grubu) 5 diğer altı grupta 7'şer hayvan olacak şekilde rasgele dağıtılarak 7 gruba ayrıldı. Deneyde kullanılan siklofosamid (Endoxan, EIP ECZACIBASI, İstanbul, Türkiye) toksik etkisinden dolayı valfli emniyet aparatıyla hazırlandıktan sonra intraperitoneal (i.p.) tek doz 200 mg/kg olarak enjekte edildi. Silimarin (Silymarin- S0292 ,Sigma-Aldrich, Switzerland) hazırlanırken çözücü olarak fındık yağı kullanıldı. Gruplar için hesaplanan SMN dozu yarıya bölünerek (0,5 cc çözücü yağ içinde) gündüz-gece

olarak günde iki kez oral gavaj yöntemiyle verildi. Silimarin çözeltisi verilmeden hemen önce taze olarak hazırlandı. Silimarin (SMN) oral gavaj 200 mg/kg /gün olarak ve yüksek doz Silimarin (2xSMN) oral gavaj 400 mg/kg/gün dozajlamasında verildi.

1.Grup-Kontrol Grubu (n:5): 14 gün oral gavajla sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi. 8.gün i.p. SF enjeksiyonu yapıldı.15.gün sakrifiye edildi.

2.Grup,Siklofosfamid (CYP) grubu(n:7) : 14 gün oral gavajla sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi. 8.gün i.p. CYP enjeksiyonu yapıldı.15.gün sakrifiye edildi.

3.Grup, Silimarin (SMN) grubu(n:7): ilk 7 gün sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi, 8.gün i.p. 1 cc SF enjeksiyonu yapıldı ve 8-14. günlerde SMN verildi, 15. Gün sakrifiye edildi.

4.Grup, Silimarin (SMN) + Siklofosfamid (CYP) grubu (SMN+CYP) (n:7): İlk 7 gün SMN verildi.8. günde CYP enjekte edildi,14. güne kadar oral gavajla sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi. 15. Gün sakrifiye edildi.

5.Grup, 2x Silimarin (2xSMN) + Siklofosfamid (CYP) grubu (2xSMN+CYP) (n:7): İlk 7 gün 2xSMN verildi.8. günde CYP enjekte edildi. 14. güne kadar oral gavajla sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi .15. Gün sakrifiye edildi.

6.Grup , Siklofosfamid (CYP) + Silimarin (SMN) grubu (CYP+SMN) (n:7) : İlk 7 gün sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi, 8. Gün SMN verildikten 2 saat sonra CYP verildi ve bir hafta boyunca SMN verildi. 15. Gün sakrifiye edildi.

7.Grup, Siklofosfamid (CYP) + 2xSilimarin (2xSMN) grubu (CYP+ 2xSMN) (n:7): İlk 7 gün sabah ve akşam 0.5'er cc çözücü yağ verildi 8. Gün 2xSMN verildikten 2 saat sonra CYP verildi ve bir hafta boyunca 2xSMN verildi. 15. Gün sakrifiye edildi.



Şekil 11. Gruplar ve kafes düzenleri



Şekil 12. Silimarin çözeltisi ve ratın oral gavajla beslenmesi

3.3.1. Deneyden elde edilen veriler

Testisi alınan hayvanlardan intrakardiyak kan alındı, kan örnekleri 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj sonrasında serum elde edildi. Her rata ait serum örneği ikişer ependorf tüpüne alınarak numunelerin çalışılacağı güne kadar -80 °C’de

saklandı. Daha sonra, sol testis ve serumda TAS, TOS, MDA seviyeleri ticari kitlerle dış laboratuvarıda; serum testosteron, FSH ve LH değerleri ise Düzce Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ELISA yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Sağ testisler bouin solüsyonuna alınarak Düzce Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na gönderildi.

Tüm hayvanların vücut ağırlık ölçümleri deneyin başında, 8. günde ve 14.günün sonunda ölçülerek not edildi. Deney sonunda testis ağırlığı ve uzunluk ölçümleri yapıldı. Sakrifikasyon öncesi ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için testis vücut ağırlığı oranı belirlendi.

“Testis / Vücut Ağırlığı Oranı: sağ ve sol testis ağırlıkları toplamı /vücut ağırlığı × 100”

Testislerin transvers ve vertikal uzunlukları dijital el kumpası ile ölçüldü. Prolate (uzamış) sferoit hacim formülüne göre hesaplanarak her bir hayvan için testis hacimleri belirlendi (79).

“ Prolate (uzamış) sferoit için formül: uzunluk × genişlik² × 0.52”

3.3.2. Deneyde Kullanılan Ölçüm Malzemeleri

Etken madde olarak siklofosfamid (Endoxan, EIP ECZACIBASI, İstanbul, Türkiye), Silimarin (Silymarin- S0292 ,Sigma-Aldrich, Switzerland) kullanıldı. Anestezik uygulama için 10 mg/kg ksilazin ve 90 mg/kg ketamin kullanıldı. Deneyde hayvan ağırlığı tartımında Kern PCB 8K-01, etken madde ve testis dokusu tartımında Kern ABJ 220-4 NM aleti kullanıldı. Testislerin transvers ve vertikal uzunlukları +-0,5 mm hassasiyetteki dijital el kumpası ile ölçüldü.



Şekil 13. Ağırlık ve uzunluk ölçüm aletleri



Şekil 14. Silimarın ve enjeksiyona hazır siklofosfamid

3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZ YÖNTEMİ

3.4.1. Serum ve Dokudan TOS, TAS ve OSI ölçümü.

Deneklerden elde edilen sol testis ve serum örneklerinin analizinde Total Oksidan Kapasite (TOS) ve Total Antioksidan Kapasite (TAS) ölçümleri, ticari kitler kullanılarak MINDRAY-BS400 cihazında gerçekleştirilmiştir.

TAS ölçümlerinde, antioksidan kapasitesini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) yöntemi uygulanmıştır. ABTS radikal katyonları, antioksidanlarla reaksiyona girerek renk değişikliği oluşturur, bu da spektrofotometre ile ölçülür. Özellikle ABTS +radikal katyon testi, TAS değerlendirmelerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir(80).

TOS seviyeleri ölçüm yöntemi olarak numunedeki oksidanlar ferrous ion-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonuna oksitlemiştir. Oksidasyon reaksiyonu, ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile desteklenmiştir. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edilmiş olup sonuçlar mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) olarak ifade edilmiştir(81).

TOS'un TAS'a oranı oksidatif stres indeksi (OSI) olarak kabul edilmiştir (82–84). Hesaplama için, TAS'ın birimi $\mu\text{mol/L}$ 'ye dönüştürülmüş ve OSI değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$“OSI= TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / TAS (\mu\text{mol Trolox eşdeğeri/L})”$$

3.4.2. Serum ve Dokudan Malondialdehit (MDA) nmol/ml ölçümü

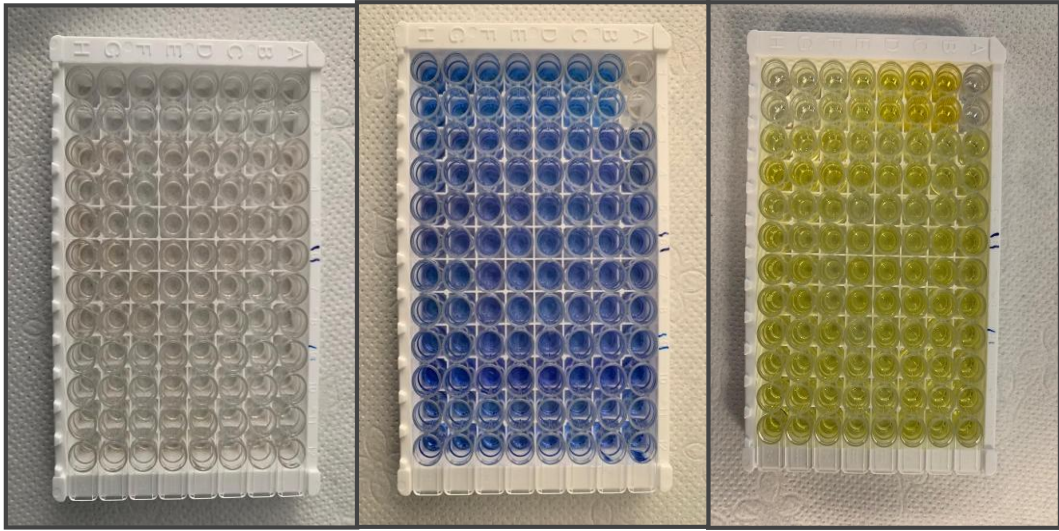
Deneklerden elde edilen sol testisler ve serum örnekleri analizlerinde MDA ölçümleri ticari kitler kullanılarak REL BIOCHEM-REL ASSAY cihazında yapılmıştır. MDA seviyesi, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona dayalı bir yöntemle belirlenmiştir. MDA, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorpsiyonu olan pembe bir pigment oluşturmuştur. Numuneler, %10 trikloroasetik asit ile işlenmiş, santrifüjlenmiş ve süpernatant %0.67 TBA ile kaynar su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Absorbans 532 nm'de ölçülmüştür.



Şekil 15. Tam kan ve santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri

3.4.3. Hormonal Analizler

Serum total testosteron, FSH ve LH değerleri ise Düzce Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ELISA yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçümlerde ROBOniK washwell Plate ELISA washer ve ROBOniK readwell Touch ELISA Plate Analyzer cihazları kullanıldı. ELISA kitleri olarak SunRed Rat luteotropic hormone(LH) ELISA Kit, SunRed Rat follicle-stimulating hormone(FSH) ELISA Kit ve SunRed Rat testostosterone (T) ELISA Kit isimli ürünler kullanıldı.



Şekil 16. Platelerin görünümü

3.5. MORFOMETRİK VE HİSTOLOJİK ANALİZLER

Uygun anestezi altında (10 mg/kg ksilazin 90 mg/kg ketamin) ağırlık tartımı sonrasında ratlara sağ ve sol orşiektomi yapıldı. Her iki testis çevre bağ dokudan temizlendikten sonra vertikal-transvers çapları ölçüldü, ağırlıkları not edildi. Sol testisler dokuda oksidatif stres ölçümü için saklandı. Sağ testisler histopatolojik inceleme için boin solüsyonuna alındı.



Şekil 17. Orşiektomi materyali ve temizlenmiş testis dokuları

3.5.1. Rutin Parafin Takibi

Her biri 50 ml lik olan kaplardaki bouin solüsyonuna alınan testis dokuları, yaklaşık 24 saat fikse edildi. Fiksatifin fazlası uzaklaştırmak amacıyla 3 saat çeşme suyunda yıkandı. Sonra dokuların dehidratasyonu için sırasıyla %70, 80 ve 90'lık etanol serilerinde 24'er saat boyunca tutuldu. %100'lük etanolde de 4 saat tutulduktan sonra yaklaşık 5 dakika ksilen içerisinde şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirdi. Dokular 120 dakika boyunca 75°C'lik etüvde bulunan parafin içerisinde bekletildi. Bu süreçte 3 kere parafin değişimi yapıldı. Daha sonra parafin içeren kalıplara konuldu ve oda sıcaklığında parafin donduruldu. Parafine gömülü dokuların blokları kesime hazır hale getirildi ve mikrotoma yerleştirilerek 4 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin su banyosunda düzleştikten

sonra histopatolojik inceleme için normal lamlar üzerine alındı. Kesitler gece boyunca oda ısısında kurutuldu.

3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Kesitler doku dışında bulunan parafinlerini bırakması için 75°C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika boyunca bekletildi. Sonra etüvden çıkartılıp 10'ar dakika ksilen 1 ve ksilen 2'de bekletildi. Her birinde 10 dip olmak üzere %100, %90, %80 ve %70 etil alkole daldırıldı ve dokulara suyu geri vermek için akan suda yıkandı. Daha sonra 3 dakika hematoksilende bekletilerek nükleusların boyanması sağlandı ve kesitler akan suda yıkandı. Devamında hızlı bir şekilde 2 defa asit alkole daldırıldı. Tekrar akan suda yıkandı. Kesitler hızlı bir şekilde 2 defa da amonyaklı suya daldırıldı. Peşinden tekrar akan suda yıkandı. 10 dip %70'lik etil alkole daldırıldı. Ardından 40 saniye alkolde çözülmüş eozinde bekletilerek sitoplazmanın boyanması sağlandı ve tekrardan akan suda yıkandı. Daha sonra 10'ar dip olmak üzere %70, %80 ve %96'lik etil alkole daldırıldı. Ksilende 10 dakika ve 75°C sıcaklıktaki etüvde de 2 dakika bekletildikten sonra lamlara entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.5.3. Gomori-Trikrom Boyama Protokolü

Kesitler 40 dk 75° C sıcaklıktaki etüvde bekletildi. Sonra ksilende 20 dakika boyunca deparafinize edildi. Her birinde 10 dip olmak üzere sırasıyla %96, %80 ve %70 etil alkollere daldırılarak hidrate edildi. Sonra bol su ile yıkandı. Bouin solüsyonu içerisinde olacak şekilde 75° C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika boyunca bekletildi. 3 ayrı kapta bol su ile yıkandı. Sonra hematoksilende 2 dk tutuldu. Tekrar 3 ayrı kapta bol su ile yıkandı. Daha sonra trikrom solüsyonunda 25 dk tutuldu. Ardından %0,5'lik asetik asit ile diferansiye edildi ve kesitler akan su altında yıkandı. Daha sonra her birine 10'ar dip olmak üzere sırasıyla %70, %80 ve %96'lik etil alkole daldırılarak dehidrate edildi. Ksilende 10 dakika ve 75° C sıcaklıktaki etüvde de 2 dakika bekletildikten sonra lamlara entellan damlatılarak lamel ile

kapatıldı.

3.5.4. Johnsen Skolama Protokolü

Hematoksilen-eozin boyanmış her bir kesitten yaklaşık 30 adet yuvarlak seminifer tübül seçildi. Testis dokularındaki hasarı ve spermatogenezi değerlendirmek için testis kesitleri incelenerek seminifer tübüllerde yer alan germ hücrelerinin durumu kantitatif olarak 1'den 10'a kadar uygun olan puan verildi. Testis dokularının skorlaması iki kör uzman tarafından belirlendi. Sonra her grup için ortalama bir değer hesaplandı ve gruplar karşılaştırıldı. Değerlendirmeler ve fotoğraflamalar Olympus BX50 mikroskop ile yapıldı.

Tablo 1. Johnsen Skolama Protokolü

Skor	Johnsen Skolama Protokolü
10	Düzenli seminifer tübüller ve tam spermatogenez mevcut
9	Düzensiz seminifer tübüller mevcut ancak tübül içinde çok sayıda olgun sperm varlığı
8	Seminifer tübüllerde az sayıda sperm varlığı
7	Seminifer tübüllerde sperm yokluğu ancak çok sayıda erken spermatid varlığı
6	Seminifer tübüllerde az sayıda erken spermatid varlığı
5	Seminifer tübüllerde spermatid yokluğu ancak çok sayıda spermatosit varlığı
4	Seminifer tübüllerde az sayıda spermatosit varlığı
3	Seminifer tübüllerde sadece spermatogonyumların varlığı
2	Seminifer tübüllerde germ hücrelerinin yokluğu
1	Fibröz doku ile kaplanmış seminifer tübüllerde hiç hücre olmaması

3.6. İSTATİSKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Normallik dağılımını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklar, Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile analiz edilmiş ve

farklılıkların belirlenmesinde Tukey-Kramer Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Siklofosamid oldukça toksik bir madde olduğu için deney sürecinde buna bağlı olarak iki denek kaybı yaşandı (SMN+CYP ve CYP+SMN gruplarından birer tane).

4.1. DENEK AĞIRLIKLARI

Deneye başlangıç öncesinde, 8. günde ve deneyin son gününde denek ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Yapılan ölçümlerde gruplar arası ağırlık ortalamaları farklı bulundu ama istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (sırasıyla p değerleri: 0,82; 0,69; 0,22) (Tablo 2,3,4)

Yapılan ağırlık ölçümlerinin ortalamalarında grupların kendi içindeki son gün ve başlangıç gün ağırlık değişimi ortalamaları (15.gün ağırlığı - 1. gün ağırlığı) Tablo 5'te verilmiştir. Kontrol ve CYP gruplarıyla kıyaslamaları yapılmıştır.

