



**SİSPLATİN İLE İNDÜKLENEN SIÇANLARDA
TESTİKÜLER TOKSİSİTEYE KARŞI
ASTAKSANTİNİN KORUYUCU ETKİLERİ**

Nuray TEPE

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Azibe YILDIZ**

Yüksek Lisans Tezi – 2024

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİSPLATİN İLE İNDÜKLENEN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TOKSİSİTEYE
KARŞI ASTAKSANTİNİN KORUYUCU ETKİLERİ**

Nuray TEPE

Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Azibe YILDIZ

Tez Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nigar VARDI

Doç. Dr. Tuba ÖZCAN METİN

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafindan 2023/3360 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2024**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Genital Sisteme Genel Bakış	3
2.2. Testisin Embriyonik Gelişimi	3
2.2.1. Testis Migrasyonu (Göçü)	5
2.2.2. Abdominal Evre	5
2.2.3. İnguinalaskrotal Evre	6
2.3. Testis Anatomisi	6
2.3.1. Testisler	7
2.3.2. Epididimis	8
2.4. Testis Histolojisi	8
2.4.1. Testisler	8
2.4.2. Testiküler İnterstisyum Histolojisi.....	9
2.4.3. Leydig Hücreleri	9
2.4.4. Seminifer Tübül Histolojisi.....	10
2.4.5. Sertoli Hücreleri	10
2.4.6. Spermatogenez	12
2.4.7. Spermatositogenez Fazı	12
2.4.8. Spermatosit (Mayoz) Fazı	14
2.4.9. Spermiyogenez (Spermatid) Fazı.....	14
2.5. Matür Sperm Yapısı	15
2.6. Kanser ve Sisplatin.....	16
2.6.1. Sisplatin'in Keşfi ve Moleküler Yapısı.....	17
2.6.2. Sisplatin'in Sitotoksik Mekanizması ve Yan Etkileri	18
2.6.3. Sisplatin'in Yan Etki Mekanizması	18
2.6.4. Sisplatin ve Kombine İlaç Kullanımı	19

2.7. Karotenoidler ve Astaksantin.....	19
2.7.1. Astaksantin Sentezi	20
2.7.2. Astaksantin'in Moleküler Yapısı	20
2.7.3. Astaksantin ve Antioksidanlar	21
2.7.4. Astaksantin ve Nrf2 Sinyal Yolağı	21
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Etik Beyanı.....	24
3.2. Deney Hayvanları ve Tasarım.....	24
3.3. Deneyin Sonlandırılması.....	25
3.4. Histolojik Yöntemler.....	25
3.4.1. Mayer's Hematoksilen-Eozin Metodu	26
3.4.2. İmmünohistokimya Metodu	27
3.5. Histolojik Değerlendirme.....	28
3.6. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	29
3.7. Sperm Sayısının Değerlendirilmesi	30
3.8. Biyokimyasal Analizler.....	31
3.8.1. Malondialdehit (MDA) Seviyelerini Değerlendirme	31
3.8.2. Total Glutasyon (tGSH) Seviyelerinin Değerlendirilmesi	32
3.8.3. Testosteron Hormon Testi.....	32
3.9. İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR	34
4.1. Hayvan Vücut Ağırlık Bulguları.....	34
4.2. Testis Ağırlık Bulguları	34
4.3. Biyokimyasal Bulgular	35
4.3.1. MDA Seviyesi.....	35
4.3.2. tGSH Seviyesi	35
4.3.3. Testosteron Seviyesi	36
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	36
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	40
4.5.1. Nrf2, HO-1 ve kaspaz-3 immünreaktivitesi	40
4.5.2. Vimentin İmmünreaktivitesi	49
4.5.3. 3 β -HSD İmmünreaktivitesi	52
4.5.4. PCNA İmmünreaktivitesi.....	54
4.6. Sperm Sayısı	57

5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....	67
EKLER.....	77
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	77
EK-2. ETİK KURUL KARARI.....	78



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yol gösteren ve destek olan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Azibe YILDIZ'a

Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, iyiliğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nigar VARDI'ya

Ders dönemim boyunca yoluma ışık olan çok değerli hocam Prof. Dr. Mehmet GÜL'e, Prof. Dr. Aslı TAŞLIDERE'ye ve Prof. Dr. Elif KARACA'ya

Her zaman yanımda ve destek olan canım arkadaşım Fzt. Sümeyya ÇELİK'e ve Fzt. Merve KARAÇOBAN'a, Dr. Gökçe KOÇA'ya, Dr. Mustafa AKYÜZ'e, Ezgi KARAASLAN'a, A. Betül LEVENT'e, Bio. Leyla YURTSEVEN'e, Uzm. Dr. R. Hilal DATLI'ya, Uzm. Dr. Evrim YALÇIN'a, C. Zeynep HARMAN'a ve Dr. Zeynep Büşra KESER'e

Bana her zaman inanan, destekleyip takdir eden canım babam Hasan TEPE'ye ve annem Aysel TEPE'ye, kardeşlerim Gülay, Osman ve Hüseyin TEPE'ye

Hayatıma huzur ve mutluluk getiren, her konuda yanımda ve bana destek olan canım eşim Müh. Yusuf YEŞİLÇAY'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Sisplatin İle İndüklenen Sıçanlarda Testiküler Toksisiteye Karşı Astaksantin Koruyucu Etkileri

Amaç: Sisplatinin testis üzerindeki hasarına karşı astaksantin biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirip sonuçlandırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot: 36 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı ve 4 gruba ayrılarak kontrol ve astaksantin grubunda 8, sisplatin ve sisplatin+astaksantin grubunda 10 adet sıçan olacak şekilde ayarlandı. Deney sonunda dokular toplandı ve histolojik analizler için H-E ve immünohistokimya için Nrf2, HO-1, Vimentin, Kaspaz-3, PCNA ve 3 β -HSD ile boyandı. Biyokimyasal analizler için kalpten alınan kanlardan testosteron hormon ve testis dokularından MDA ve tGSH analizi yapıldı.

Bulgular: Biyokimyasal sonuçlara göre sisplatin grubunda testosteron seviyesinde ve tGSH düzeyinde anlamlı bir azalma, MDA düzeyinde ise anlamlı bir artış gözlemlendi. İmmünohistokimyasal sonuçlara göre Nrf2, HO-1, vimentin ve kaspaz-3 immünreaktivitesinde artış, 3 β -HSD ise anlamlı bir azalma gözlemlendi. Histopatolojik sonuçlara göre seminifer epitel ve tübül çapları sisplatin grubunda anlamlı bir azalma gözlemlendi. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları sisplatin grubunda anlamlı bir azalma, testis ağırlıkları karşılaştırıldığında ise belirgin bir azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç: Sisplatinin testis üzerindeki sitotoksik etkisine karşı astaksantin koruyucu ve tedavi edici etkinliği, çalışmamızın sonuçları ile kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Astaksantin, Apoptoz, İnflamasyon, Testis hasarı, Sisplatin, Oksidatif stress.

ABSTRACT

Protective Effects of Astaxanthin Against Testicular Toxicity in Rats Induced with Cisplatin

Aim: We aimed to evaluate and conclude the effects of astaxanthin against cisplatin-induced testicular damage using biochemical, histopathological, and immunohistochemical methods.

Material and Methods: Thirty-six male Wistar Albino rats were used and divided into 4 groups: control and astaxanthin groups with 8 rats each, and cisplatin and cisplatin+astaxanthin groups with 10 rats each. At the end of the experiment, tissues were collected and stained with H-E for histological analyses and with Nrf2, HO-1, Vimentin, Caspase-3, PCNA, and 3 β -HSD for immunohistochemistry. For biochemical analyses, testosterone hormone levels were measured from blood taken from the heart, and MDA and tGSH levels were measured from testicular tissues.