Tablo 2. Deney başlangıç günü ağırlıkları

Deney Başlangıç Günü	1.Kontrol n:5	2.CYP n:7	3.SMN n:7	4.SMN+ CYP n:7	5.2xSMN+ CYP n:7	6.CYP+ SMN n:7	7.CYP+ 2xSMN n:7	Toplam: N:47
Ağırlık ortalaması(g)	412,2	445	429,28	437,14	433,57	428,57	430	431,61
Std sapma $\pm$	91,72	47,02	42,07	24,97	60,6	66,44	31,09	50,88
Min-max (g) ;med. (g)	340-565; 380	350- 490; 450	370- 480; 410	400-460; 430	325-490; 450	360-520; 415	390-470; 430	

Tablo 3. Deney 8. gün ağırlıkları

Deney 8.gün	1.Kontrol n:5	2.CYP n:7	3.SMN n:7	4.SMN+ CYP n:7	5.2xSMN+ CYP n:7	6.CYP+ SMN n:7	7.CYP+ 2xSMN n:7	Toplam: N:47
Ağırlık ortalaması(g)	396,4	419	414,28	438,57	408	407,1	412,85	414,48
Std sapma $\pm$	93,24	42,2	47,2	19,52	59,45	87,12	33,02	55,35
Min-max (g) ;med. (g)	310-550; 360	340- 480; 422	340- 470; 400	410-460; 435	300-470; 420	320- 530; 400	370- 450; 420	

Tablo 4. Deney son günü ağırlıkları

Deneyin son günü (15.Gün)	Kontrol n:5	CYP n:7	SMN n:7	SMN+CYP n:6	2xSMN+CYP n:7	CYP+SMN n:6	CYP+2xSMN n:7	Toplam N:45
Ağırlık ortalaması(g)	409,6	372	411	404	384	360,16	359	384,77
Std sapma ±	90,81	32,91	35,47	19,4	55,07	85,41	33,29	54,31
Min-max (g) ;med. (g)	332-560; 376	310-465; 379	356-459; 405	368-427; 407	283-450; 388	245-456; 361	307-405; 362	

Tablo 5. Deneyin son günü ve başlangıç gün ağırlık değişimi ortalamaları ve grup kıyaslamaları
(p<0,05 anlamlı kabul edildi ve *koyu-italik* yazıldı)

Grup No ,isim	Deney son gün ve başlangıç gün ağırlık değişimi ortalamaları(g)	Kontrol grubu ile karşılaştırma,p değeri	CYP grubu ile karşılaştırma, p değeri.
1.Kontrol	-2,6	-	0,004
2.CYP	-73	0,004	-
3.SMN	-18,28	0,009	0,003
4.SMN+CYP	-27,66	0,006	0,003
5.2xSMN+CYP	-49,57	0,004	0,015
6.CYP+SMN	-78,16	0,006	0,88
7.CYP+2xSMN	-71	0,004	0,798

Tablo 5 'e bakıldığı zaman tüm gruplarda kontrol grubuna göre ağırlık kaybının anlamlı ölçüde fazla olduğu görülmektedir. SMN, SMN+CYP, 2xSMN+CYP gruplarındaki değişimin CYP grubuna göre daha az olduğu izlenmektedir. SMN tek başına verildiğinde denek ağırlığını azaltmasına rağmen koruyucu olarak verildiğinde CYP ile oluşan kilo kaybını anlamlı ölçüde önlemektedir. Tedavi edici etkisine bakılan CYP+SMN ve CYP+2xSMN gruplarında ise hastalık grubuna göre kilo kaybını önlemede anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.2. TESTİS AĞIRLIKLARI

Testis ağırlık ölçümleri sağ, sol ve toplam testis ağırlığı olarak kaydedildi (Tablo 6). Yapılan analizde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (p:0,64)

Tablo 6. Testis ağırlıkları grup ortalamaları

Grup No ,isim	Testis Ağırlığı Ortalamaları(mg) ± Standart sapma		
	Sağ	Sol	Toplam (Sağ+Sol)
1.Kontrol	1693 ± 192,3	1690 ± 155,65	3384 ± 346,5
2.CYP	1684 ± 180,3	1647 ± 292,6	3332 ± 461,8
3.SMN	1697 ± 154,4	1712 ± 166	3410 ± 318,8
4.SMN+CYP	1751 ± 181	1751 ± 127,3	3502 ± 292,5
5.2xSMN+CYP	1738 ± 153,1	1776 ± 166	3514 ± 316
6.CYP+SMN	1695 ± 235,4	1683 ± 217,4	3378 ± 450,3
7.CYP+2xSMN	1581 ± 114,2	1596 ± 122,2	3177 ± 233,7

4.3. TESTİS AĞIRLIK İNDEKSİ(TAİ)

Sakrifikasyondan hemen önce ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı hesaplanarak her bir hayvan için testis vücut ağırlığı indeksi belirlendi (*Testis / Vücut Ağırlığı Oranı: sağ ve sol testis ağırlıkları toplamı(gr) /vücut ağırlığı(gr) × 100*). Her bir denek için hesaplanan TAİ gruplar içinde normal dağılım gösterdiği izlendi. Grupların birbiri arasında yapılan karşılaştırmalarında anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,328) (Tablo 7).

Tablo 7. Testis ağırlık indeksi (TAİ) ve grup ortalamaları

Grup No ,isim	TAİ grup Ortalamları $\pm$ Standart sapma
1.Kontrol	0,843 $\pm$ 0,113
2.CYP	0,8959 $\pm$ 0,103
3.SMN	0,8334 $\pm$ 0,094
4.SMN+CYP	0,867 $\pm$ 0,064
5.2xSMN+CYP	0,9263 $\pm$ 0,109
6.CYP+SMN	0,9636 $\pm$ 0,148
7.CYP+2xSMN	0,889 $\pm$ 0,082

4.4.TESTİS HACİMLERİ

Testislerin transvers ve vertikal uzunlukları dijital el kumpası ile ölçüldü. Prolate (uzamış) sferoit hacim formülüne (*Prolate (uzamış) sferoit için formül: $\text{uzunluk} \times \text{genişlik}^2 \times 0.52$*) göre hesaplanarak her bir hayvan için testis hacimleri belirlendi. Her grubun total testis hacimleri kontrol ve CYP grubu ile kıyaslandı (Tablo 8).

Tablo 8.Testis hacimleri, grup ortalamaları ,min-max ve median değerleri

Grup No ,isim	Total Testis Hacimleri Ortalamları(mm ³) $\pm$ Standart sapma	Min-Max; Medyan değerler(mm ³)	Kontrol grubu ile karşılaştırma,p değeri	CYP grubu ile karşılaştırma, p değeri.
1.Kontrol	3031 $\pm$ 495,9	2491-3589 ; 3050	-	0,291
2.CYP	3313 $\pm$ 781,7	1846-4206; 3488	0,291	-
3.SMN	3092 $\pm$ 294,8	2706-3493; 2983	0,935	0,225
4.SMN+CYP	2769 $\pm$ 514,9	1975-3345; 2813	0,361	0,153
5.2xSMN+CYP	3009 $\pm$ 572,9	2253-3698; 3328	0,808	0,277
6.CYP+SMN	3645 $\pm$ 572,7	2843-4522; 3606	0,068	0,568
7.CYP+2xSMN	3638 $\pm$ 277,4	3235-4051; 3610	0,028	0,482

Yapılan kıyaslamalarda Kontrol grubu ve CYP grubu arasında total testis hacimleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi. Kontrol ve CYP+2xSMN grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark izlendi ($p=0,028$).

4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

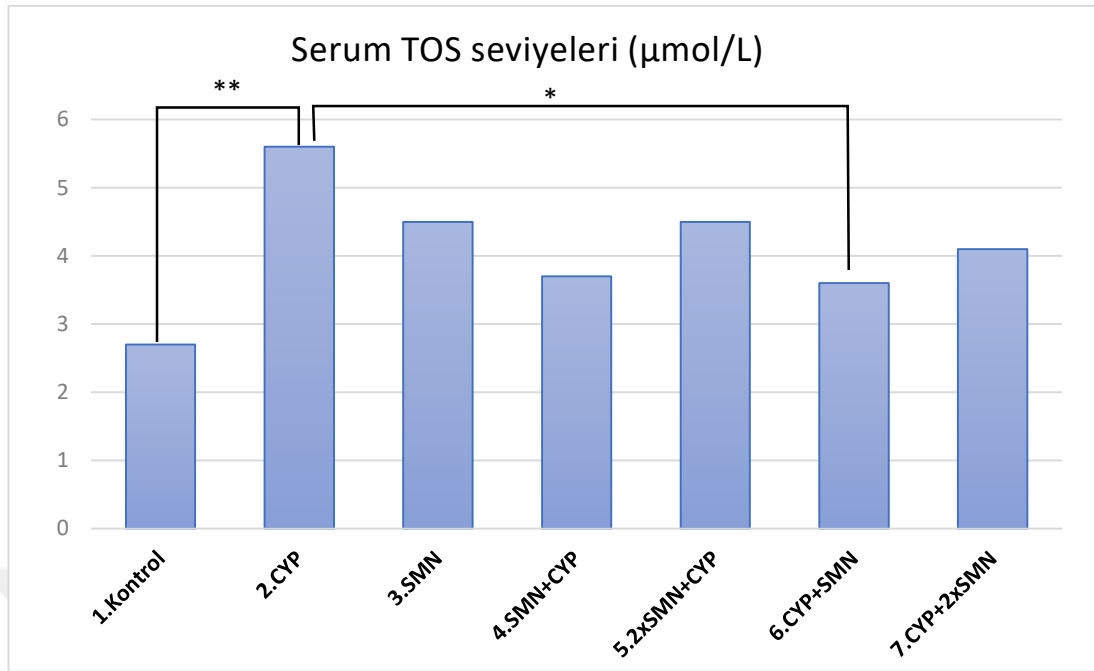
4.5.1. Serum TOS seviyeleri

CYP grubunun serum TOS seviyesi değerleri Kontrol ve CYP+SMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,001$ ve $p=0,04$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$)(Grafik 1). (Tablo 10).

Tablo 9. Serum TOS seviyeleri grup ortalamaları, min-max ve medyan değerleri

Grup No ,isim	Serum TOS ortalamaları($\mu\text{mol/L}$) $\pm$ Standart sapma	Min-Max; Medyan değerler ($\mu\text{mol/L}$)	p
1.Kontrol	2,7 $\pm$ 0,6	1,7-3,2 ; 2,9	P=0,003
2.CYP	5,6 $\pm$ 1,6	3,8-7,9; 4,8	
3.SMN	4,5 $\pm$ 1,5	2,5-6,8; 4,5	
4.SMN+CYP	3,7 $\pm$ 1,3	1,3-5; 4	
5.2xSMN+CYP	4,5 $\pm$ 0,7	3,6-5,9; 4,5	
6.CYP+SMN	3,6 $\pm$ 0,4	3-4; 3,6	
7.CYP+2xSMN	4,1 $\pm$ 0,8	2,8-5; 4,3	

Grafik 1. Serum TOS seviyeleri grafik gösterimi (*p<0,05, **p<0,01)



4.5.2. Testis TOS seviyeleri

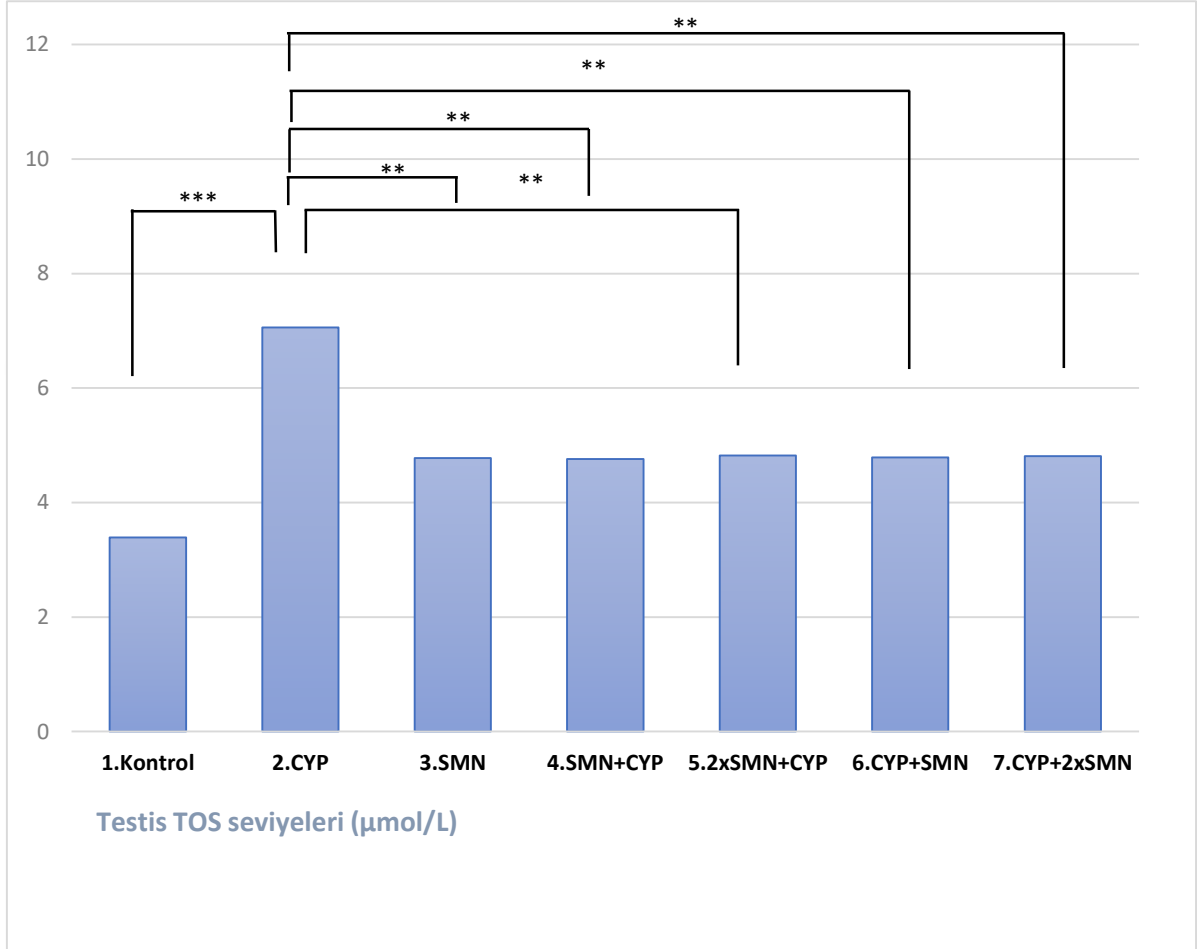
Sonuçlar ayrıntılı olarak incelendiğinde, CYP grubunun testis TOS seviyesi değerleri Kontrol, SMN, SMN+CYP, 2xSMN+CYP, CYP+SMN, CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,001$, $p=0,005$, $p=0,007$, $p=0,006$, $p=0,007$ ve $p=0,005$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Grafik 2) (Tablo 10).