Results: According to the biochemical results, a significant decrease in testosterone levels and tGSH levels and a significant increase in MDA levels were observed in the cisplatin group. According to the immunohistochemical results, an increase in the immunoreactivity of Nrf2, HO-1, vimentin, and caspase-3 and a significant decrease in 3 β -HSD were observed. According to the histopathological results, a significant decrease in seminiferous epithelial and tubule diameters was observed in the cisplatin group. Pre- and post-experiment body weights showed a significant decrease in the cisplatin group, whereas testis weights showed a marked decrease, but it was not statistically significant.

Conclusion: The protective and therapeutic efficacy of astaxanthin against the cytotoxic effect of cisplatin on the testes has been demonstrated by the results of our study.

Keywords: Astaxanthin, Apoptosis, Cisplatin, Inflammation, Testicular damage, Oxidative stress.

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AMH	: Anti-mülleryen Hormon
AER	: Agranüler Endoplazmik Retikulum
ARE	: Antioksidan Yanıt Elamanı
Apaf-1	: Apoptik Proteaz Aktivatör-1
Bcl-2	: B hücreli lenfoma geni-2
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-XL	: B hücreli lenfoma-ekstra büyük
BTB	: Kan Testis Bariyeri
CAT	: Katalaz
CDDP	: Cis-diamindikloroplatin II
CTR1	: Bakır Membran Taşıyıcı-1
DHT	: Dihidro Testosteron
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ERK	: Hücre Dışı Sinyal İle Düzenlenen Protein Kinaz
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GCLM	: Glutamat-Sistein Ligaz Değiştirici Alt Birim
GCLC	: Glutamat-Sistein Ligaz Katalitik
GST-α1	: Glutasyon-S-Transferaz-α1
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
HCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HO-1	: Heme Oksijenaz-1
IHC	: İmmünohistokimya
IM	: Işık Mikroskobu
INSL3	: İnsülin Benzeri 3 Protein
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
IL-6	: İnterlökin-6
IκB1	: Kappa B İnhibitör
İ.p	: İntraperitonel
Keap1	: Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein-1
LH	: Luteinizan Hormon

LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MAPK	: Mitojen İle Aktive Olan Protein Kinaz
MIF	: Müllerian İnhibe Edici Faktör
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-B
Nrf-2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör-2
NQO-1	: NAD(P)H Kinon Oksidoredüktaz-1
PI3K	: Fosfoinosid 3-Kinaz
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCNA	: Prolifere Hücre Nükleer Antijeni
OCT-2	: Organik Katyon Taşıyıcıları-2 OCT-2
OS	: Oksidatif Stres
O.g	: Oral Gavaj
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SRY	: Y kromozomu Üzerinde Cinsiyet Belirleyen Bölge
SOX9	: SRY-Box Transkripsiyon Faktörü
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STAR	: Steroidojenik Akut Düzenleyici
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-α
UV	: Ultraviyole
WSSPAS	: Web-Based Sample Size & Power Analysis Software programı
3β HSD	: 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Deney tasarımı	25
Tablo 3.2. Antikor dilüsyon oranları	28
Tablo 3.3. Histopatolojik puanlama	29
Tablo 3.4. H skor değerlendirme.....	30
Tablo 3.5. PCNA immünreaktivite değerlendirme	30
Tablo 4.1. Deney başlangıcı ve sonu arasındaki vücut ağırlık oranları	34
Tablo 4.2. Ortalama testis ağırlığı.....	34
Tablo 4.3. Histopatolojik değerlendirme	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Germ hücrelerinin göçü.....	3
Şekil 2.2. Testis migrasyonu.....	6
Şekil 2.3. Testis anatomisi.....	7
Şekil 2.4. Testis yapısı.....	9
Şekil 2.5. Seminifer tübül ve spermatogenik seri hücreleri.....	11
Şekil 2.6. Spermatogenez aşamaları.....	13
Şekil 2.7. Spermiyogenez.....	14
Şekil 2.8. Matur sperm yapısı.....	16
Şekil 2.9. Sisplatinin moleküler yapısı.....	18
Şekil 2.10. Astaksantinın moleküler yapısı (8).....	21
Şekil 2.11. Nrf2 spesifik bölgeleri (54).	22
Şekil 2.12. Nrf2 sinyal yolağı (54).	23
Şekil 3.1. Seminifer tübül çap ve epitel yükseklik ölçümü.	29
Şekil 3.2. Thoma lamı sperm sayımı.....	31
Şekil 4.1. MDA seviyelerinin karşılaştırılması.	35
Şekil 4.2. tGSH seviyelerinin karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.3. Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.	36
Şekil 4.4. Kontrol grubu histopalatojik değerlendirme.	37
Şekil 4.5. AST grubu histopalatojik değerlendirme.	37
Şekil 4.6. CP grubu histopalatojik değerlendirme.....	38
Şekil 4.7. CP+AST grubu histopalatojik değerlendirme.	39
Şekil 4.9. Seminifer tübül çapı değerlendirme.	40
Şekil 4.10. Seminifer epitel Nrf2 değerlendirme.....	40
Şekil 4.11. İnterstisyel alan Nrf2 değerlendirme.	41
Şekil 4.12. Kontrol grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.	41
Şekil 4.13. AST grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.	42
Şekil 4.14. CP grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.....	42
Şekil 4.15. CP+AST grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.	43
Şekil 4.16. Seminifer epitel HO-1 değerlendirme.	43
Şekil 4.17. İnterstisyel alan HO-1 değerlendirme.	44

Şekil 4.18. Kontrol grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.....	44
Şekil 4.19. AST grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.	45
Şekil 4.20. CP grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.	45
Şekil 4.21. CP+AST grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.	46
Şekil 4.22. Seminifer epitel kaspaz-3 değerlendirme.	46
Şekil 4.23. İnterstisyel alan kaspaz-3 değerlendirme.	47
Şekil 4.24. Kontrol grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.	47
Şekil 4.25. AST grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.	48
Şekil 4.26. CP grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.	48
Şekil 4.27. CP+AST grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.	49
Şekil 4.28. Vimentin immünreaktivite değerlendirme.	50
Şekil 4.29. Kontrol grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.	50
Şekil 4.30. AST grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.	51
Şekil 4.31. CP grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.	51
Şekil 4.32. CP+AST grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.	52
Şekil 4.33. 3β-HSD immünreaktivite değerlendirme.	52
Şekil 4.34. Kontrol grubu 3β-HSD immünreaktivite değerlendirilme.	53
Şekil 4.35. AST grubu 3β-HSD immünreaktivite değerlendirilme.	53
Şekil 4.36. CP grubu 3β-HSD immünreaktivite değerlendirilme.....	54
Şekil 4.37. CP+AST grubu 3β-HSD immünreaktivite değerlendirilme.	54
Şekil 4.38. Kontrol grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.	55
Şekil 4.39. AST grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.	55
Şekil 4.40. CP grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.....	56
Şekil 4.41. CP+AST grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.....	56
Şekil 4.42. PCNA değerlendirme.	57
Şekil 4.43. Sperm sayısı değerlendirme.	57

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz ve oldukça hızlı hücre bölünmesine neden olan bir hastalık grubudur. Birçok tedavi yöntemi geliştirilmesine rağmen dünyada en sık ölümle sonuçlanan ikinci hastalıktır. Dünya sağlık örgütünün 2020 veri açıklamalarına göre 18.1 milyon kanser vakası olduğu ve 10 milyon kanser hastasının hayatını kaybettiği bildirilmiştir (1). Sadece kanserli hücreleri ortadan kaldıracı hedefleyen sınırlı sayıdaki moleküler hedefli tedaviler dışında mevcut kanser tedavileri, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapötik ilaçların alınmasını içerir (2, 3). Tedavide kullanılan kemoterapi ilaçlarının sitotoksik etkisi malign hücreler için seçici olmayıp sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. İlaçların vücutta spesifik olmayan dağılımı ciddi toksik etkilere neden olmaktadır (4, 5).

Sisplatin, birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapik bir ajandır. Cis-diamindikloroplatin (II) olarak da bilinen sisplatin, 1970'li yılların sonunda germ hücre kaynaklı kanser tedavisinde anahtar rol oynadığı belirlenerek FDA onaylı ilk platin ilaç grubu olmuştur. Baş-boyun, meme, mesane, over gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Sisplatin, DNA zinciri üzerindeki pürin bazların da bulunan N7'lere geri dönüşümsüz bağlanarak DNA çift zincirinde hasara neden olur ve hücre proliferasyonunu durdurarak apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanır. Ancak diğer organları da etkilemektedir ve toksisite, nefrotoksisite, periferik nöropati, ototoksisite ve azospermiye neden olmaktadır. Bu toksik etkiyi azaltmak veya ortadan kaldırmak için sisplatin ile birlikte antioksidan bir maddenin kombine kullanılması ilacın etkinliğini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, antioksidan ilaçların kanser ilaçlarıyla kombine kullanılması sağlıklı hücreleri toksisiteden korumaktadır (6, 7).

Astaksantin; denizde yaşayan bakteriler ve fitoplanktonlar tarafından sentezlenmekte ve besin zinciriyle balıklar ve daha büyük deniz canlılarına aktarılmaktadır. Ek olarak mantar, karides ve ıstakoz gibi mikroorganizmalarda da sentezlenen ksantofil adında karotenoid grubuna aittir. Kırmızı veya turuncu renkte yağda çözünebilen bir maddedir. Diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi kronik durumlar oksidatif strese neden olmaktadır. Astaksantin oluşan bu strese karşı koruma ve inflamatuvar yanıt mekanizmalarını düzenleyerek antioksidan aktivite göstermektedir (8, 9).

Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan sisplatin, testis dokusu üzerinde neden olduğu toksisiteyi azaltmak için antioksidan aktivitesi yüksek olan astaksantinin koruyucu ve tedavi edici özelliğini Nrf2/HO-1 sinyal yolağı üzerinden araştırmayı amaçladık.



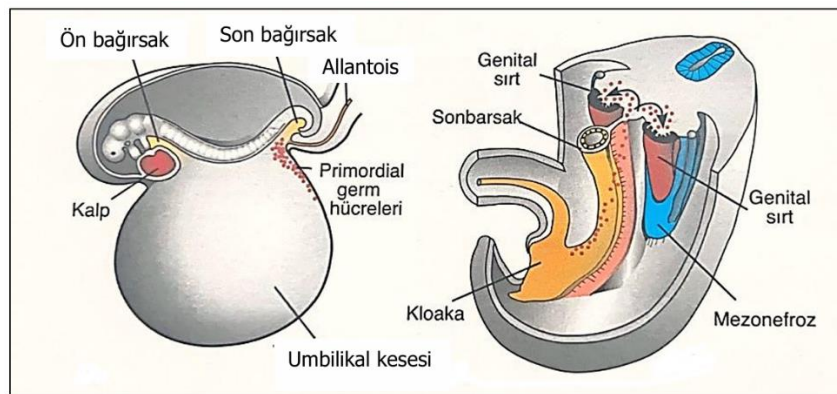
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sisteme Genel Bakış

Testis, skrotum içerisinde asılı şekilde bulunan bir çift organdır ve seminifer tübül, interstisyel alan, testis içinde ve dışında bulunan boşaltım kanallarından oluşur. Sperm üretilip salgılanmasıyla ekzokrin, interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinden testosteron hormonu üretmesiyle ise endokrin salgı yapma fonksiyonuna sahiptir (10).

2.2. Testisin Embriyonik Gelişimi

Testisin embriyonik gelişimi, gonadal kabartıların oluşmasıyla başlar. Gonadlar intermediyer mezoderm (mezenşim), intraembriyonik kölom epiteli (lateral plak mezoderm) ve primordiyal germ hücrelerinden köken alır. Gelişimin 3. haftasında embriyonun horizontal planda katlanması sırasında, intermediyer mezoderm ventrale doğru çekilir ve paraksiyal mezoderm ile bağlantısını kaybeder. Dorsal aortun iki tarafında bulunan ve ürogenital kabartı olarak isimlendirilen uzunlamasına bir mezoderm çıkıntı oluşur. Üriner ve genital sistemlerin gelişiminde primer kaynak olan ürogenital kabartının genital sistemi oluşturacak olan bölümü, gonadal kabartı olarak adlandırılır (Şekil 2.1). İntermediyer mezodermden gelişen gonadal kabartıların yüzeyi intraembriyonik kölom epiteli ile örtülüdür (11, 12).



Şekil 2.1. Germ hücrelerinin göçü (11).

Gonadlar yaklaşık 5. haftada, orta hatta bir çift uzunlamasına kabartı şeklinde izlenir. Bu dönemde gonadal kabartı kalın, geniş mezenşim dokusu ve kölom epitelinden proliferasyon olarak mezenşim dokusuna invajine olmuş hücre kordonlarından oluşur. Hem

erkeklerde hem de dişilerde yüzey epiteli ile yani klom epiteli ile baēlantılı olan bu kordonlara primitif cinsiyet kordonları denir(13).

Embriyonun genetik veya kromozomal cinsiyeti fertilizasyon ile belirlenir ancak 7. haftaya kadar testis veya ovaryum özellikleri taşımamaktadır. Bu dönemdeki dişi ve erkek karakteri ayırt edilemeyen ve henüz germ hücrelerinin bulunmadıēı bu gonadlar farklılaşmamış gonad olarak adlandırılır. Gonadların testis veya ovaryum yönünde farklılaşmaları, primordiyal germ hücrelerinin gonadlara yerleşmesiyle başlar. Primitif izgi boyunca göç eden primordiyal germ hücre öncülleri, gelişimin 3. haftasında yolk kesesinin allantoise yakın bölgedeki endoderm hücreleri arasına yerleşerek primordiyal germ hücrelerine farklılaşırlar. Buradan da ameboid hareketlerle yola çıkarak 5. haftada gonadlara ulaşırlar ve 6. haftada primitif cinsiyet kordonlarına yerleşirler. Primordiyal germ hücrelerinin gonadlara girişi gonadların ileri gelişimini indükler (12, 14).