Tablo 10. Testis TOS seviyeleri grup ortalamaları ,min-max ve median değerleri

Grup No ,isim	Testis TOS ortalamaları(µmol/L) ± Standart sapma	Min-Max; Medyan değerler (µmol/L)	p değeri
1.Kontrol	3,39±0,54	2,45-3,82 ; 3,57	p<0,001
2.CYP	7,06±1,32	4,8-8,61; 7,28	
3.SMN	4,78±0,61	3,95-5,63; 4,86	
4.SMN+CYP	4,76±0,695	3,76-5,71; 4,87	
5.2xSMN+CYP	4,82±0,72	4,2-6,25; 4,7	

6.CYP+SMN	4,79±1,3	3,18-6,28; 4,99	
7.CYP+2xSMN	4,81±1,57	2,91-7,92; 4,68	

Grafik 2. Testis TOS seviyeleri grafik gösterimi(p<0,01, ***p<0,001)**



4.5.3. Serum TAS seviyeleri

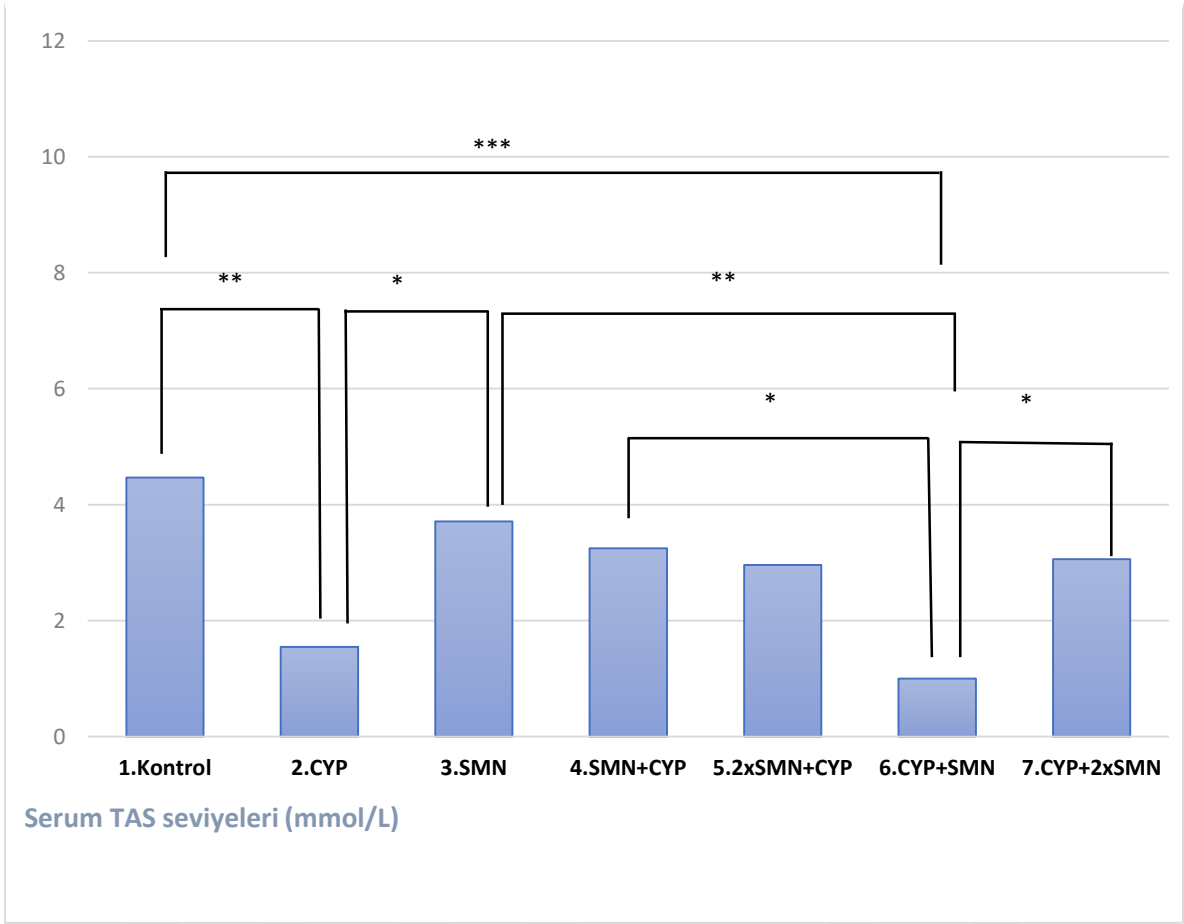
Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0,001$) (Tablo 11). CYP grubunun serum TAS seviyesi değerleri Kontrol ve SMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptandı ($p=0,002$ ve $p=0,02$). Benzer şekilde, CYP+SMN grubunun serum TAS seviyesi değerleri Kontrol, SMN, SMN+CYP, ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu

saptandı (p değerleri sırasıyla, $p<0,001$, $p=0,003$, $p=0,0,3$ ve $p=0,04$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Grafik 3).

Tablo 11. Serum TAS seviyeleri grup ortalamaları ,min-max ve median değerleri

Grup No ,isim	Serum TAS ortalamaları(mmol/L) $\pm$ Standart sapma	Min-Max; Medyan değerler (mmol/L)	p değeri
1.Kontrol	4,47 $\pm$ 0,74	3,40-5,22 ; 4,58	$p<0,001$
2.CYP	1,55 $\pm$ 0,64	0,81-2,42; 1,2	
3.SMN	3,71 $\pm$ 0,81	2,77-4,81; 3,38	
4.SMN+CYP	3,25 $\pm$ 1,24	0,88-4,52; 3,52	
5.2xSMN+CYP	2,96 $\pm$ 1,72	1,05-5,80; 3,53	
6.CYP+SMN	1 $\pm$ 0,22	0,70-1,25; 0,75	
7.CYP+2xSMN	3,06 $\pm$ 1,66	1,31-5,80; 2,86	

Grafik 3. Serum TAS seviyeleri grafik gösterimi (*p<0,05, **p<0,01, *p<0,001)**



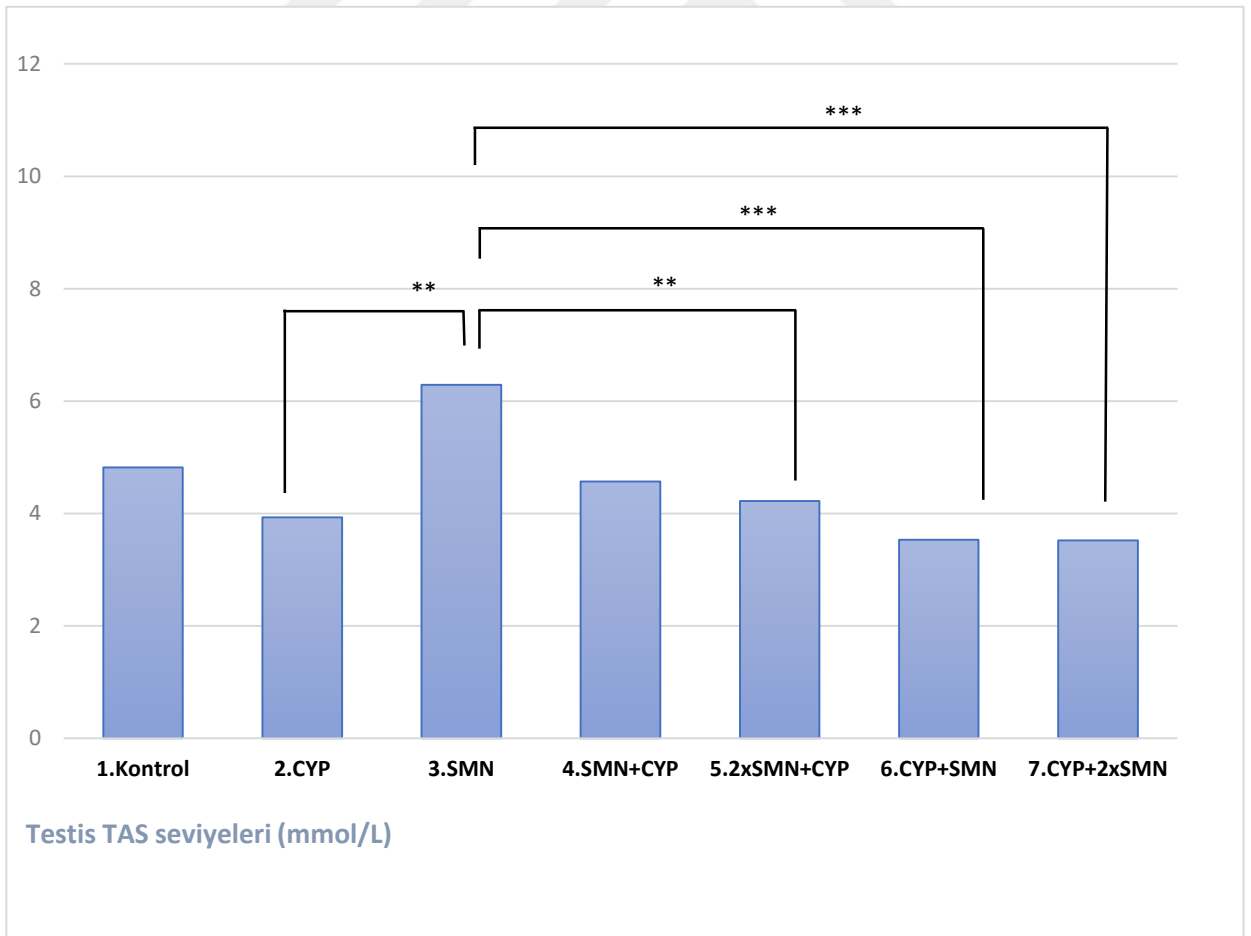
4.5.4. Testis TAS seviyeleri

SMN grubunun testis TAS seviyesi değerleri CYP, 2xSMN+CYP, CYP+SMN ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p=0,002, p=0,01, p<0,001 ve p=0,001) (Grafik 4) (Tablo 12).

Tablo 12. Testis TAS seviyeleri grup ortalamaları ,min-max ve median değerleri

Grup No ,isim	Testis TAS ortalamaları(mmol/L) ± Standart sapma	Min-Max; Median değerler (mmol/L)
1.Kontrol	4,82±0,78	3,65-5,58 ; 4,8
2.CYP	3,93±0,97	2,08-5,01; 4,08
3.SMN	6,29±1,32	4,43-8,56; 6,21
4.SMN+CYP	4,57±0,75	3,46-5,40; 4,55
5.2xSMN+CYP	4,22±1,02	3,29-6,23; 3,77
6.CYP+SMN	3,53±0,68	2,76-4,64; 3,36
7.CYP+2xSMN	3,52±1,34	1,94-5,91; 3,06

Grafik 4. Testis TAS seviyeleri grafik gösterimi(p<0,01, ***p<0,001)**



4.5.5. Serum OSI değerleri

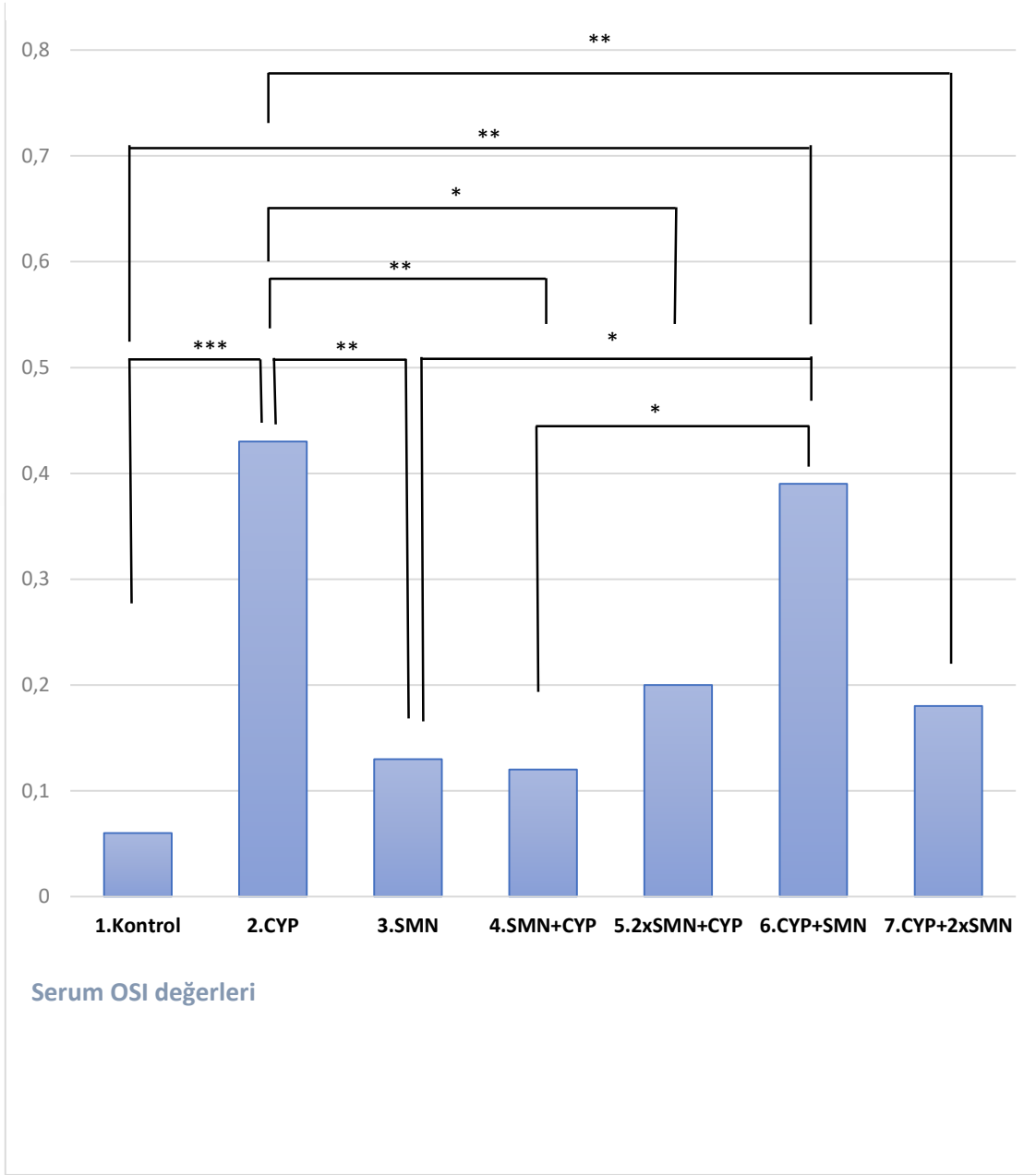
Sonuçlar ayrıntılı incelendiğinde, CYP grubunun serum OSI oranı değerleri Kontrol, SMN, SMN+CYP, 2xSMN+CYP ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p değerleri sırasıyla; $p<0,001$, $p=0,001$, $p=0,02$, $p=0,03$ ve $p=0,01$) (Tablo 13).

Tablo 13.Serum OSI değerleri grup ortalamaları ,min-max ve median değerleri

Grup No ,isim	Serum OSI ortalamaları $\pm$ Standart sapma	Min-Max; Median değerler	p değeri
1.Kontrol	0,06 $\pm$ 0,02	0,03-0,09 ; 0,07	$p<0,001$
2.CYP	0,43 $\pm$ 0,27	0,20-0,97; 0,35	
3.SMN	0,13 $\pm$ 0,05	0,08-0,20; 0,11	
4.SMN+CYP	0,12 $\pm$ 0,03	0,08-0,15; 0,13	
5.2xSMN+CYP	0,20 $\pm$ 0,11	0,08-0,37; 0,17	
6.CYP+SMN	0,39 $\pm$ 0,08	0,29-0,50; 0,48	
7.CYP+2xSMN	0,18 $\pm$ 0,10	0,07-0,37; 0,17	

Benzer ekilde, CYP+SMN grubunun serum OSI oranı değerleri Kontrol, SMN ve CYP+SMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p değerleri sırasıyla, $p=0,003$, $p=0,01$ ve $p=0,01$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$)(Grafik 5).

Grafik 5. Serum OSI değerleri grafik gösterimi(*p<0,05, **p<0,01, *p<0,001)**



4.5.6. Testis OSI değerleri

Testis OSI oranları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($p<0,001$) (Tablo 14). CYP grubunun testis OSI oranı değerleri Kontrol, SMN, SMN+CYP, 2xSMN+CYP ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel

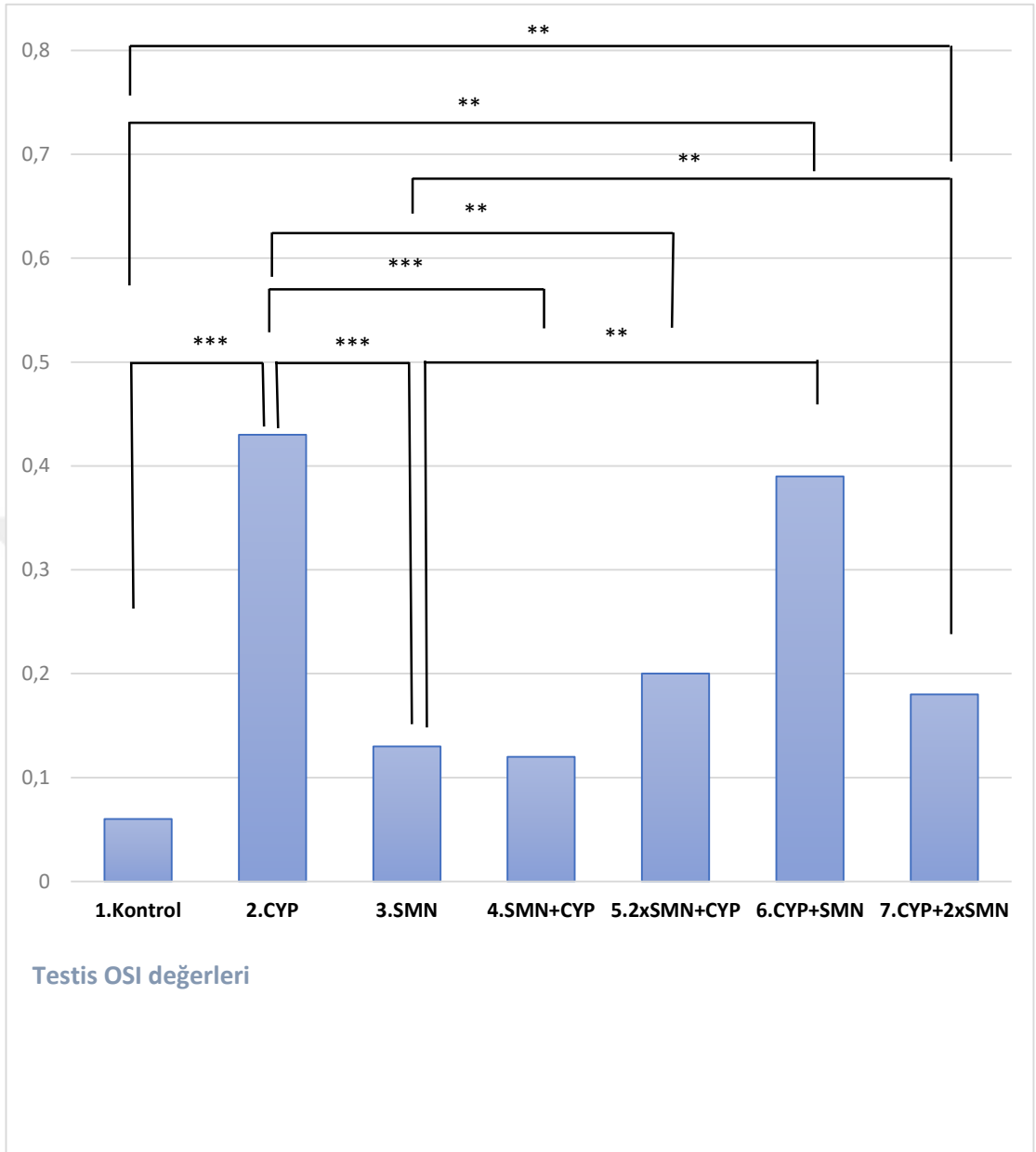
olarak daha yüksek olduğu saptandı (p değerleri sırasıyla; $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,001$ ve $p=0,01$).

Tablo 14. Testis OSI değerleri grup ortalamaları ,min-max ve medyan değerleri

Grup No, isim	Testis OSI ortalamaları $\pm$ Standart sapma	Min-Max; Medyan değerler	p değeri
1.Kontrol	0,07 $\pm$ 0,00	0,07-0,08 ; 0,07	$p<0,001$
2.CYP	0,19 $\pm$ 0,04	0,14-0,24; 0,17	
3.SMN	0,08 $\pm$ 0,01	0,07-0,09; 0,08	
4.SMN+CYP	0,11 $\pm$ 0,02	0,09-0,14; 0,09	
5.2xSMN+CYP	0,12 $\pm$ 0,02	0,08-0,14; 0,12	
6.CYP+SMN	0,14 $\pm$ 0,05	0,07-0,19; 0,15	
7.CYP+2xSMN	0,14 $\pm$ 0,03	0,08-0,18; 0,15	

Benzer şekilde, CYP+SMN grubunun testis OSI oranı değerleri Kontrol, SMN ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p değerleri sırasıyla, $p=0,003$, $p=0,004$ ve $p=0,002$). Buna ek olarak CYP+2xSMN grubunun testis OSI oranı değerleri Kont, grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0,002$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Grafik 6).

Grafik 6. Testis OSI değerleri grafik gösterimi (p<0,01, ***p<0,001)**



4.5.7. Serum MDA Seviyeleri

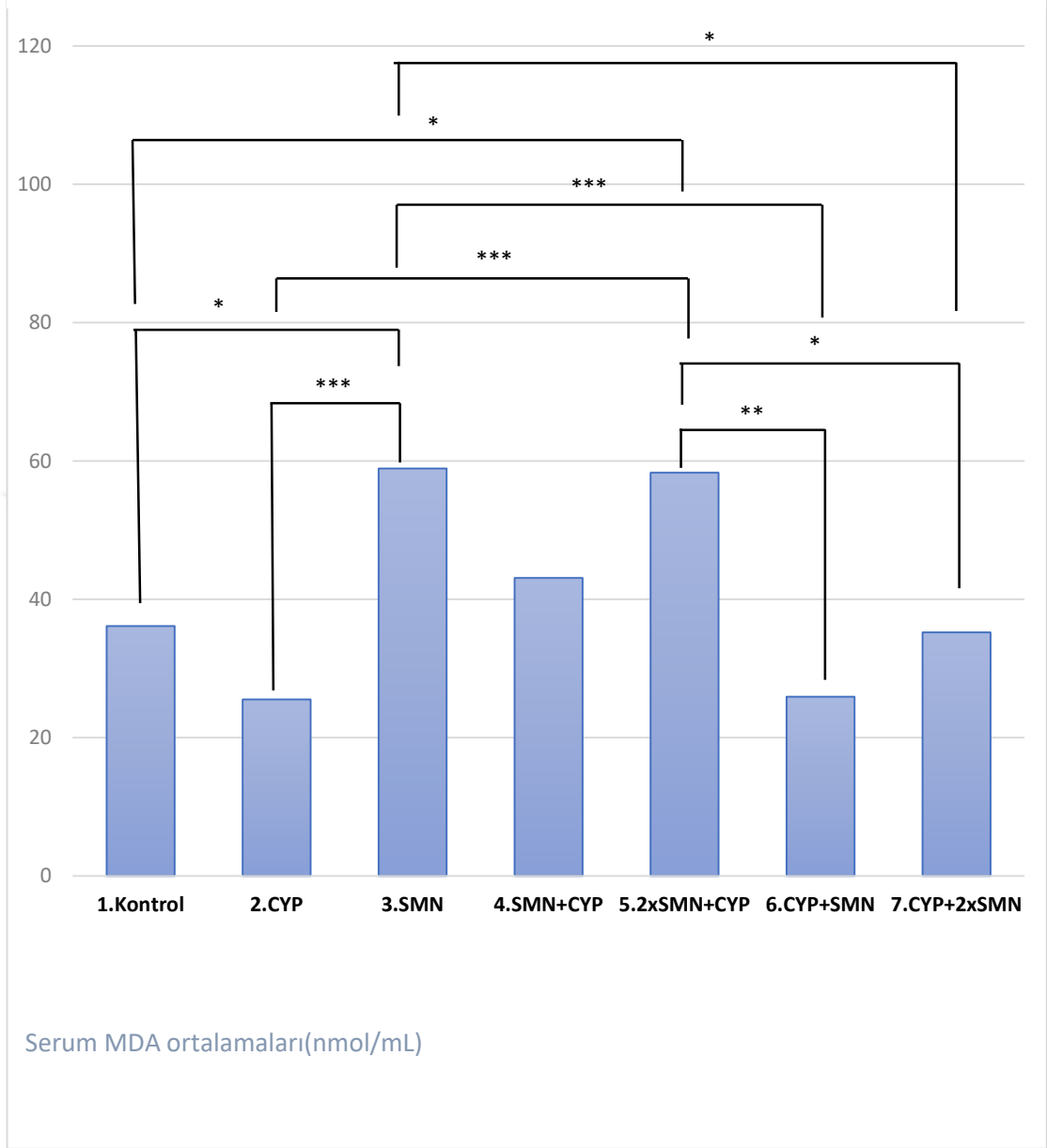
Serum MDA seviyesi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 15). SMN grubunun serum MDA seviyesi değerleri Kontrol, CYP, CYP+SMN, ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p değerleri sırasıyla, $p=0,02$, $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p=0,01$).

Tablo 15. Serum MDA seviyeleri grup ortalamaları , min-max değerleri

Grup No ,isim	Serum MDA ortalamaları(nmol/mL) ± Standart sapma	Min-Max değerler (nmol/mL)	p değeri
1.Kontrol	36,1±14,8	15,9-57,2	<i>p<0,001</i>
2.CYP	25,5±3,8	22,6-33,4	
3.SMN	58,9±20,3	24,8-77,5	
4.SMN+CYP	43,1±5,3	36,3-51,3	
5.2xSMN+CYP	58,3±10,1	47-78,6	
6.CYP+SMN	25,9±7,5	19,2-37,7	
7.CYP+2xSMN	35,2±14,0	20,1-61,9	

Benzer şekilde, 2xSMN+CYP grubunun serum MDA seviyesi değerleri Kontrol, CYP, CYP+SMN, ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p değerleri sırasıyla, p=0,02, p<0,001, p<0,001 ve p=0,02). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p>0,05) (Grafik 7).

Grafik 7. Serum MDA seviyeleri grafik gösterimi(*p<0,05, **p<0,01, *p<0,001)**



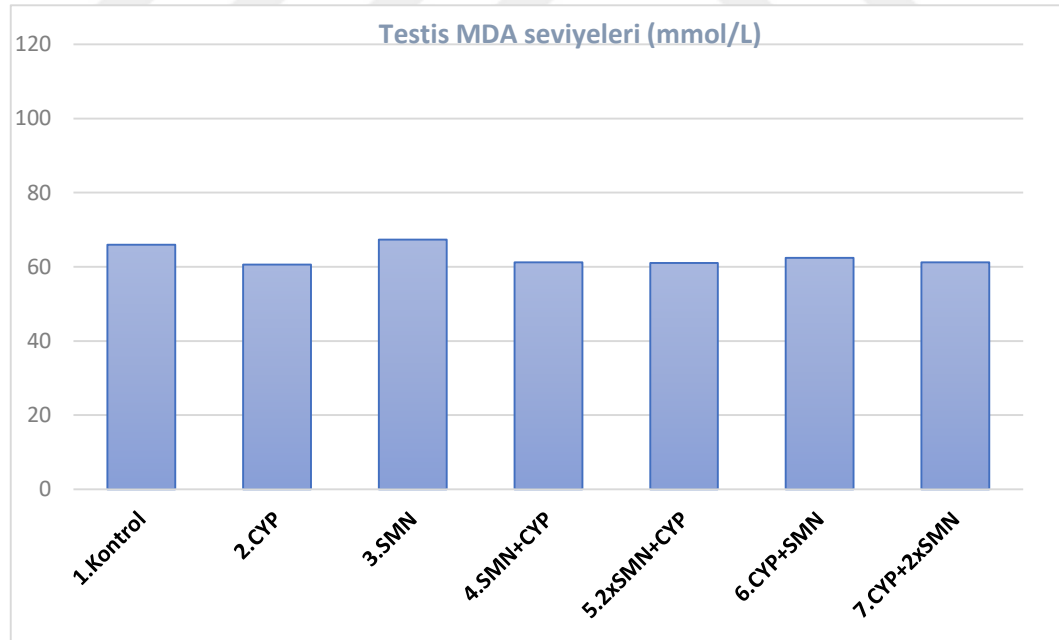
4.5.8. Testis MDA Seviyeleri

Gruplar testis MDA seviyesi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi ($p=0,34$)

Tablo 16. Testis MDA seviyeleri grup ortalamaları , min-max değerleri

Grup No ,isim	Testis MDA ortalamaları(nmol/mL) $\pm$ Standart sapma	Min-Max değerler (nmol/mL)	p değeri
1.Kontrol	66 $\pm$ 14,8	42,3-78,6	$p=0,34$
2.CYP	60,6 $\pm$ 1,3	59,3-62,4	
3.SMN	67,3 $\pm$ 6,7	59,8-79,1	
4.SMN+CYP	61,2 $\pm$ 3,6	55,8-67,0	
5.2xSMN+CYP	61 $\pm$ 2,4	58,3-63,9	
6.CYP+SMN	62,4 $\pm$ 3,5	56,3-65,9	
7.CYP+2xSMN	61,2 $\pm$ 5,6	51,4-67	

Grafik 8. Testis MDA seviyeleri grafik gösterimi



4.6. HORMONAL ANALİZLER

Serum total testosteron, FSH ve LH değerleri ise Düzce Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ELISA yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

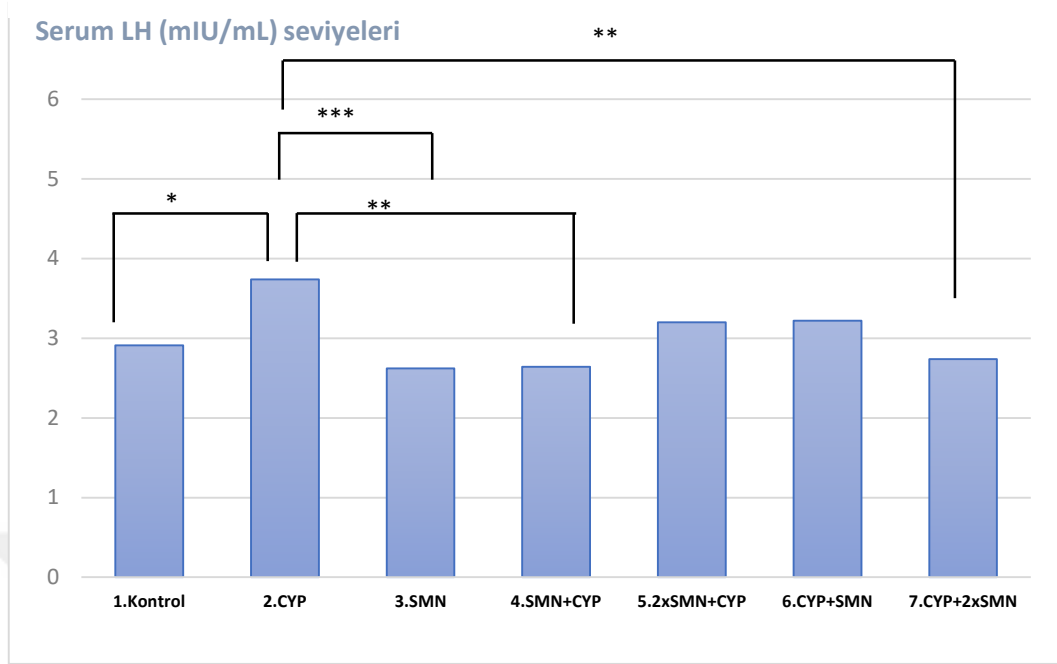
4.6.1. Serum LH seviyeleri

Gruplar serum LH seviyesi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($p<0,001$) (Tablo 17). Sonuçlar daha ayrıntılı olarak incelendiğinde, CYP grubunun serum LH seviyesi değerleri Kontrol, SMN, SMN+CYP ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,05$, $p<0,001$, $p=0,002$ ve $p=0,003$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Grafik 9).

Tablo 17. Serum LH seviyeleri grup ortalamaları , min-max değerleri

Grup No ,isim	Serum LH (mIU/mL) ± Standart sapma	Min-Max; Medyan değerler (mIU/mL)	p değeri
1.Kontrol	2,91±0,34	3,48-2,57 ; 2,81	$p<0,001$
2.CYP	3,74±0,28	3,38-0,04; 3,74	
3.SMN	2,62±0,27	2,22-2,90; 2,62	
4.SMN+CYP	2,64±0,48	2,11-3,49; 2,56	
5.2xSMN+CYP	3,20±0,81	2,47-4,52; 2,78	
6.CYP+SMN	3,22±0,24	2,94-3,55; 3,22	
7.CYP+2xSMN	2,74±0,44	2,19-3,36; 2,74	

Grafik 9. Serum LH seviyeleri grafik gösterimi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)



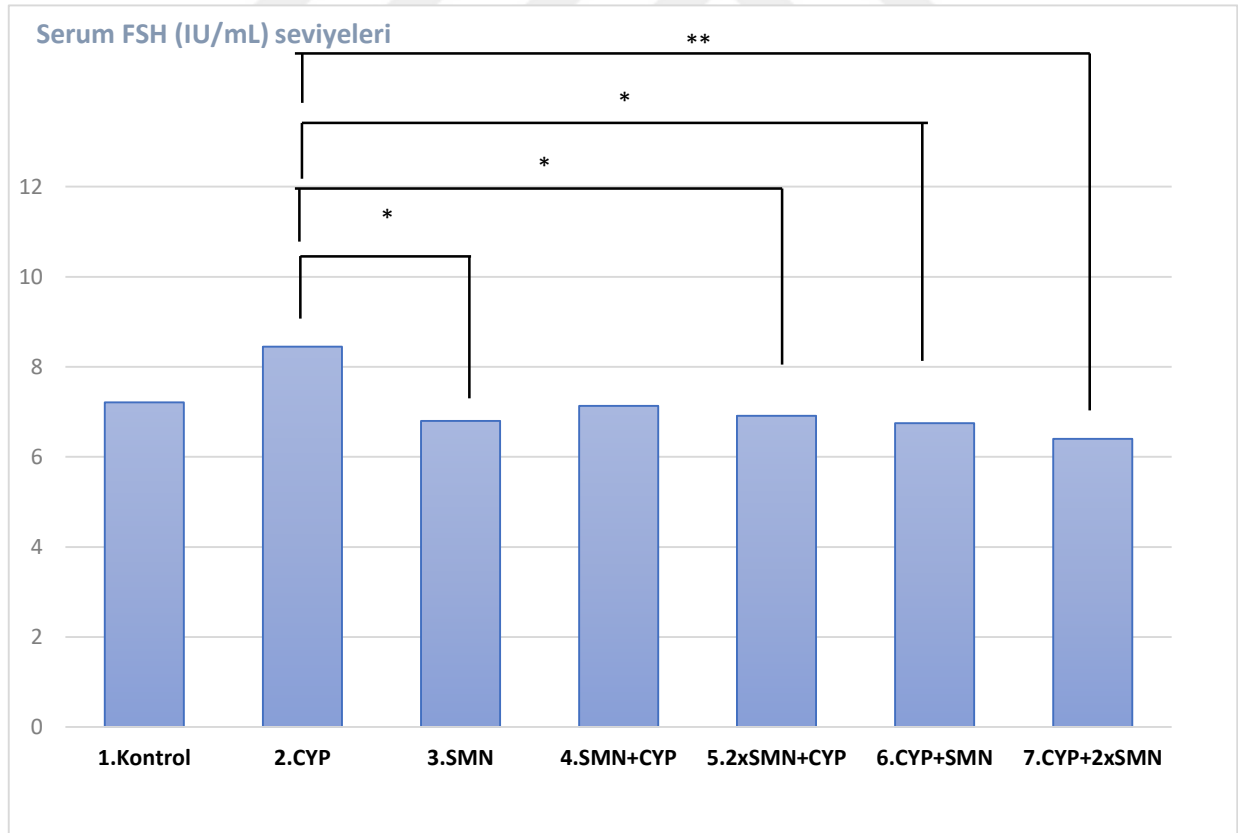
4.6.2. Serum FSH seviyeleri

Gruplar serum FSH seviyesi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($p=0,007$) (Tablo 18). Sonuçlar daha ayrıntılı olarak incelendiğinde, CYP grubunun serum FSH seviyesi değerleri SMN, 2xSMN+CYP, CYP+SMN ve CYP+2xSMN gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,03$, $p=0,05$, $p=0,03$ ve $p=0,003$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Grafik 10).