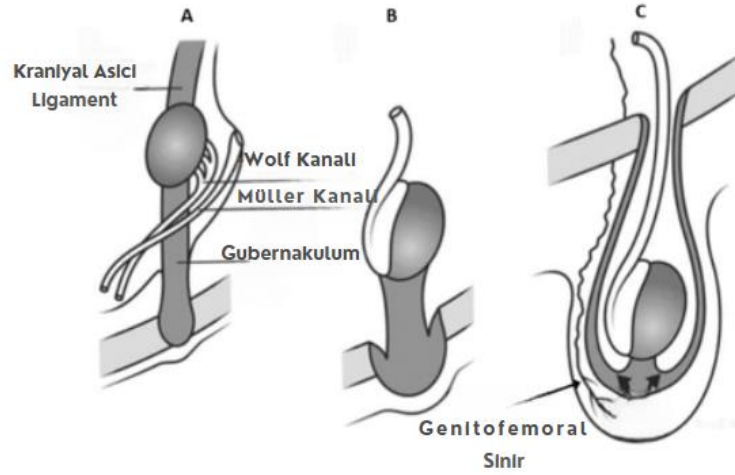
Gonadlara yerleşen primordiyal germ hücreleri, gonadın testis yönünde farklılaşması için Y kromozomunun kısa kolunda bulunan, testis belirleyici transkripsiyon faktörünü kodlayan SRY geninin aktivasyonundan sorumludur. SRY geni, gelişmekte olan gonaddaki somatik hücrelerin yalnızca bir alt grubunda eksprese edilir ve bu hücrelerin, testiste bulunan ana destek hücre türü olan Sertoli hücrelerine farklılaşmasını saēlar. Farklılaşan Sertoli hücrelerinden eksprese edilen testis belirleyici faktörün etkisiyle primitif seks kordonları medullaya doēru uzayarak testis (medullar) kordonlarına dönüşür. Bu kordonlar testis hilusunun oluřacaēı bölgede incelerek rete testis tübüllerini oluşturur. Bu arada testis kordonları ile yüzey epiteli arasında tunica albuginea olarak isimlendirilen bir baē dokusu gelişir. Bu baē dokusu testisin yüzey epiteli ile olan ilişkisini keser. Testis kordonları puberteye kadar solid hücre kordonları şeklinde kalır. Kordonların kanalize olarak lümen kazanması ve seminifer tübüllere dönüşmesi puberte ile birlikte gerçekleşir. Sertoli hücreleri ayrıca salgıladıēı anti-Müllerian hormon ile Müllerian (paramezonefrik) kanalın gerilemesini ve böylece kadın genital kanallarının gelişimini baskılar (12, 15). Gelişmekte olan gonaddaki bazı somatik hücrelerin Leydig hücrelerine dönüşümünü indükler. Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonu, Wolffian (mezonefrik) kanallarının erkek genital kanallarına dönüşümünü saēlar. Gelişmekte olan bazı somatik hücrelerin ise miyoid hücelere farklılaşmasını uyarak sperm üretiminde yer alan kritik baē dokusu yapılarını oluşumunda rol oynar (15, 16).

2.2.1. Testis Migrasyonu (Göçü)

Testisin abdominal karın boşluğundan skrotal bölgeye inmesine migrasyon denir ve birçok faktör testisin abdominaldan skrotuma inişini etkilemektedir. Bu faktörler; fetüsün karın içi basıncın yükselmesi, epididimis ve kanalların gelişimi, testosteron hormonu ve plasentadan salgılanan gonadotropin, fetal Leydig hücreleri tarafından üretilen INSL3, genitofemoral sinir uyarması ve gubernakulum gelişimidir. Testis migrasyonu için, abdominal (karın) ve inguinoskrotal evre olmak üzere iki evrede gerçekleştiği ortaya atılmıştır (16, 17).

2.2.2. Abdominal Evre

Abdominal evre, gelişimin 8. haftasından başlayarak 20. haftaya kadar testisin karın boşluğundan iç kasık halkasına doğru göç etmesine dayanır (17). Gonadlar, posterior çöломik duvara kraniyal asıcı ligament ile bağlı, kraniyale ise gubernakulum ile bağlıdır. 10. haftadan itibaren kraniyal asıcı ligament gerileyerek gubernakulum genişlemeye başlar (Şekil 2.2). Bu genişleme şişme reaksiyonu olarak adlandırılır ve gubernakulumun testis ile aynı boyuta gelmesini sağlar. Gubernakulumun şişmiş distal ucu, *ampul* olarak adlandırılır ve etrafında kasık kanalı oluşur. Proksimal uçta ise epididimis gelişir ve *gubernakular kord* olarak adlandırılır. İntraabdominal yüzeydeki periton, *prosesus vaginalisi* yani periton zarı divertikülünü oluşturur ve bu gubernakulumu üç farklı halkaya böler. Peritonun dış yüzeyinde ise kremaster kası gelişir ve divertikülün uzamasıyla ekstra vajinal kısma doğru uzanır (16). Genitofemoral sinir dalı skrotuma inerek kremaster kasını innerve eder. Kremaster kası, fetal testisin skrotuma doğru yönelmesi için ritmik olarak kasılmalar başlatır (18).



Şekil 2.2. Testis migrasyonu (18).

2.2.3. İnguinaşkrotal Evre

İnguinaşkrotal evre, testisin 25-35. haftalar arasında testisin skrotuma inmesini içeren ikinci aşamadır. Bu evrede gubernakulumun proksimal kısmı epididimise ve testisin alt kutbuna yapışıktır. Distal kısmı ise dış kasık halkasını oluşturacak şekilde dışa doğru çıkıntı yapar. Gubernakulum transabdominal evre sonunda genişleyerek kasık kanalını işgal eder (16). Kremaster kasının ritmik kasılmalarıyla gubernakulum prosesus vajinalisi de alarak skrotuma 3-5 cm kadar iner. Daha sonra proksimal prosesus vajinalis kapanır ancak distal tunica vainalis kapanmaz ve gubernakular ampul içe dönerek skrotum içerisine sabitlenir. Testisin skrotuma inmesiyle gubernakulumun gerilemesi eş zamanlı olarak gerçekleşir. 28-30. haftalar arasında gubernakulumda ki kasların neredeyse tamamı yerini elastik liflere bırakır ve yaklaşık 35. haftada testisin inişi tamamlanır. Migrasyonun başarısız olması kriptorşidizme neden olur (18).

2.3. Testis Anatomisi

Erkek üreme organı, karın bölgesinin dışa doğru keselenmesi sonucu oluşturduğu skrotum kesesi içerisinde bir çift testis, epididimis ve funikulus spermatikusun oluşur (Şekil 2.3). Skrotum dört tabakadan oluşmaktadır (19).

- i. **Deri** tabakası en dışta bulunan buruşuk, ince ve pigmentli tabakadır. Her iki yanı saran tabaka orta hatta birleşerek belirgin çizgi oluşturur.
- ii. **Fasia Süperfisyalis**, karın duvarının membranöz ve yağ tabakasının devamıdır. Yağ tabakasının yerini skrotumda dartos alır ve sempatik sinirler vasıtasıyla

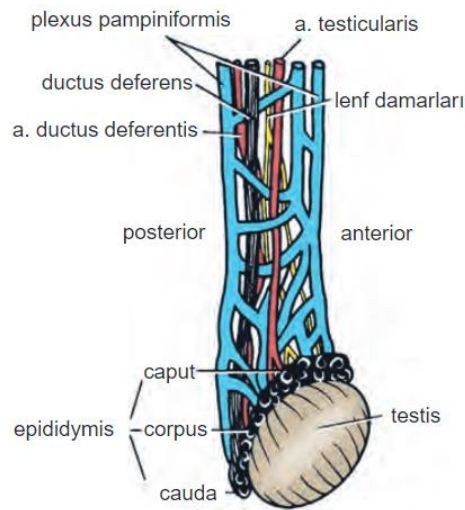
derinin buruşup gevşemesinden sorumludur. Membranöz ve dartos skrotumda birleşerek testisleri birbirinden ayırır.

- iii. **Fasia Spermatika** tabakası süperfisyalisin altında yer alır. Testisin ısı ve uzayıp kısılmasından sorumludur.
- iv. **Tunica vaginalis** tabakası, fascia spermatikanın içinde yer alır ve testisi boydan boya sarar.