Tablo 18.Serum FSH seviyeleri grup ortalamaları , min-max değerleri

Grup No ,isim	Serum FSH (IU/mL) ± Standart sapma	Min-Max; Median değerler (mIU/mL)	p değeri
1.Kontrol	7,21±0,36	6,75-7,62 ; 7,21	p=0,007
2.CYP	8,45±1,14	6,51-10,2; 8,49	
3.SMN	6,80±1,07	5,17-7,92; 6,93	
4.SMN+CYP	7,13±1,36	4,91-8,67; 7,34	
5.2xSMN+CYP	6,91±0,70	5,74-8,04; 6,91	
6.CYP+SMN	6,75±0,43	2,94-7,24; 6,72	
7.CYP+2xSMN	6,40±0,80	5,24-7,65; 6,40	

Grafik 10. Serum FSH seviyeleri grafik gösterimi (*p<0,05, **p<0,01)



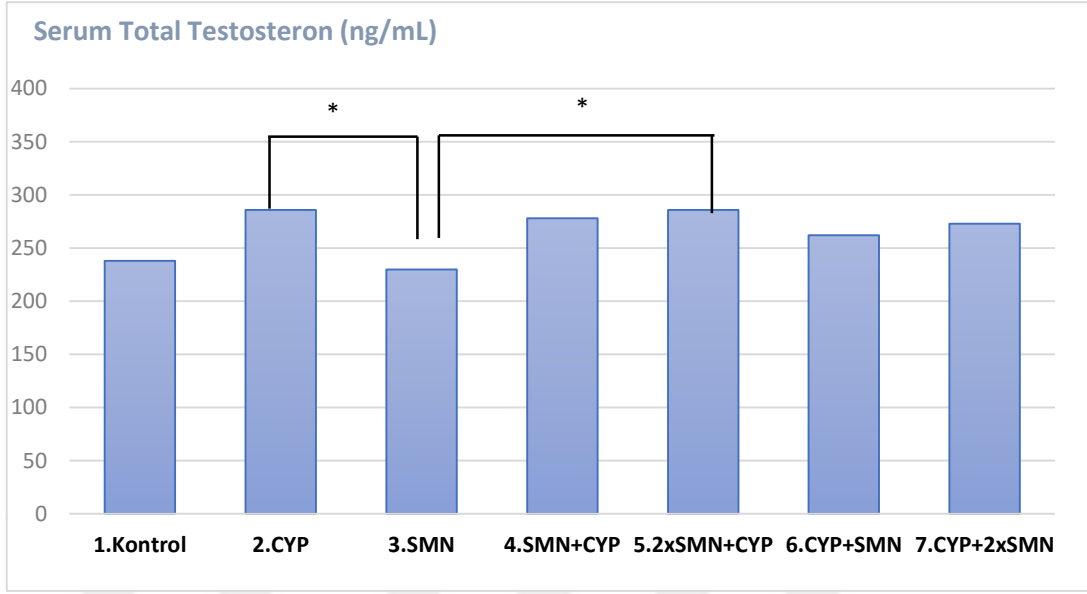
4.6.3. Serum Total Testosteron seviyeleri

Testosteron seviyesi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($p=0,008$)(Tablo 19). Sonuçlar daha ayrıntılı olarak incelendiğinde, SMN grubunun serum total testosteron seviyesi değerleri CYP ve 2xSMN+CYP gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptandı ($p=0,03$ ve $p=0,03$). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Grafik 11).

Tablo 19. Serum Total Testosteron seviyeleri grup ortalamaları , min-max değerleri

Grup No ,isim	Total Testosteron (ng/mL) $\pm$ Standart sapma	Min-Max; Median değerler (ng/mL)	p değeri
1.Kontrol	238 $\pm$ 31,1	205-285 ; 238	$p=0,008$
2.CYP	286 $\pm$ 21,4	252-318; 285	
3.SMN	230 $\pm$ 21,9	191-257; 230	
4.SMN+CYP	278 $\pm$ 56	165-317; 299	
5.2xSMN+CYP	286 $\pm$ 14,7	266-310; 286	
6.CYP+SMN	262 $\pm$ 35,9	306-199; 267	
7.CYP+2xSMN	273 $\pm$ 24,3	303-228; 275	

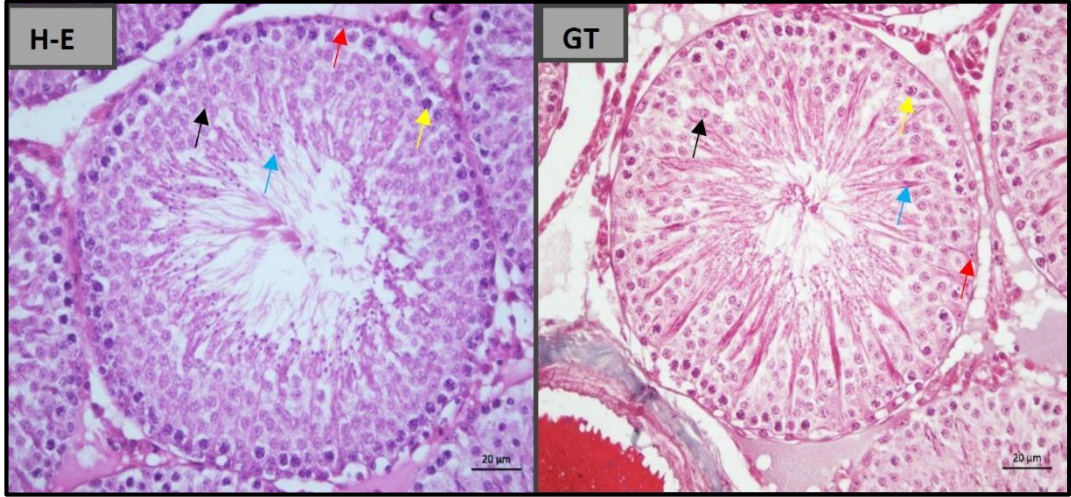
Grafik 11. Serum Total Testosteron seviyeleri grafik gösterimi (*p<0,05)



4.7. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

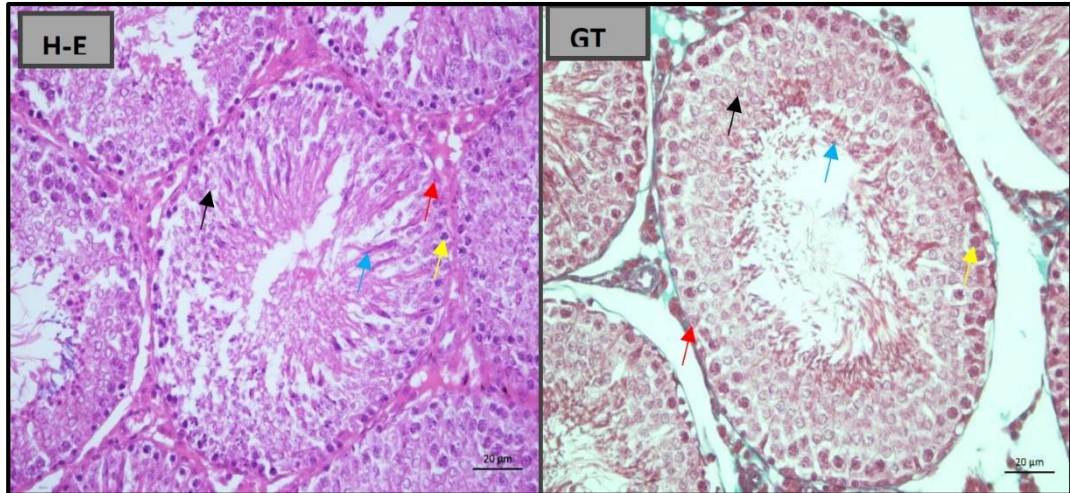
Hematoxilen-eozin ve Gomori trikrom boyamasıyla; testis kapsülü (tunica albuginea), seminifer tübüller arasındaki bağ dokusu (interstisyel alan), bazal membran yapısı, spermatogenik seriye ait hücreler ve spermatogenezis (Johnsen skorlamasına göre) değerlendirildi. Değerlendirmeler Olympus BX50 mikroskopu ile yapıldı.

1.Kontrol Grubu: Kontrol grubundaki deneklerin seminifer tübülleri incelendiğinde seminifer tübüllerin düzenli olduğu ve tüm spermatogenik seri hücrelerinin normal spermatogeneze uygun olarak germinal epitelde bulunduğu gözlemlendi(Şekil 18).



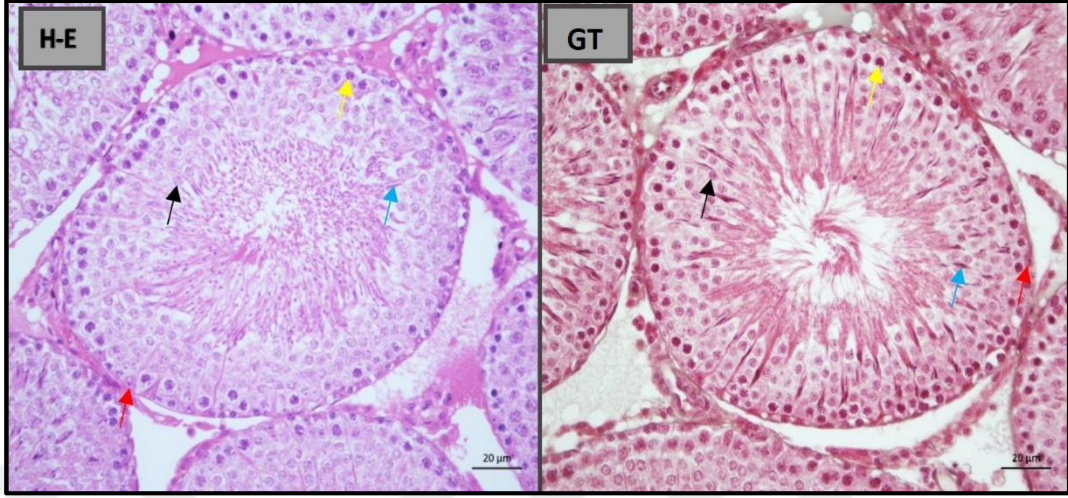
Şekil 18. Kontrol grubuna ait testisin normal histolojik görüntüleri (400x) . (H-E, hematoksilin-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatitleri göstermektedir.)

2.Siklofosfamid Grubu (CYP): Siklofosfamid uygulanan gruptaki deneklerin seminifer tübüllerinin düzensiz olduğu ve tübüllerde spermelerin olmadığı ya da çok az olduğu, çok sayıda erken ve geç spermatit olduğu gözlemlendi. Bağ doku kaybı , leydig hücrelerinde dejenerasyon ve germinal epitel çevresinde artmış vakuolizasyonlar izlendi (Şekil 19).



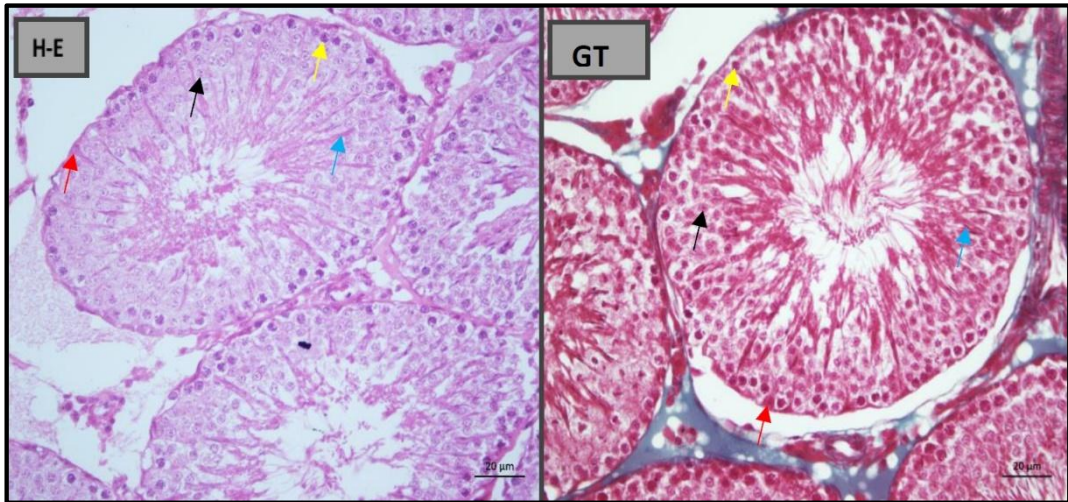
Şekil 19. CYP grubuna ait testisin histolojik görüntüleri (H-E, hematoksilin-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatitleri göstermektedir.)

3.Silimarin Grubu (SMN): Silimarin grubunda seminifer tübüller kontrol grubuna benzer şekilde düzenli ve normaldi (Şekil 20).



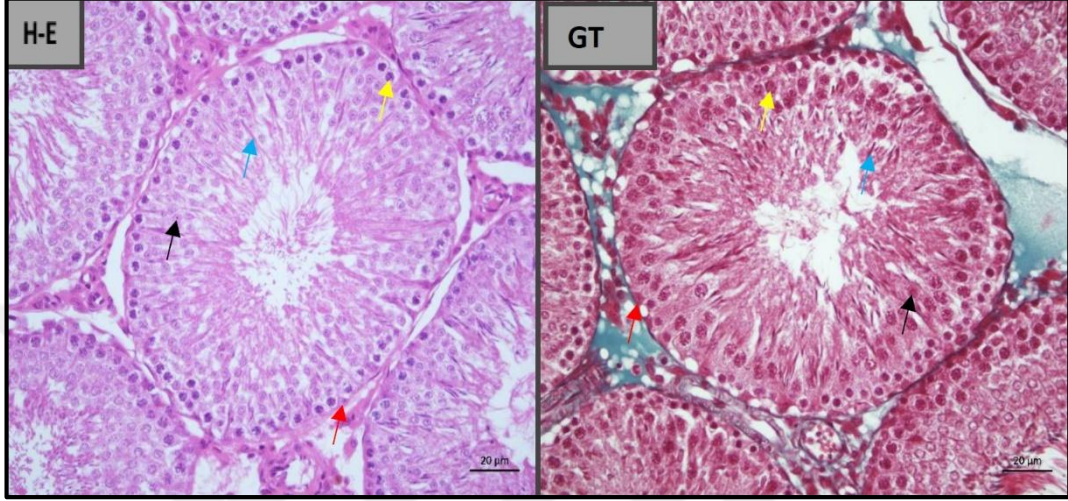
Şekil 20. SMN grubuna ait testisin normal histolojik görüntüsü (H-E, hematoksilin-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatidleri göstermektedir.)

4. Silimarin + Siklofosamid grubu (SMN+CYP): Önce silimarin akabinde siklofosamid uygulanan grubun seminifer tübüllerinde yer yer düzensizleşme ve çok az sayıda sperm, çok sayıda erken ve geç spermatit içerdiği gözlemlendi. Kontrol grubuna göre daha fazla hasar ama CYP grubuna kıyasla daha az bozulma olduğu izlendi (Şekil 21).