2.3.1. Testisler

Skrotum içerisinde asılı şekilde duran bir çift organdır. Ağırlığı ~25 gram, uzunluğu 4-5 cm ve genişliği 2-3 cm'dir. Sağ testisin konumu sol testise göre daha yukarıdadır ve etrafını tunica albuginea sarar. Bu sıkı bağ dokusu, posteriyor yüzeyden içeriye doğru birleşerek *mediasten testisi* oluşturur. Mediasten testis kan ve lenf damarları ile boşaltım kanallarının testise giriş çıkışını sağlar. Testislerin içine doğru septalar yaparak lob ve lobüllere ayırır. Her bir lob 1-4 seminifer tübüller içerir ve bu tübüller, tübülü rektiye ve oradan rete testise açılır. Rete testis, yaklaşık 20 kanaldan oluşan *duktuli Efferentese* açılır (19, 20).

Spermatogenez vücut ısısından daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Bu yüzden skrotum içerisine yerleşen testisler vücut ısısından 3°C daha düşük sıcaklığa sahiptir. Abdominal aortanın kolu olan testiküler arter *pampiniform venöz pleksus* ile sarılıdır ve testisin kanlanmasını sağlar. Bu pleksus testisten vücuda dönen düşük sıcaklıktaki venöz kanı ısıtmayı ve arter ile testise gelen vücut sıcaklığındaki kanı soğutmayı sağlar (14, 20). Testislerin venöz kanı sağda *Vene Cava inferiore*, solda *Vene Cava renalise* dökülür (21).



Şekil 2.3. Testis anatomisi (19).

2.3.2. Epididimis

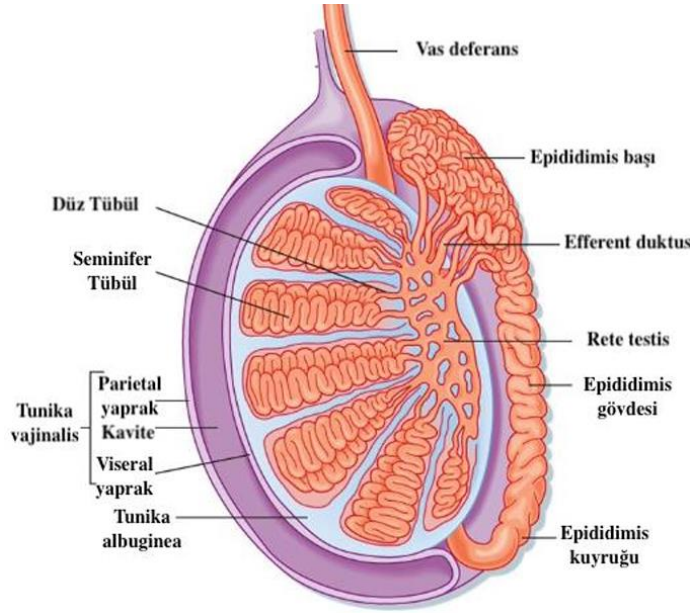
Duktuli Efferentes kanalının devamıdır ve ~6 m uzunluğunda oldukça kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Üç bölgeden oluşmaktadır. Testisten çıktığı bölgeye kaput, orta bölgeye korpus ve son bölgeye kauda denir. Epididimis ile testis arasında oluk şeklinde bir yapı seyreder. Bu yapı tunica vajinalisin visseral yaprağı ile sarıdır ve sinüs epididimis olarak adlandırılır. Kauda bölgesi olan kuyruk kısmı vas deferens kanalı ile devam eder. Duktus epididimis hem spermilerin hareket kazanmasında hem de Sertoli hücrelerinin üretiminden sorumlu olduğu testiküler sıvının geri emilimini yapar. Epididimisin kauda bölgesinden testisin posterioru boyunca yükselen *vas deferens* bulunur. Deferens kanalı, inguinal kanaldan geçerek abdomene girer ve spermatik kordondan ayrılarak mesane seviyesine iner. Burada genişleyerek deferens kanalının *ampullasını* oluşturur. Ampulla bölgesi seminal vezikül kanalı ile birleşerek *duktus ejakulatoryus* olarak adlandırılır ve prostat bezi içerisinden üretraya doğru devam eder (14, 19, 21).

2.4. Testis Histolojisi

Erkek genital sistem iki adet testisten, boşaltım kanallarından, penisten ve cinsiyet bezlerinden oluşur. Testislerin başlıca sperm üretimi (spermatogenez) ve androjen sentezleme (steroidogenez) olmak üzere iki fonksiyonu bulunmaktadır (10, 14).

2.4.1. Testisler

Testis, 4-5 cm uzunluğa ve 3 cm genişliğinde oval şekilli bir bezdir. Skrotum içerisinde bulunan testisler kalın bir bağ dokusu ile çevrilidir. Bu bağ dokusunun en dışta bulunan kısmına tunica vajinalis, orta kısmına tunica albuginea ve iç kısmına tunica vasküloza olarak adlandırılır. Tunica vajinalis *parietal* ve *visseral* olarak adlandırılan iki tabakadan oluşur. Bu yapraklar arasında testisin rahatça hareket etmesini sağlayan seröz boşluk bulunmaktadır (10). Parietal yaprak skrotumun iç yüzeyine, visseral yaprak ise tunica albugineaya yapışıktır. Tunica vajinalis tek katlı yassı epitel hücrelerden oluşur ve hazırlanan doku örneklerinde gözlenmez. Kapsülün orta ve kalın kısmı olan tunica albuginea, fibroelastik bağ dokusu yapısındadır (Şekil 2.4). Tunica albuginea testisin posteriyor yüzeyinde kalınlaşıp birleşerek *mediasten testisi* oluşturur ve içeriye doğru septalar yaparak testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Her lobül seminifer tübül ve interstisyumdan oluşur (14, 21).



Şekil 2.4. Testis yapısı (14).

2.4.2. Testiküler İnterstisyum Histolojisi

Testiküler interstisyum; seminifer tübüller arasında bulunan lenf ve kan damarları ile sinir lifleri içeren alandır. Bu alan fibroblast, makrofaj, lenfosit ve Leydig hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarıdır (22).

2.4.3. Leydig Hücreleri

1850’de Alman zoolog ve anatomist Franz von Leydig’in interstisyel alanda hücreler olduğunu ortaya atarak bunlara Leydig ismini vermiştir. 1903’te ise androjenlerin Leydig hücreleri tarafından sentezlendiği ortaya atılmış ve 1960’lı yıllarda 3β -hidroksisteroid dehidrojenaz enzimi ile karakterize olduğu öne sürülmüştür. 1969 yılında ise Leydig hücrelerinin kolesterolden testosteron hormonu sentezlemesi keşfedilmiştir (23). Daha sonra fetal hayatta testislerin inişinde, kemik metabolizmasının düzenlenmesinde ve yetişkin dönemde germ hücre apoptozunu engellemede rol oynayan INSL3 peptid hormonu sentezlediği ortaya atılmıştır (24).

Leydig hücreleri tübüller arasında tek tek veya gruplar halinde bulunan, büyük poligonal ve eozinofilik boyanan hücrelerdir (10). Sitoplazmasında yağ damlacıklarını içermenin yanı sıra lipofuskin pigmenti ve *Reinke kristalleri* de içerir. Salgı yaptığı için aktif bir hücredir ve Golgi kompleksi, aER çok gelişmiştir. İhtiyaca göre üretilen testosteron hormonunu depolanmadan direkt olarak kana verir (14, 23). Bu hücreler fetal

Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleri şeklinde iki ayrı dönem ile karakterizedir. Fötal dönemin 8. haftasından itibaren farklılaşarak testosteron ve diğer androjenleri salgılamaya başlarlar ve gonadların gelişiminden sorumludur. Ancak gelişimin 5. ayında itibaren inaktif hale gelir ve puberteye kadar inaktif formda kalır. Pubertede gonadotropik stimülasyonla birlikte tekrar aktif hale gelir ve bireyin yaşamı boyunca aktif olarak androjen salgılamaya devam ederler. Pubertede spermatogenezin başlamasından ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi açısından, yetişkin döneminde ise devamlılığı açısından önemlidir (25).