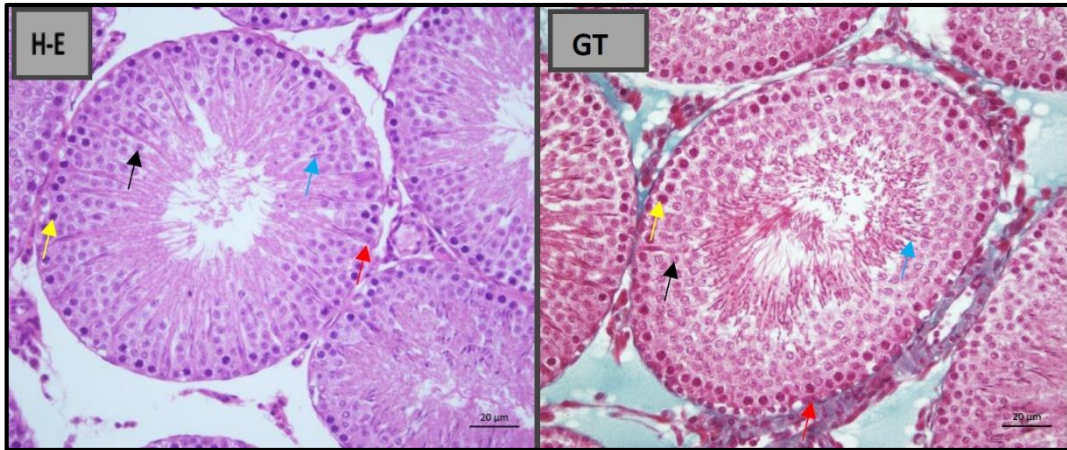
Şekil 21. SMN+CYP grubuna ait testisin histolojik görüntüsü (H-E, hematoksilin-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatidleri göstermektedir.)

5. 2xSilimarin + Siklofosfamid grubu (2xSMN+CYP): Önce iki kat daha fazla silimarin ve akabinde siklofosfamid uygulanan grupta seminifer tübüllerinin düzensiz olduğu ve tübüllerde çok sayıda olgun sperm, erken- geç spermatit ve spermatosit olduğu gözlemlendi (Şekil 22).



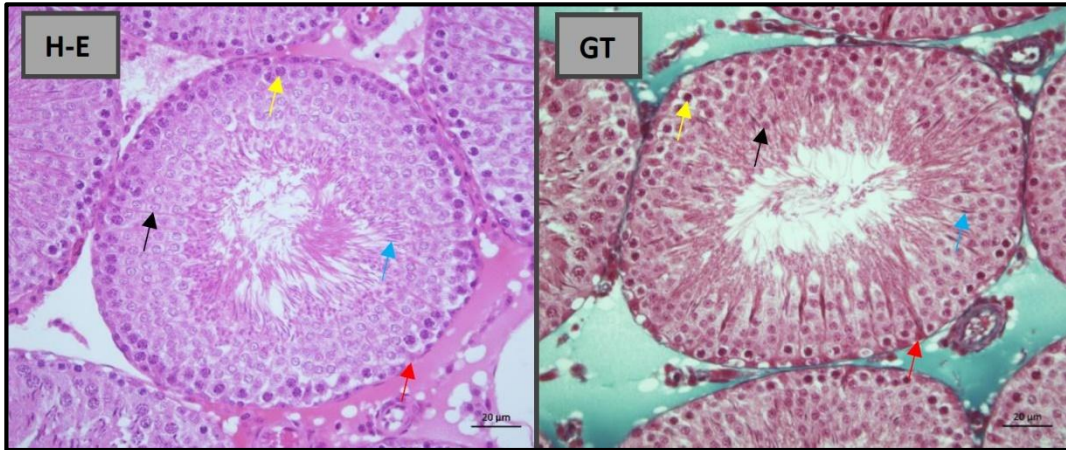
Şekil 22. 2xSMN+CYP grubuna ait testisin histolojik görüntüsü (H-E, hematoxilen-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatidleri göstermektedir.)

6. Siklofosfamid +Silimarin grubu (CYP+ SMN): Siklofosfamid akabinde silimarin uygulanan grupta seminifer tübüllerin büyük çoğunluğunun düzenli olduğu ve tübüllerde çok sayıda olgun sperm, erken-geç spermatit ve spermatositlerin olduğu gözlemlendi (Şekil 23). Kontrol grubuna göre daha fazla hasar ama CYP grubuna kıyasla daha az bozulma olduğu izlendi.



Şekil 23. CYP+ SMN grubuna ait testisin histolojik görüntüsü (H-E, hematoksilin-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatidleri göstermektedir.)

7. Siklofosfamid +2xSilimarin grubu (CYP+ 2xSMN): Önce siklofosfamid akabinde iki katı silimarin uygulanan grupta seminifer tübüllerin büyük çoğunluğunun düzenli olduğu ve tübüllerde çok sayıda olgun sperm, erken ve geç spermatit ve spermatosit olduğu gözlemlendi (Şekil 24).



Şekil 24. CYP+ 2xSMN grubuna ait testisin histolojik görüntüsü (H-E, hematoksilin-Eozin boyası ile boyanmış seminifer tübül, GT, Gomori trikrom boyası ile boyanmış seminifer tübül. Kırmızı ok; sertoli hücreleri, Sarı ok; primer spermatosit, Siyah ok; erken spermatit, Mavi ok; geç spermatidleri göstermektedir.)

4.7.1. Johnsen Skorlamaları

Hematoksilen-eozin boyanmış her bir kesitten yaklaşık 30 adet yuvarlak seminifer tübül seçilerek Johnsen skorlamaları iki kör uzman tarafından yapıldı. Sonra gruplardaki her bir denek için ortalama bir değer hesaplandı ve gruplar karşılaştırıldı. Grupların birbirleri ile yapılan karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ($p<0,0001$) (Tablo 20).

Tablo 20. Gruplar arası Johnsen skoru ölçümlerinin karşılaştırılması. ($P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)

Grup No ,isim	Johnsen Skorlaması $\pm$ standart sapma	Gruplar arası karşılaştırma,p değeri
1.Kontrol	9,750 $\pm$ 0,4443	$p<0,0001$
2.CYP	7,250 $\pm$ 0,7864	
3.SMN	9,500 $\pm$ 0,5130	
4.SMN+CYP	8,250 $\pm$ 0,6387	
5.2xSMN+CYP	8,650 $\pm$ 0,5871	
6.CYP+SMN	9,150 $\pm$ 0,7452	
7.CYP+2xSMN	9,250 $\pm$ 0,4443	

Grupların birbirleri arasında yapılan Johnsen skorlarının karşılaştırmalarına bakıldığında CYP grubunun Kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük skora sahip olduğu belirlendi ($p<0,0001$).

SMN grubunun skoru Kontrol grubu ile benzerdi ($p=0,479$), ama CYP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldi ($p<0,0001$).

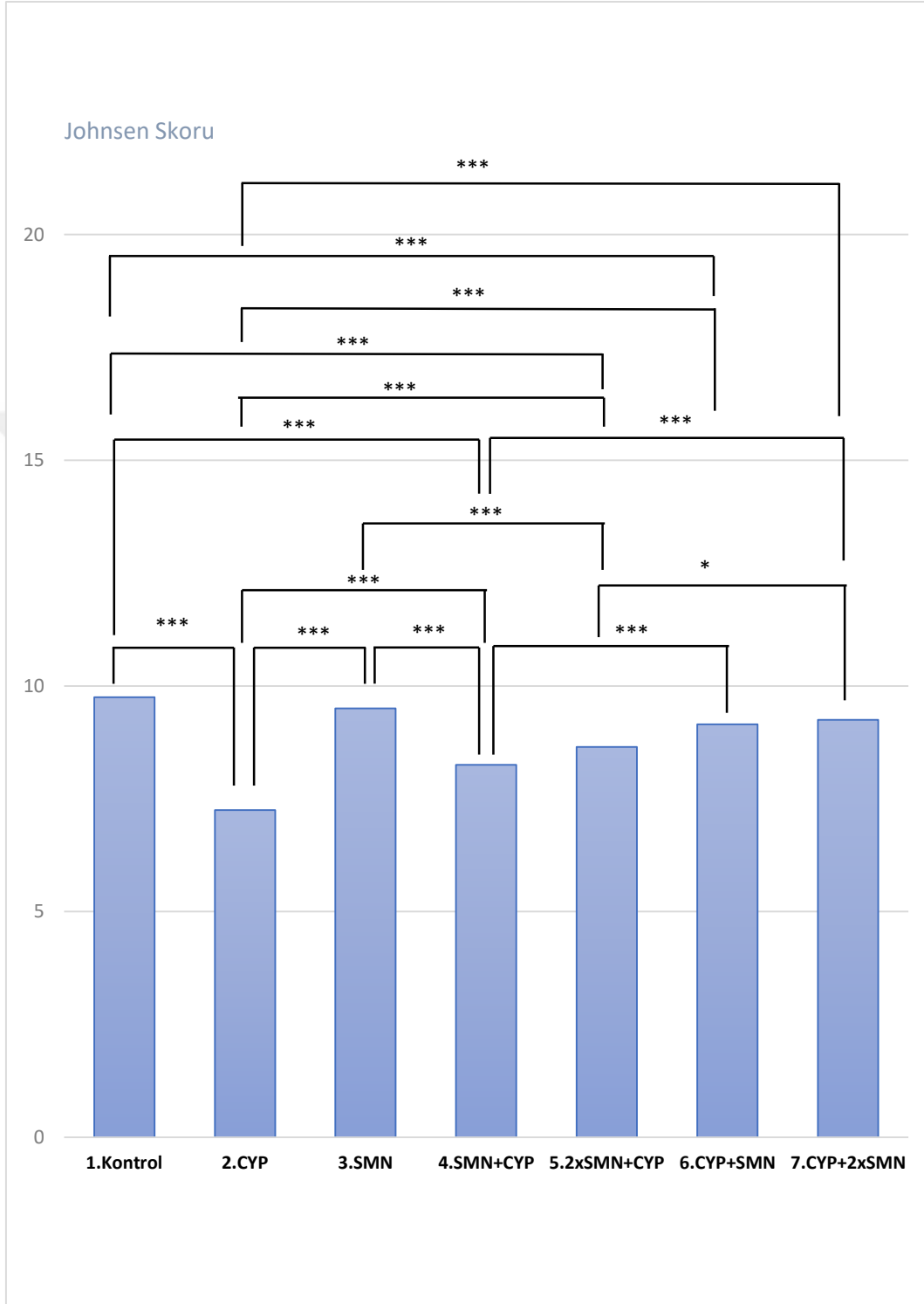
SMN+CYP grubunda, kontrol ($p=0,196$) ve SMN ($p<0,0001$) gruplarına kıyasla Johnsen skorunun düştüğü, ancak CYP grubuna kıyasla arttığı belirlendi ($p<0,0001$).

2xSMN+CYP uygulanan bu grupta, Kontrol ($p<0,0001$) ve SMN ($p=0,0002$) gruplarına kıyasla Johnsen skorunun düştüğü, ancak CYP grubuna kıyasla arttığı belirlendi ($p<0,0001$), ancak SMN+CYP grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,1815$).

CYP+SMN grubu, Kontrol ($p<0,0001$) grubuna kıyasla Johnsen skorunun düştüğü, ancak CYP ($p<0,0001$) ve SMN+CYP ($p<0,0001$) gruplarına kıyasla arttığı belirlendi, ancak SMN ($p=0,2544$) ve 2xSMN+CYP ($p=0,07$) gruplarıyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

CYP+2xSMN grubunun Johnsen skoru Kontrol grubu ile benzerdi ($p=0,07$). Ancak CYP+2xSMN grubu Johnsen skorunun, CYP ($p<0,0001$), SMN + CYP ($p<0,0001$) ve 2xSMN + CYP ($p=0,0196$) gruplarına kıyasla arttığı belirlendi. Grupların birbirleri arasındaki ilişkisi ve istatistiksel anlamlı olanlar Grafik 12’de gösterilmiştir.

Grafik 12. Grupların Johnsen skoru ve gruplar arası kıyaslamaların grafiksel gösterimi(*p<0,05, *p<0,001)**



5. TARTIŞMA

Siklofosfamide bağılı infertilite gelişiminde DNA alkilenmesi, oksidatif strese artış ve bunların etkisiyle ortaya çıkan inflamasyonla beraber nekrotik süreç etkilidir. İnfertiliteyi engellemeye yönelik daha önce birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda CYP' nin oksidatif hasarını önlemeye yönelik olarak antioksidan maddeler denenmiştir. Bazı antioksidan maddelerin CYP' ye bağılı infertiliteyi önlemede yardımcı olabileceği gösterilmiştir(39–42).

Silimarinin kimyasal olarak indüklenen hücresel karsinogenezi engellediği, antidiyabetik, antienflamatuvar, hipolipidemik ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (45–48). Silimarin ve diğer polifenollerin antioksidan aktivitesinin vücut savunma sistemine doğrudan katkısı olduğu gösterilmemekle beraber antioksidan aktivitenin indüklenmesini sağlayarak etki ettiği düşünülmektedir. Bu konuda sınırlı çalışmalar mevcuttur. Nrf2 ve NF-κB ve ilgili gen ve proteinlerinin etkisiyle antioksidan ve antikanser etkilerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (54). Silimarinin farklı kimyasallara bağılı gelişen infertilite, over toksisitesi ve testiküler hasarı koruyabileceği gösterilmiştir (49,50). Sisplatin, doxorobicin , metotreksat , streptozotocin , alkol ve kadmiyumla indüklenen testiküler hasarlarda koruyucu rolü olabileceği gösterilmiştir (10,51–53). Silimarinin tedavi edici ve koruyucu olarak etkinliğini araştırdığımız çalışmamızda biz de benzer sonuçlarla karşılaştık.

Siklofosfamidin farklı dozlarına bağılı vücut ağırlıklarında azalma olmaktadır. Manson'a göre vücut ağırlığı değişiklikleri farelerde genellikle ilk gözlemlenen toksisite göstergesidir. Daha sonra Zhang ve ark. tarafından yapılan çalışmada da benzer olarak siklofosfamide bağılı toksisitenin en önemli göstergelerinden biri olarak vücut ağırlık değişimi ön plana çıkmaktadır (85–87). Kanno ve ark. yaptığı bir çalışmada farklı dozlardaki siklofosfamid 6 haftalık periyotta haftada bir i.p. uygulanmış ve vücut ağırlıklarını nasıl etkilediğine bakılmıştır, bu çalışmanın sonucunda diğer çalışmalara benzer şekilde anlamlı düzeyde kilo kaybına neden olduğu gösterilmiştir(85). Bizim çalışmamızda da siklofosfamid verilen grupta denek ağırlık kaybı yaşanmıştır. Diğer gruplarda ise silimarinin bu konuda koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür.

Silimarinin tek başına verildiğinde vücut ağırlığında farklı etkilerinin olduğu çalışmalar bildirilmiştir. Vargas ve ark. yaptığı deneysel bir çalışmada düzenli egzersiz programının simüle edilmiş ve silimarin supplementlerinin vücut ağırlık kazancı ve spor performansına etkisine bakılmıştır. Silimarin supplementiyle desteklenen ratların vücut kitlesinde ve kas kitlesinde silimarin verilmeyen gruplara göre artış olduğu belirtilmiştir(88). Sayın ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda silimarin desteğinin insülin ve leptin duyarlılığını artırarak hiperlipidemiye önlediği ve kilo artışını azalttığı belirtilmiştir (89). Guo ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, obezitenin simüle edildiği farelerde vücut ağırlığı ve epididimal yağ kütleleri değerlendirilmiş ve 3 hafta (günde 30-60 mg/kg) silimarin tedavisi uygulanan grupta vücut ağırlık kaybı gözlemlenmiştir (90). Çalışmamızda, silimarin fındık yağında çözülmüş ve bu nedenle tüm gruplara çözücü olarak fındık yağı verilmiştir. Sonuçlarımız diğer çalışmalara benzer şekilde, silimarin tek başına uygulandığında deneklerin vücut ağırlığını azalttığını göstermektedir.

Siklofosfamidin testis ağırlığı ve testis ağırlık indeksi (TAİ) üzerindeki etkisine bakıldığında farklı çalışma sonuçları olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda siklofosfamide maruziyet süresine bağlı olarak testis ağırlıklarının değiştiği görülmektedir. Ghosh ve ark. yaptığı bir çalışmada 1 ay süreyle günde 5 mg/kg siklofosfamid verilen ratlarda gametojenik aktivite ve testiküler ağırlıklar değerlendirilmiştir. Bu çalışmada siklofosfamidin testis ağırlığı ve TAİ' yi azalttığı gösterilmiştir (91). AbdElrazek ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada kitosanın CYP' ye bağlı testis hasarındaki koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmada ise 150 mg/kg i.p. siklofosfamid verilen fareler 60 gün takip edilmiş ve sonuç olarak testis ağırlığının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı izlenmiştir. Shabaan ve ark. yaptığı bir çalışmada siklofosfamidin testiküler hasarı üzerine silimarinin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada 100 mg/kg i.p. (bir kez) siklofosfamid ,200 mg/kg i.p. silimarin olarak (her gün) enjekte edilmiş ve çözücü madde olarak carboxy-methylcellulose kullanılmış. 6 haftalık takip sonrasındaki değerlendirmeye göre silimarin grubunda testis ağırlığında anlamlı düzeyde artış izlenmiş. Tedavi (cyp+smn grubu) grubunda ise normal testis ağırlık düzeylerine çıkamasa da

siklofosfamidin etkisini azaltabileceği gösterilmiş. Bizim çalışmamızda toplam testis ağırlıkları ve TAI' de gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Bunun sebebinin çalışma süremizin diğer çalışmalara oranla daha kısa olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Siklofosfamidin kronik kullanımından sonra testislerin atrofiye gidebileceği bildirilmiştir. Testisin transvers ve longitudinal çaplarının ölçüldüğü ve sisplatinle bağlı testiküler hasarı ve silimarin etkisinin incelendiği ratlar üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda testis çapları üzerinde değişiklik göstermediği bulunmuştur. Şahmelikoğlu'nun bu çalışmasında deney süresi 7 gündür ve toksik ajan olarak sisplatin kullanmıştır (92). Deney süresi 14 gün olarak dizayn edilen çalışmamızda toksik ajan olarak siklofosfamid kullanıldı ve sonuçlar benzerdi.

Alkilleyici ajanların sitotoksik etkilerinin yanında ortak özellikleri olarak oksidatif stresi arttırdıkları bilinmektedir. Oksidan-antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması sonucunda oksidatif stres artmakta ve hücrel hasar meydana gelmektedir. Oksidatif stres antioksidan ve oksidan maddelerin eliminasyonunda görevli proteinlerin dejenerasyonu sonrasında ortaya çıkmaktadır. Bazı antioksidan maddelerin CYP' oksidatif hasarını önlemede yardımcı olabileceği gösterilmiştir (39–42). Yapılan birçok çalışmada CYP'nin serum ve dokudaki TOS seviyelerini arttırdığı, TAS seviyelerini düşürdüğü ve buna bağlı olarak OSI yüksek olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak CYP grubunun serum TOS seviyesi Kontrol ve SMN grubuna göre, testis TOS seviyesi ise tüm gruplara kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.

Serum TAS seviyelerine bakıldığı zaman CYP grubunun Kontrol ve SMN gruplarına kıyasla daha düşük antioksidan seviyesi olduğu izlenmektedir. Testis TAS seviyelerine bakıldığında ise SMN grubunun antioksidan seviyesinin CYP ve koruyucu-tedavi gruplarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Literatürde de benzer şekilde silimarinin antioksidan seviyelerini arttırdığı bilinmektedir.

Son organ hasarının meydana gelmesinden oksidan seviyesinin artması ve antioksidan seviyesinin düşmesi sorumludur. Bunun sonucunun en iyi göstergelerinden biri olarak OSI kullanılmaktadır. Siklofosfamidin OSI seviyelerini

arttırdığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda testis ve serum OSI seviyelerine bakıldığında CYP' ye bağlı olarak OSI'nin yükseldiği görülmektedir. Çalışmamızda koruyucu olarak kullanılan her iki grupta ve tedavi edici grupta yüksek dozda silimarinin siklofosfamidin oksidatif hasarını önleyebileceği sonucuna vardık. Bir çalışmada kitosan yüklü nanopartiküllerin siklofosfamidin oksidatif stresini önlediği ve bunu Bax 'ı baskılayarak ve Bcl2 geninin testiküler ekspresyonu arttırarak yaptığı gösterilmiştir. Testiküler CYP11A1, HSD-3b ve StAR gen ekspresyonu arttırarak sterodiogenezin arttığı gösterilmiştir (93). Yaman ve ark. yaptığı bir çalışmada, metotreksatın (MTX) neden olduğu testiküler hasara karşı silimarinin etkisi incelenmiş antioksidan etkisi sayesinde testiküler hasarı önleyebileceği tespit edilmiştir (51). Bu çalışmada testiküler dokularda GPx1 ve SOD2 immünreaktivitesi değerlendirilmiştir. Bu iki enzimin serbest oksijen radikallerini yok etmekle görevli olduğu bilinmektedir. Silimarin tedavisi alan grupta, MTX verilen grupta kıyaslandığında bu enzimlerin düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. MDA, lipid peroksidasyonunun bir biyomarkeri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. MDA düzeylerindeki artışın, oksidatif stres koşulları sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (94). Ayrıca, MDA birikimi, oksidatif membran hasarının önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (95). Yaman ve ark. MTX ve silimarinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, SMN tedavisinin MTX + SMN grubunda MDA seviyelerini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, SMN'nin testis dokusundaki MDA seviyeleri üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu ortaya koymaktadır (51). Bahari ve arkadaşlarının yaptığı güncel bir meta-analiz, silimarin kullanımının MDA seviyelerini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü göstermektedir. Meta-regresyon analizleri, silimarin dozunun veya tedavi süresinin MDA değişimleriyle doğrudan bir ilişki göstermediğini ortaya koysa da, alt grup analizleri tedavi süresinin 24 haftaya uzatılması durumunda MDA seviyelerinde en belirgin azalmanın sağlandığını belirtmiştir. Bu bulgular, silimarinin etkisinin tedavi süresine ve bireysel özelliklere bağlı olarak değişebileceğini, ancak uzun süreli ve uygun dozlarda kullanımının MDA seviyelerini düşürme potansiyeline sahip

olduğunu göstermektedir (96). Bizim çalışmamızda ise testis MDA seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Siklofosfamid tedavisinin total testosteron, FSH ve LH hormonları üzerinde farklı etkiler gösterdiği bildirilmektedir. CYP hipotalamik-pitüiter-gonadal (HPG) aks üzerinde etki ederek testosteron, FSH ve LH seviyelerini düşürebilir. Çalışmalarda siklofosfamidin özellikle yüksek dozlarda kullanıldığında bu hormonların serum seviyelerinde belirgin azalmaya yol açtığı görülmüştür. Bunun nedeni, siklofosfamidin gonadal dokularda oksidatif stres ve inflamasyon oluşturmaları, testiküler hücre hasarına yol açarak hormon sentezini bozmasıdır (91,97). Siklofosfamid kullanımı sonucunda FSH ve LH seviyelerinin artması, ancak total testosteron seviyesinde değişiklik olmaması seminifer tübüllerin zarar görmesinden kaynaklanabilir. Siklofosfamid seminifer tübüllerdeki hasar nedeniyle spermatogenezi bozabilir, bu da FSH ve LH artışına yol açar. Bununla birlikte Leydig hücrelerinin fonksiyonu yeterince korunmuşsa testosteron üretimi etkilenmeyebilir ve bu durum total testosteron seviyelerinde belirgin bir değişiklik olmadan yalnızca FSH ve LH artışı ile kendini gösterebilir (98). Enebelli ve ark. yaptığı çalışmada kadmiyum klorüre maruz kalan sıçanlara silimarin uygulanması sonucunda sadece kadmiyum klorür verilen gruplarla benzer testosteron ve gonadotropin seviyeleri gözlenmiştir. Bu durum silimarinin kadmiyum klorür kaynaklı toksik etkilere karşı minimal düzeyde koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Başka bir deyişle silimarin uygulaması kadmiyumun gonad fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkilerini engelleme konusunda beklenen düzeyde koruma sağlamamıştır(10). Sağlıklı bireylerdeki hormonal etkilerini simüle etmek amacıyla yapılan bir rat çalışmasında silimarin kullanımının farklı sürelerde farklı sonuçlar doğurduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre 4 haftalık kullanım periyodunda silimarin testosteron seviyelerini artırırken, 8 hafta gibi daha uzun süreli kullanımlarda testosteron seviyelerinde anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. Bu düşüşün fitoöstrojen açısından zengin diyetin testosteron sentezini düzenleyen enzimler üzerindeki etkisine bağlandığı belirtilmiştir (99). Bizim çalışmamızda da FSH, LH ve total testosteron seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde siklofosfamid (CYP) grubunda FSH ve LH seviyelerinde anlamlı

bir artış olmasına rağmen, total testosteron seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular silimarinin hipotalamik-pitüiter-gonadal (HPG) aks üzerindeki hormonal dengeyi korumada potansiyel bir destekleyici rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Silimarinin bu koruyucu etkisi özellikle gonadotropin salınımı ile ilgili mekanizmalarda düzenleyici bir işlev üstlenebileceğini göstermektedir.

Ghobadi ve arkadaşlarına göre, ergenlik öncesi bireylerde kronik CYP tedavisi, azalmış ejakulat hacmi, sperm yoğunluğu ve azalmış testosteron seviyeleri gibi anormalliklere yol açar (100). Kemoterapide kullanılan çeşitli CYP dozlarının sperm parametrelerinde sapmalara ve LH-FSH seviyelerinde yükselmeye neden olduğu gösterilmiştir. Çeşitli dozlarda CYP'ye maruz kalma sonucu azospermi ve hormonal anormallikler oluşur ve daha yüksek dozlar daha önemli zarara neden olur. Spermatogenezi göstermede kullanılan birçok skrolama sistemi mevcuttur. Literatür incelendiğinde spermatogenezi iyi öngören Johnsen skrolama sistemi tanı aracı olarak kullanılmaktadır (101,102). Deneysel modellerde spermatogenez değerlendirmesi için sıklıkla Johnsen skrolama sistemi kullanılmaktadır. Literatür taraması sonucunda, siklofosfamidin testis üzerindeki toksik etkilerinden korunmak amacıyla farklı moleküllerin araştırıldığı görülmüştür. Bu moleküller arasında lipoik asit, çinko oksit nanopartikülleri, melatonin, timokinon, gallik asit, berberin ve oleuropein sıralanabilir (40,103–108). Silimarin siklofosfamidin karaciğer, kardiyotoksik ve nefrotoksik etkilerine karşı yapılan çalışmalarda umut vaat eden potansiyel bir ajan olarak belirtilmiştir. Siklofosfamidle indüklenen kardiyak toksisitede kurkumin ve silimarinin etkisine bakılan bir çalışmada eş zamanlı verildiklerinde biyokimyasal ve histolojik olarak iyileştirebileceği ve yüksek doz CYP'de koruyucu olarak verilebileceği belirtilmiştir (109). Başka bir çalışmada MTX kaynaklı nefrotoksisitede silimarinin etkilerine bakılmış ve MTX kaynaklı böbrek hasarını azalttığı gösterilmiştir (110). CYP'ye bağlı hepatotoksisite üzerine silimarinin etkilerini inceleyen bir çalışmada, deneklere 100 mg/kg i.p. siklofosfamid ve 50 mg/kg/gün p.o. silimarin uygulanmış ve deney 6 hafta boyunca devam etmiştir. Sonuçlar, silimarinin siklofosfamid kaynaklı hepatotoksisiteyi iyileştirdiğini ortaya koymuştur.(111).

Siklofosfamidin testiküler hasar üzerindeki etkisine yönelik silimarin kullanımı ise son yıllarda araştırılmaya başlanmış olup, bu konuda sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Mevcut çalışmalarda silimarinin koruyucu ve tedavi edici özellikleri birlikte değerlendirilmiş, ancak yüksek dozajlı uygulamaları yeterince incelenmemiştir (112,113). Bizim çalışmamız, literatürdeki diğer çalışmalardan, farklı dozlama stratejilerini ve tedavi-koruyuculuk etkilerini ayrı ayrı ele alması ile ayrılmaktadır. Shabaan ve ark. yaptığı çalışmada silimarinin siklofosfamidin testiküler hasarı üzerine tedavi edici etkisi 6 haftalık bir deneyle incelemiş ve sonuç olarak testis ağırlığı ve sperm sayısı üzerinde iyileştirici etkisi olduğu bulmuşlardır(113). Kordedeh ve ark. yaptığı başka bir çalışmada ise silimarinin siklofosfamidin testiküler hasarı üzerine tedavi edici etkisi 35 günlük bir deneyle incelenmiştir, siklofosfamid haftada bir 100mg/kg i.p. ve silimarin gün aşırı 200 mg/kg i.p. olarak verilmiştir. Çalışma sonucunda silimarinin testis dokusu ve sperm parametrelerinde iyileştirici özelliği olduğu sonucuna varılmıştır (112). Enebelli ve ark. yaptığı çalışmada kadmiyum klorür ve alkol verilen sıçanlara silimarin koruyucu ve tedavi edici etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuç olarak silimarin uygulaması, alkol ve kadmiyum kloridin erkek üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkilerini hafifletmiştir. Silimarinin tedavi edici etkisi koruyucu etkisine kıyasla oksidatif stres belirteçlerini artırıcı rolünü sınırlamada daha iyi bulunmuştur. Aynı çalışmada, silimarinin önceden uygulanmasının (koruyucu etki), alkol verilen sıçanlarda erkek üreme fonksiyonlarını, alkol sonrası silimarin uygulanan sıçanlara göre daha etkili bir şekilde iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu bulgu, silimarinin alkolün toksik etkilerine karşı önceden alınmasının meydana gelebilecek hasarı en aza indirebileceğini düşündürmektedir (10). Çalışmamızın bulguları bütüncül olarak değerlendirildiğinde, silimarinin siklofosfamide bağlı testiküler hasarı önleyici bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, silimarinin tedavi edici etkisinin koruyucu etkisine göre daha güçlü olduğu ve artan dozlarla iyileşme oranının da arttığı belirlenmiştir. Bu veriler, silimarinin siklofosfamidin yol açtığı hasarı sınırlamak ve iyileştirmek için etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini ortaya koymaktadır.

5.1. Araştırmanın sınırlılıkları

Çalışmada silimarinin oral formda verilmiş olması değişken biyoyararlanım oranları nedeniyle sınırlılık olarak değerlendirilebilir. Çalışma süresinin 14 gün olması, siklofosfamid ve silimarin ile ilgili etkilerin kronik süreçteki değerlendirmesinin yapılmasına olanak tanımamıştır. Ayrıca deneklerin erişkin olması nedeniyle çocukluk ve pubertal dönemdeki etkilerin ve sonuçların kesin olarak simüle edilememesi de bir sınırlılıktır. Testiküler doku hasarının iyileşmesi gözlemlense de fertilizasyon yeteneğini değerlendirmek için dişileri dölleme kapasitesinin test edildiği bir çalışma tasarımı gerekebilir. Histopatolojik incelemelerde immün boyama ve yolak araştırmalarının yapılmamış olması da çalışmanın diğer sınırlılıkları arasındadır.

6.SONUÇ

Bu çalışmada siklofosfamidin sitotoksik etkilerine bağlı olarak oluşan testiküler hasarın azaltılmasında potansiyel bir ajan olarak silimarinin tedavi edici ve koruyucu olarak etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Parametreler değerlendirildiğinde, siklofosfamide bağlı olarak kilo kaybı, oksidatif stresin artışı ve hormonal bozulmaların meydana geldiğini saptadık. Silimarinin koruyucu olarak verildiğinde kilo kaybını azalttığı, hem koruyucu hem de tedavi edici olarak verildiğinde ise oksidatif stresi ve hormonal değişiklikleri azaltabildiği gözlemlenmiştir. H-E ve Gomori trikrom boyama yöntemleriyle yapılan histopatolojik değerlendirmelerde hem koruyucu hem de tedavi edici etkisiyle testiküler hasarı önlediği görülmüştür. Ayrıca, silimarinin tedavi edici etkisinin koruyucu etkisine kıyasla daha güçlü olduğu ve artan dozlarla iyileşme oranının da arttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, siklofosfamid kemoterapisi alan kanser hastalarında fertilitenin korunması açısından silimarinin umut verici bir tedavi olabileceğini gösterdik. Ancak, bu çalışmanın metodolojik sınırlılıklarını ortadan kaldıran ve

immünohistokimyasal yolak araştırmalarını içeren ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tür çalışmaların, silimarinin etkilerini daha kapsamlı bir şekilde değerlendirerek sonuçlarımızı destekleyeceğini düşünmekteyiz.

7.KAYNAKÇA

1. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(11):638–47.
2. Graham MA, Riley RJ, Kerr DJ. Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther*. 1991;51(2):275–89.
3. de Jonge ME, Huitema ADR, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2005;44(11):1135–64. Available from: <https://doi.org/10.2165/00003088-200544110-00003>
4. Flowers JL, Ludeman SM, Gamcsik MP, Colvin OM, Shao KL, Boal JH, et al. Evidence for a role of chloroethylaziridine in the cytotoxicity of cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;45:335–44.
5. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity: characterising and avoiding the problem. *Drugs*. 1991;42:781–95.
6. Langford CA. Complications of cyclophosphamide therapy. *Eur Arch oto-rhino-laryngology*. 1997;254:65–72.
7. Ahmed AR, Hombal SM. Cyclophosphamide (Cytosan): a review on relevant pharmacology and clinical uses. *J Am Acad Dermatol*. 1984;11(6):1115–26.
8. Fairley KF, Barrie J, Johnson W. Sterility and testicular atrophy related to cyclophosphamide therapy. *Lancet*. 1972;299(7750):568–9.
9. Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr Cancer*

Ther. 2007;6(2):120–9.