2.4.4. Seminifer Tübül Histolojisi

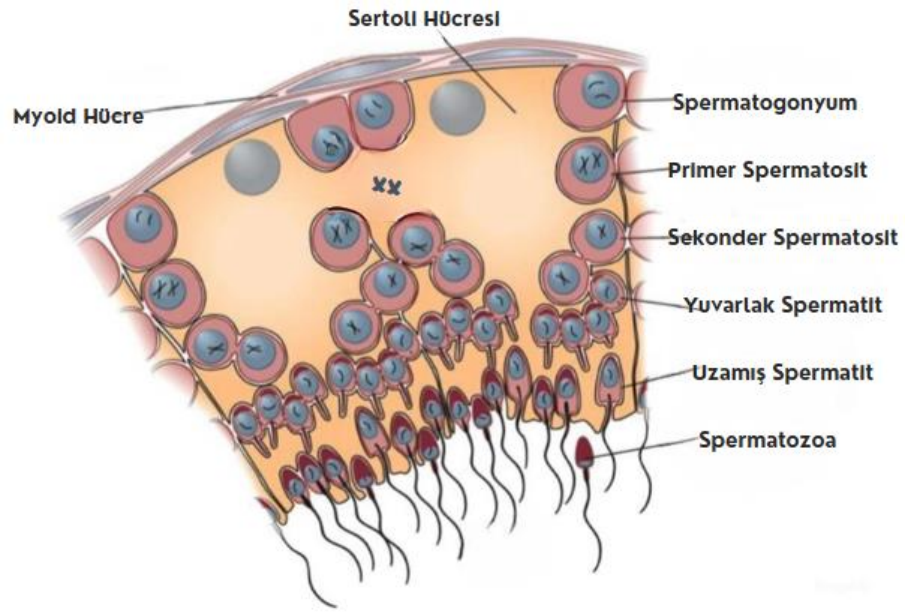
Tübülü seminiferi kontorti olarak da adlandırılan seminifer tübüller, 30-50 cm arasında uzunluğa ve 150-200 µm çapa sahip kıvrıntılı kanallardır (10). Tübülün germinal epiteli, spermatogenik hücrelerden ve onları destekleyen Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır. Etrafı ise fibröz bağ dokusu yapısında Tunica propriya ile çevrilidir (Şekil 2.5). Bu tabakada miyoid hücreler ve kollajen fibrillerden zengindir. Miyoid hücreler ritmik kasılmalarla Sertoli hücrelerinin sentezleyip salgıladığı testiküler sıvının ve spermatozoanın tübüllerden boşaltım kanallarına akışını yönlendirmektedir (14, 21). Olgunlaşan spermatozoa, seminifer tübüllerin devamı olan tübülü rektie ve oradan rete testise taşınır ve epididimis ile devam eder (10).

2.4.5. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücresi, 1865 yılında Enrico Sertoli tarafından tanımlanmış ve Sertoli adı verilmiştir. 1975'ten sonra hücre kültürü çalışmalarıyla ilgi odağı haline gelmiştir (26). Sertoli hücreleri, seminifer tübül üzerinde nükleusu bazal laminaya oturmuş şekilde ve sitoplazması tübül lümenine kadar uzanan prizmatik şekilli hücrelerdir (Şekil 2.5). Elektron mikroskopunda çok sayıda mitokondri, aER, lizozom, yağ damlacıkları ve Golgi kompleksi içerir. Puberteyle birlikte spermatogenik hücrelerin her bir gelişim aşamasında onlara destek olan hücrelerdir. Eozinofilik sitoplazma, çentikli ökromatik bir nükleus ve 1-2 nükleolusu bulunur(10). Sertoli hücreleri, embriyonik gelişim sırasında gonadlarda ilk farklılaşan ve SRY genini eksprese eden hücre çeşitidir. Ayrıca fetüsün erkek yönünde gelişerek dişi Müllerian kanallarını inhibe etmek için AMH sentezlemektedir. Sertoli hücreleri embriyonik gelişim boyunca ve doğumdan sonra

puberteye kadar AMH sentezlemeye devam eder ve seminifer epitelin baskın hücre tipidir. Puberteden sonra ise %10'luk kısmını oluşturmaktadır (27).

Sertoli hücrelerinin bazali seminifer epitel bazal laminası üzerine hemidesmozomlar ile bağlıdır. Apikal kısımları ise tübül lümünine uzanır ve sitoplazmalarında derin çöküntüler bulunur (26). Hücre iskeleti; aktin, vimentin, tübülobulbar kompleks, ektoplazmik özelleşmeler, mikrotübül ve ara filamentlerden oluşmaktadır (10, 27). Bir Sertoli hücresiyle komşu Sertoli hücresi arasında sıkı bağlantılar bulunur ve bu bağlantılar *kan-testis bariyerini (BTB)* oluşturur (28). BTB seminifer epiteli bazal ve luminal olmak üzere iki bölgeye ayırarak maddelerin paraselüler geçişini engeller. Bazal bölgede spermatogonyum ve primer spermatosit hücreler bulunur. Luminal bölgede ise sekonder spermatosit, erken ve geç spermatid hücreler bulunur (14).



Şekil 2.5. Seminifer tübül ve spermatogenik seri hücreleri (29).

Sertoli hücreleri ekzokrin ve endokrin salgı yapan hücrelerdir. Başta androjen bağlayıcı protein (ABP) olmak üzere ekzokrin salgıları, spermatogenik hücreler için testosteron içeren mikro çevre oluşturur (29). Ayrıca ABP spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında da rol oynamaktadır. Endokrin salgıları olan *aktivin*, ön hipofiz bezinden FSH salınımını aktive ederken *inhibin* ise FSH salınımını engeller (22). Ayrıca Sertoli hücreleri müllerian inhibe edici faktör (MIF), seruloplazmin ve plazminojen aktivator gibi glikoproteinler salgılamaktadır. Spermatogenezin son aşaması olan