10. Enebeli B, Nwangwa EK, Nwogueze BC, Nzenegu A, Agbonifo-Chijiokwu E, Omeru O, et al. In Vivo Attenuation of Alcohol- and Cadmium Chloride–Induced Testicular Toxicity Modulated by Silymarin in Male Wistar Rat. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2022;200(8):3666–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02944-3>
11. Rey R, Picard JY. Embryology and endocrinology of genital development. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1998;12(1):17–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950351X98804278>
12. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen’s human embryology. Elsevier Health Sciences; 2014.
13. Witchi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol Carnegie Inst.* 1948;32:67–80.
14. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr Rev.* 2003;24(4):466–87.
15. Prunskaitė-Hyyryläinen R, Skovorodkin I, Xu Q, Miinalainen I, Shan J, Vainio SJ. Wnt4 coordinates directional cell migration and extension of the Müllerian duct essential for ontogenesis of the female reproductive tract. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2016 Mar 15;25(6):1059–73. Available from: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv621>
16. Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, et al. Anti-Müllerian hormone in early human development. *Early Hum Dev.* 1993;33(2):91–9.
17. Ross MH, Pawlina W, (Çeviri Baykal B.). *Histoloji konu anlatımı ve atlas.* 6. baskı. Palme yayıncılık. 2014. 784–803 p.
18. Hutson JM, Nation T, Balic A, Southwell BR. The role of the gubernaculum

- in the descent and undescend of the testis. *Ther Adv Urol*. 2009;1(2):115–21.
19. Thorup J, Haugen S, Kollin C, Lindahl S, Läckgren G, Nordenskjold A, et al. Surgical treatment of undescended testes. *Acta Paediatr*. 2007;96(5):631–7.
 20. CORTES D, THORUP J, VISFELDT J. Hormonal treatment may harm the germ cells in 1 to 3-year-old boys with cryptorchidism. *J Urol*. 2000;163(4):1290–2.
 21. Ritzén EM, Bergh A, Bjerknes R, Christiansen P, Cortes D, Haugen SE, et al. lackgren G, Main KM, Nordenskjold A, Rajpert-De ME, Soder O, Taskinen S, Thorsson A, Thorup J, Toppari J, Virtanen H. Nordic consensus on treatment of undescended testes. *Acta Paediatr*. 2007;96:638–43.
 22. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology* (13th ed), Wolters Kluwer Health, Alphen Aan Den Rijn. In 2015. p. 261–5.
 23. Paulsen F, J. W. Sobotta Atlas of Human Anatomy (15th ed). Elsevier, Munich,. In 2011. p. 616–22.
 24. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The developing human-e-book: clinically oriented embryology*. Elsevier Health Sciences; 2018.
 25. Gong YG, Feng MM, Hu XN, Wang YQ, Gu M, Zhang W, et al. Peptidergic not monoaminergic fibers profusely innervate the young adult human testis. *J Anat [Internet]*. 2009 Mar 1;214(3):330–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01038.x>
 26. Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol [Internet]*. 2016;59:166–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952116301793>
 27. Mancuso F, Calvitti M, Milardi D, Grande G, Falabella G, Arato I, et al. Testosterone and FSH modulate Sertoli cell extracellular secretion: Proteomic analysis. *Mol Cell Endocrinol [Internet]*. 2018;476:1–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720718301205>

28. Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2010;365(1546):1593–605.
29. Kızılay F, Altay B. Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. *Androloji Bülteni*. 2019;21(4):177–84.
30. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Sperm. In: *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. Garland Science; 2002.
31. TEMEL MK. Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. *Turkish J Oncol Onkol Derg*. 2015;30(1).
32. Toptancı BÇ, Kizil G, Kizil M. DNA damage mechanisms of anti-cancer drugs. *Middle East J Sci*. 2016;2(1):33–49.
33. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. *Hacettepe Univ J Fac Pharm*. 2011;(2):137–50.
34. Grochow LB, Colvin M. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1979;4(5):380–94. Available from: <https://doi.org/10.2165/00003088-197904050-00004>
35. Voelcker G. The mechanism of action of cyclophosphamide and its consequences for the development of a new generation of oxazaphosphorine cytostatics. *Sci Pharm*. 2020;88(4):42.
36. Hoorweg-Nijman JJG, de Waal HAD van, de Waal FC, Behrendt H. Cyclophosphamide-induced disturbance of gonadotropin secretion manifesting testicular damage. *Acta Endocrinol (Copenh)* [Internet]. 1992 Feb 1;126(2):143–8. Available from: <https://doi.org/10.1530/acta.0.1260143>
37. Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*. 2006;222(1–2):60–70.
38. Hosseini A, Zare S, Borzouei Z, Pakdel FG. Cyclophosphamide-induced testicular toxicity ameliorate by American ginseng treatment: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 2018;16(11):711.

39. Salimnejad R, Soleimani Rad J, Mohammad Nejad D, Roshangar L. Effect of ghrelin on total antioxidant capacity, lipid peroxidation, sperm parameters and fertility in mice against oxidative damage caused by cyclophosphamide. *Andrologia*. 2018;50(2):e12883.
40. Altuntaş H, Özdemir M, Harmancı N, Yiğitaslan S, Şahintürk V. The Effect of Berberine on the Prevention and/or Treatment on Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage in Rats. *Osmangazi Tıp Derg*. 2023;45(2):161–71.
41. Quita SM. Evaluation of lemon fruit extract as an antioxidant agent against histopathological changes induced by cyclophosphamide in the testes of albino mice. *Electron Physician*. 2016;8(1):1824.
42. Afkhami-Ardakani M, Hasanzadeh S, Shahrooz R, Delirez N, Malekinejad H. Antioxidant effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. In: *Veterinary Research Forum*. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran; 2018. p. 35.
43. Corchete P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the Source of Silymarin BT - Bioactive Molecules and Medicinal Plants. In: Ramawat KG, Merillon JM, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 123–48. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4_6
44. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(3):803–6.
45. Mastron JK, Siveen KS, Sethi G, Bishayee A. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. *Anticancer Drugs*. 2015;26(5):475–86.
46. YILDIRIM S, ŞAHİN C, ŞAHİNLER EB, SARICA K. Uluslararası Ürolitiyazis Birliği (IAU) Retrograd İntrarenal Cerrahi Kılavuzu TT - International Urolithiasis Union (IAU) Retrograde Intrarenal Surgery Guide. *Endourol Bull* [Internet]. 2024;16(1):34–9. Available from:

<https://doi.org/10.54233/endourologybull-1370339>

47. El-Far YM, Zakaria MM, Gabr MM, El Gayar AM, El-Sherbiny IM, Eissa LA. A newly developed silymarin nanoformulation as a potential antidiabetic agent in experimental diabetes. *Nanomedicine*. 2016;11(19):2581–602.
48. Borah A, Paul R, Choudhury S, Choudhury A, Bhuyan B, Das Talukdar A, et al. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(11):847–53.
49. Türk P. Siklofosfamide bağlı ovaryan toksisiteyi azaltmada silymarinin rolü. 2016;
50. El-Hameed A, Mahgoub HA, Awadin W, Elshaieb A. The in vivo ameliorative effect of silymarin on cisplatin-associated ovarian and testicular histopathological and biochemical alterations. *Mansoura Vet Med J*. 2021;22(2):65–71.
51. Yaman T, Uyar A, Kaya MS, Keles ÖF, Uslu BA, Yener Z. Protective effects of silymarin on methotrexate-induced damages in rat testes. *Brazilian J Pharm Sci*. 2018;54:e17529.
52. Khoei HH, Fakhri S, Parvardeh S, Mofarahe ZS, Ghasemnejad-Berenji H, Nazarian H, et al. Testicular toxicity and reproductive performance of streptozotocin-induced diabetic male rats: the ameliorating role of silymarin as an antioxidant. *Toxin Rev*. 2018;
53. Malekinejad H, Janbaz-Acyabar H, Razi M, Varasteh S. Preventive and protective effects of silymarin on doxorubicin-induced testicular damages correlate with changes in c-myc gene expression. *Phytomedicine*. 2012;19(12):1077–84.
54. Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*. 2015;4(1):204–47.
55. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem*. 2007;14(3):315–38.
56. Boojar MMA, Boojar MMA, Golmohammad S. Overview of Silibinin anti-

- tumor effects. *J Herb Med.* 2020;23:100375.
57. Rizwan M, Naseem S, Durrani AI. Pharmacokinetics and Therapeutic Potential of Milk Thistle Extracted Phytoconstituents: A Leading Role in Cancer Treatment. *Trends Med Sci.* 2023;3(2).
 58. Hoh C, Boocock D, Marczylo T, Singh R, Berry DP, Dennison AR, et al. Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences. *Clin Cancer Res.* 2006;12(9):2944–50.
 59. Xu Y, Li J, He B, Feng T, Liang L, Huang X. In vitro Dissolution Testing and Pharmacokinetic Studies of Silymarin Solid Dispersion After Oral Administration to Healthy Pigs [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Veterinary Science* . 2022. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.815198>
 60. Aziz M, Saeed F, Ahmad N, Ahmad A, Afzaal M, Hussain S, et al. Biochemical profile of milk thistle (*Silybum Marianum* L.) with special reference to silymarin content. *Food Sci Nutr.* 2021;9(1):244.
 61. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci.* 1985;311(1152):617–31.
 62. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Investig.* 2015;6(3):331–6.
 63. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603–16.
 64. Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(11):1773–82.
 65. Rinaldi C, Donato L, Alibrandi S, Scimone C, D’Angelo R, Sidoti A. Oxidative stress and the neurovascular unit. *Life.* 2021;11(8):767.
 66. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors.* 2008;34:171–80.

67. Xu T, Ding W, Ji X, Ao X, Liu Y, Yu W, et al. Oxidative stress in cell death and cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
68. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2014;224:164–75. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279714003044>
69. Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(7):385–96.
70. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* [Internet]. 2007;12(5):913–22. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
71. Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med*. 2005;11(12):1278–9.
72. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* [Internet]. 2008;266(1):6–11. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383508001390>
73. Wu Q, Ni X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr Drug Targets*. 2015;16(1):13–9.
74. Argüelles S, García S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2004;1674(3):251–9. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416504001710>
75. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2000;29(11):1106–14. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584900003944>
76. Pryor WA, Godber SS. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1991;10(3):177–84. Available

from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158499190073C>

77. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress indexes for diagnosis of health or disease in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
78. Becatti M, Fucci R, Mannucci A, Barygina V, Mugnaini M, Criscuoli L, et al. A biochemical approach to detect oxidative stress in infertile women undergoing assisted reproductive technology procedures. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):592.
79. Lasiene K, Kleina R, Dabuzinskiene A, Gasiliunas D, Juodziukyniene N, Zilaitiene B, et al. The model for estimation of testicular volume in different age male rats—suitability of various testicular volume calculation formulas for living animals. 2024;
80. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277–85.
81. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103–11.
82. Yumru M, Savas HA, Kalenderoglu A, Bulut M, Celik H, Erel O. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2009;33(6):1070–4.
83. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100(1):61–4.
84. Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*. 2003;133(4142):563–6.
85. Kanno TYN, Sensiate LA, Paula NA de, Salles MJS. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian J Pharm Sci*. 2009;45:313–9.
86. Zhang Z, Pan T, Liu C, Shan X, Xu Z, Hong H, et al. Cyclophosphamide induced physiological and biochemical changes in mice with an emphasis

- on sensitivity analysis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;211:111889.
87. Omole JG, Ayoka OA, Alabi QK, Adefisayo MA, Asafa MA, Olubunmi BO, et al. Protective effect of kolaviron on cyclophosphamide-induced cardiac toxicity in rats. *J Evidence-Based Integr Med.* 2018;23:2156587218757649.
 88. Vargas-Mendoza N, Ángeles-Valencia M, Madrigal-Santillán EO, Morales-Martínez M, Tirado-Lule JM, Solano-Urrusquieta A, et al. Effect of silymarin supplementation on physical performance, muscle and myocardium histological changes, bodyweight, and food consumption in rats subjected to regular exercise training. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7724.
 89. Sayin FK, Buyukbas S, Basarali MK, Alp H, Toy H, Ugurcu V. Effects of *Silybum marianum* extract on high-fat diet induced metabolic disorders in rats. *Polish J food Nutr Sci.* 2016;66(1):43–9.
 90. Guo Y, Wang S, Wang Y, Zhu T. Silymarin improved diet-induced liver damage and insulin resistance by decreasing inflammation in mice. *Pharm Biol [Internet].* 2016 Dec 1;54(12):2995–3000. Available from: <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1199042>
 91. Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, Debnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol.* 2002;25(3):281–92.
 92. Şahmelikoğlu AG. Sıçanlarda sisplatin ile oluşturulan testis hasarı üzerine silymarin'in olası etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi. 2023;
 93. Abdelrazek DA, Hassan NH, Ibrahim MA, Hassanen EI, Farroh KY, Abass HI. Ameliorative effects of rutin and rutin-loaded chitosan nanoparticles on testicular oxidative stress and histological damage induced by cyclophosphamide in male rats. *Food Chem Toxicol.* 2024;184:114436.
 94. Yaman T, Yener Z, Celik I. Histopathological and biochemical investigations of protective role of honey in rats with experimental aflatoxicosis. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:1–11.
 95. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in

- rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*. 1981;256(21):10986–92.
96. Bahari H, Shahraki Jazinaki M, Rashidmayvan M, Taheri S, Amini MR, Malekahmadi M. The effects of silymarin consumption on inflammation and oxidative stress in adults: a systematic review and meta-analysis. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2024;32(2):949–63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01423-6>
 97. Khamis T, Hegazy AA, El-Fatah SSA, Abdelfattah ER, Abdelfattah MMM, Fericean LM, et al. Hesperidin mitigates cyclophosphamide-induced testicular dysfunction via altering the hypothalamic pituitary gonadal axis and testicular steroidogenesis, inflammation, and apoptosis in male rats. *Pharmaceuticals*. 2023;16(2):301.
 98. McElhinney L, Raja U. Cyclophosphamide induced seminiferous tubule damage causing raised FSH and LH, and high testosterone levels. In: *Endocrine Abstracts*. Bioscientifica; 2015.
 99. Khalil EAM. Hormonal profile and histopathological study on the influence of silymarin on both female and male albino rats. *Egypt J Hosp Med*. 2003;13(1):112–22.
 100. Panigrahy SK, Jatawa S, Tiwari A. Therapeutic use of cyclophosphamide and its cytotoxic action: A challenge for researchers. *J Pharm Res*. 2011;4(8):2755–7.
 101. Ramos L, Wetzels AMM, Hendriks JCM, de Kaa CAH van, Sweep CGJ, Kremer JA, et al. Percutaneous epididymal sperm aspiration: a diagnostic tool for the prediction of complete spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2004;8(6):657–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147264831061646X>
 102. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Horm Res Paediatr*. 1970;1(1):2–25.
 103. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Saba AB, Adedara IA, Olowu ER, Akinrinde AS, et al. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in

- testis and epididymis of rats. *Andrologia*. 2016;48(4):393–401.
104. Adana MY, Imam A, Bello AA, Sunmonu OE, Alege EP, Onigbolabi OG, et al. Oral thymoquinone modulates cyclophosphamide-induced testicular toxicity in adolescent Wistar rats. *Andrologia*. 2022;54(4):e14368.
105. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2006;367(1):114–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000989810500700X>
106. Anan HH, Zidan RA, Abd EL-Baset SA, Ali MM. Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on cyclophosphamide induced testicular injury in adult rat. *Tissue Cell* [Internet]. 2018;54:80–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816618301824>
107. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;92(3):1124–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028208032810>
108. Karakoc MD, Sekkin S. Effects of oleuropein on epirubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats. *Turkish J Pharm Sci*. 2021;18(4):420.
109. Avci H, Epikmen ET, Ipek E, Tunca R, Birincioglu SS, Akşit H, et al. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2017;69(5):317–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299317300908>
110. Dabak DO, Kocaman N. Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* [Internet]. 2015 Apr 21;37(4):734–9. Available from: <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1012984>
111. Ramadan OI, Abbas MA. Hepatoprotective effects of silymarin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in male rats. *Jordan J Appl Sci*

Sci Ser. 2023;17(1):24–7.

112. Shaker Kordedeh Z, Ghorbani S, Ahmadi S, Soleimani Mehranjani M. Silymarin mitigates toxic effects of cyclophosphamide on testicular tissue and sperm parameters in mice. Reprod Biol [Internet]. 2024;24(4):100946. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X24000925>
113. Shabaan S, Madi N, Elgharib M, Nasif E. Study the Effect of Silymarin on Cyclophosphamide Induced Testicular Damage in Adult Albino Rats. Bull Egypt Soc Physiol Sci. 2021;41(4):553–64.