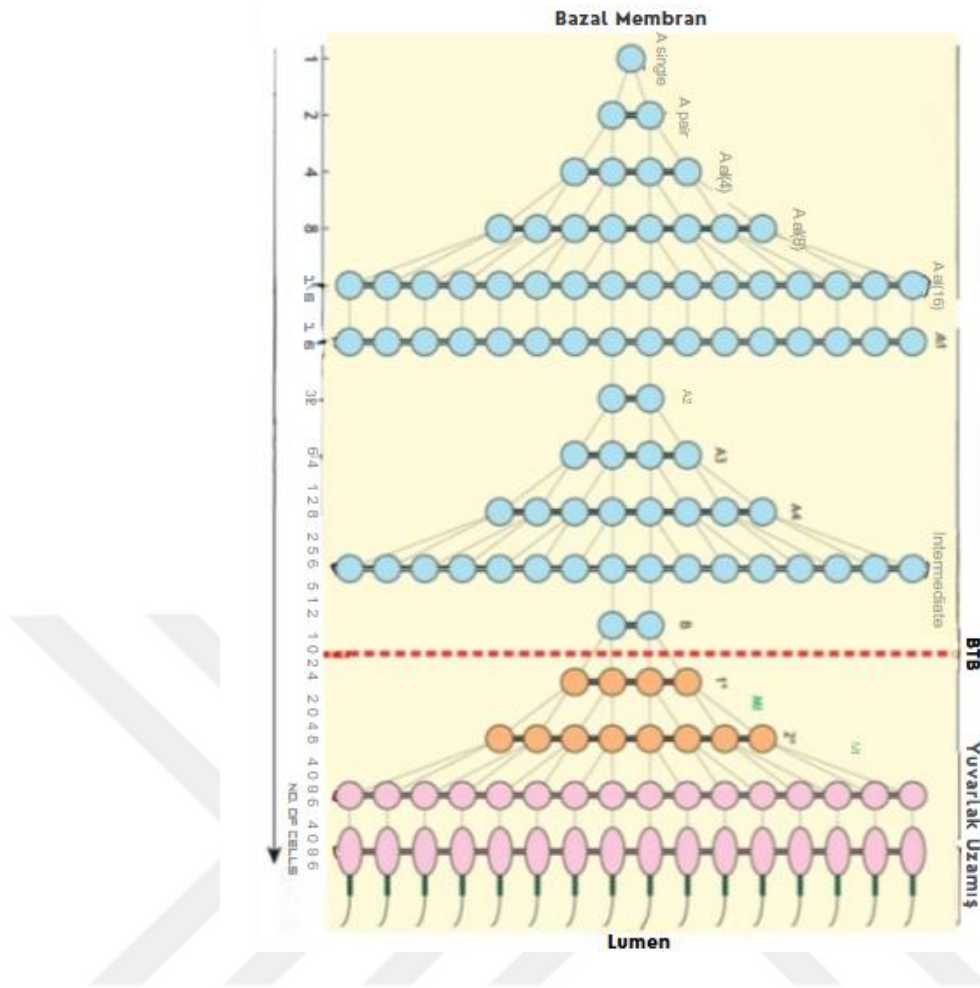
olgunlaşma fazında ise rezidüel cisimcikleri ve kusurlu spermatidleri fagosite etme yeteneğine sahiptir (27).

2.4.6. Spermatogenez

Seminifer tübülde meydana gelen ve spermatogonyal kök hücrelerin çoğalıp farklılaşarak spermatozoanın oluşmasıyla tamamlanan uzun ve karmaşık bir süreçtir. Puberteden kısa bir süre önce FSH, LH, seminifer büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörünün uyarımı ile spermatogenez başlar. 74 günde olgunlaşır ve günde ortalama 150-275 milyon aralığında sperm üretilir. Yaşlanmayla birlikte azalsa da ömür boyu sürer (27, 30). Üç ana başlık altında incelenmektedir. Bunlar; *spermatositogenez*, *mayoz* (spermatosit) ve *spermiyogenez* (spermatid) fazlarıdır (31).

2.4.7. Spermatositogenez Fazı

Spermatogonyumlar 46 kromozomlu diploit hücrelerdir. Düzenli olarak mitoz bölünmeler geçirerek çoğalır ve spermatozoayı oluştururlar (Şekil 2.6). Bu hücreler primordiyal germ hücrelerinden köken alır ve tübülün bazal laminası üzerine uzanmış şekilde bulunur. Histolojik olarak nükleus büyüklüğü, şekli ve kromatin yoğunluğuna göre *tip A koyu (Ad)*, *tip A açık (Ap)* ve *tip B* spermatogonyumlar olmak üzere sınıflandırılır (32).



Şekil 2.6. Spermatogenez aşamaları (32).

Ad spermatogonyumlar; oval nükleuslu, yoğun olarak bazik boyanan, ince granül kromatinli hücrelerdir. Düzensiz aralıklarla mitoz bölünme geçirerek çoğalır ve farklılaşırlar. Bu hücreler primordiyal germ hücrelerinden köken alır ve seminifer epitelin kök hücreleri olduğu düşünülmektedir (10). Mitoz bölünme ile bir çift Ad spermatogonyum ya da Ap spermatogonyum oluştururlar. Ap spermatogonyumlar tip A açık spermatogonyumları yani farklılaşma yeteneğine sahip hücelere dönüşürken Ad spermatogonyumlar ise tip A koyu spermatogonyum yani kök hücre olarak kalmaktadır (14, 29).

Ap spermatogonyumlar; nükleusları oval ve açık boyanan hücrelerdir. Peş peşe mitotik bölünmeler geçirerek sayılarını arttıırırlar. Daha sonra farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar (10, 14).

Tip B spermatogonyumlar; tip A spermatogonyumlara göre büyük ve yuvarlak nükleusa sahip, nüklear membran boyunca yoğunlaşmış kromatinleri bulunan

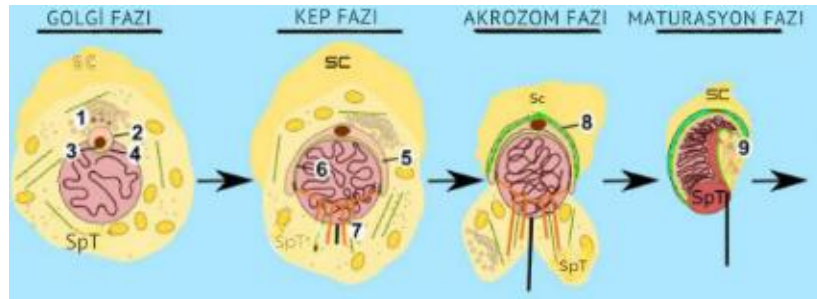
hücrelerdir. Mitotik bölünmeler geçirerek spermatogonyal fazdaki son aşamayı temsil eder (10, 14).

2.4.8. Spermatozit (Mayoz) Fazı

Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatozitleri oluşturur. Nükleusları büyük ve vezikül şeklindedir (10). Mayoz bölünme başlamadan önce primer spermatozit replikasyon geçirerek $2n$ kromozomlu ve $4d$ DNA miktarına sahip olur. Primer spermatozitlerin mayoz I bölünme sonucu kromozom sayıları $2n$ 'den yarıya inerek $1n$ 'e, DNA miktarı ise $4d$ 'den $2d$ 'ye düşer ve primer spermatozit, sekonder spermatozit olarak adlandırılır. Mayoz II başlamadan önce DNA replikasyonu olmaz. Mayoz II bölünme sonucu $1n$ kromozom ile $2d$ DNA miktarlı sekonder spermatozitten $1n$ kromozomlu ve $1d$ DNA miktarına sahip spermatid oluşur (29).

2.4.9. Spermiyogenez (Spermatid) Fazı

Mayoz II sonucu oluşan spermatid, haploid DNA miktarı ile 22 otozomal ve bir eşey X ya da Y kromozomuna sahiptir. Erken ve geç spermatid aşamalarından oluşur. Erken spermatidler, Sertoli sitoplazmasına gömülü yuvarlak veya poligonal şekilli hücrelerdir (10). Geç spermatidler ise seminifer epitelin son aşamasını temsil eder ve lümene salınmadan önce dört aşamada olgunlaşır (Şekil 2.7). Bu aşamalar; Golgi, kep, akrozom ve maturasyon fazıdır (33).



Şekil 2.7. Spermiyogenez (33).

Golgi fazı; golgi kompleksi üzerinde çok sayıda granül bulunur ve proakrozomal granüller olarak adlandırılır. Proakrozomal granüller nüklear membrana komşu, membranla sarılı bir vezikül oluşturmak için bir araya gelirler. Daha sonra membranla çevrili bu vezikül genişler ve spermın ön kutbunu oluşturur. Sentriyollerde arka kutba göç eder ve nüklear membrana dik açıyla hizalanırlar. Daha sonra sentriyoller, sperm kuyruk

aksonemini oluşturan mikrotübül parçalarının bir araya gelerek birleşmesini başlatır (10, 33).

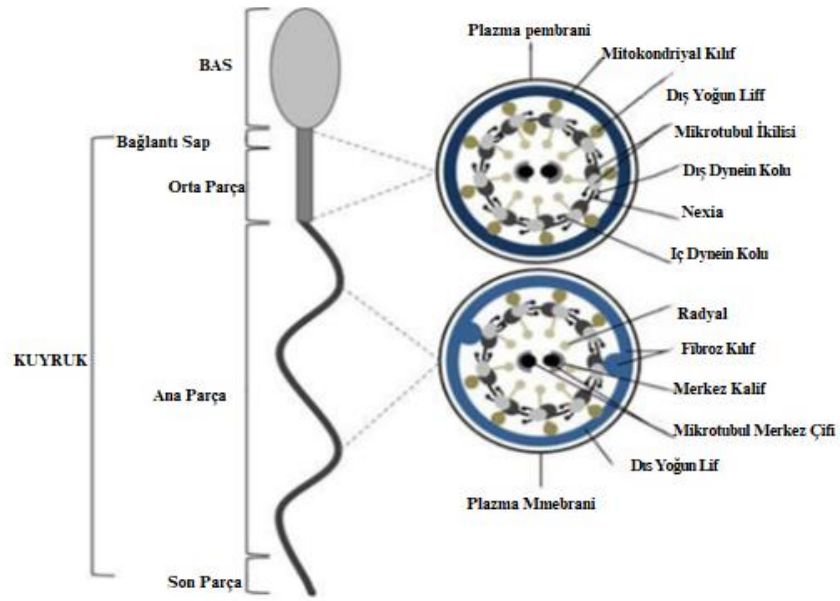
Kep fazı; genişleyen akrozom vezikül, sperm nükleusunun ön kutbu boyunca yayılır. Oluşan bu yapıya akrozomal kep denir. Kep altında kalan nüklear zarf porlarını kaybederek kalınlaşır ve nüklear içerik yoğunlaşır (33).

Akrozom fazı; akrozom fazında spermatid başı Sertoli hücre sitoplazmasına iyice gömülür. Spermatid kendini hizalayarak uzamakta olan kuyruk kısmı tübül lümenine doğru uzanır. Nükleus yoğunlaşarak yassılaşır ve onu çevreleyen akrozom ile birlikte membranın ön kısmına taşınır, sitoplazma ise posteriyore doğru kayar. Oluşan akrozomun arka tarafından spermatidin posteriyor kutbuna doğru mikrotübüllerden oluşan silindirik kılıf, manşeti oluşturur. Sentriyoller ise nükleusun posteriyor kutbuna taşınır ve burada spermatidin boyun ya da bağlantı parçasını oluşturur. Plazma zarı flagellumu sarmak için posterior kutba doğru uzar ve manşet kaybolur. Mitokondriyonlar spermatidin boyun bölgesinin arka tarafına sıkı bir kılıf oluşturmak için göç ederler ve burada kuyruğun orta parçasını oluştururlar (33).

Maturasyon (olgunlaşma) fazı; spermiyogenezin son aşamasıdır. Bu aşamada spermatid etrafındaki fazla sitoplazma (*rezidüel cisimcik*) Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Daha sonra spermatidler ile Sertoli hücreleri arasındaki özelleşmiş bağlantı kompleksleri ayrılarak tübül lümenine salınır ve olgunlaşan spermatid *spermatozoa* olarak adlandırılır. Tübül lümenine salınan spermatozoalar ise ileri modifikasyonlar için epididimise taşınır (33).

2.5. Matür Sperm Yapısı

İnsan olgun spermi; 60 µm uzunluğunda, baş bölgesi sivri ve yassı, 3 µm genişliğinde, 4.5 µm uzunluğunda ve 1 µm kalınlığındadır. Baş kısmı akrozomal kep ve postakrozomal bölgeden oluşur (Şekil 2.8). Akrozomal kep bölgesi tripsin benzeri enzimler içermektedir ve bu enzimler ovum zona pellusidasının yıkılması için gereklidir. Kuyruk bölgesi ise bağlantı sapı, orta, esas ve son parça olmak üzere dört bölüme ayrılmaktadır. Bağlantı sapı bölgesi fiberlerin başlangıcını ve sentriolleri, 7 µm uzunluğundaki orta parça mitokondriyonları, 40 µm uzunluğundaki esas parça fibröz kılıfı ve fiberleri, 5 µm kalınlığındaki son parça ise aksonemal kompleksi içerir (14).



Şekil 2.8. Matur sperm yapısı (34).

Sperm kuyruğunda aksonem yapısı bağlantı sapında başlar ve son parçada sonlanır. Kuyruk aksonemi 9+2 mikrotübül çiftinden oluşmaktadır. Periferdeki mikrotübül çiftleri birbirlerine *nexin* ile merkezdeki mikrotübül çiftine ise radyal parmak şekilli uzantılar ile bağlanmaktadır. Periferdeki mikrotübüller etrafında iç ve dış *dynein* kolları, kuyruk hareketi ve vuruşunu sağlamaktadır (34, 35).

Tübül lümenine salınan spermatozoanın henüz hareket yeteneği yoktur ve Sertoli hücreleri tarafından üretilen sıvı içerisinde düz tübüllere taşınır. Daha sonra sırasıyla rete testise oradan duktuli efferentese ve epididimisin proksimal bölgesine taşınır. Epididimise gelen spermatozoalar, kıvrımlı kanal boyunca taşınırken hareket kazanır ve ileri olgunlaşmaya uğrarlar. Bu değişimler; sitoplazmanın azalarak spermatozoanın ince bir form alması, DNA'nın yoğunlaşarak baş bölgesinin küçülmesi, akrozomal membranda dekapasitasyon ve glikozilasyon olmasıdır. Spermatozoalar epididimisin distal bölümüne doğru peristaltik kasılmalarla taşınarak getirilir ve burada ejakülasyondan önce depo edilir. Epididimisin bu bölgesinde spermatozoalar birkaç hafta canlı kalabilirken dişi üreme kanalında sadece 2-3 gün hayatta kalır (14).

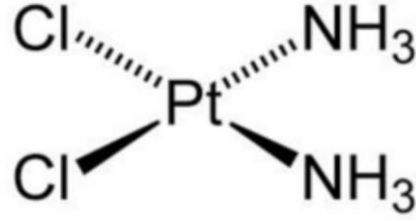
2.6. Kanser ve Sisplatin

Kanser, küresel ölçekte insan yaşamını en fazla tehdit eden hastalıklar arasında ikinci sıradadır. Kanser vakaları 1975'ten bu yana her yıl sürekli olarak artış

göstermektedir (36). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) açıklamalarına göre 2020 yılında dünya genelinde 18.1 milyon kanser hastası ve kanser nedeniyle 10 milyon kişinin hayatını kaybettiği rapor edilmiştir (37, 38). Kanser ilerlemesi esnasında, tümör doku veya hücreleri genellikle DNA, RNA gibi nükleik asitleri veya sakkaritler, proteinler gibi belirli maddeleri aşırı eksprese ederler. Bu da biyokimyasal parametreler kullanılarak kanser teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılır (36). Kanser gelişimi, in situ bir durumdan evrilen ve nihayetinde kötü huylu bir tümörle sonuçlanan çok adımlı bir süreci içerir. Kanser hücrelerinin yakın veya uzak organlara invazyonu ve metastazı, çoğunlukla kanserle ilişkili tüm morbidite ve mortaliteden sorumludur (1). Kanser tedavilerinde ilk sırada cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapötik ilaçların uygulanması yer alır (3, 39). Kanser kemoterapisinde düşük doz etkili tedaviyi önlerken, yüksek doz toksisite ile sonuçlanır. Kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkisi malign hücreler için seçici olmayıp normal hücreleri de etkilediğinden, ilacın vücutta seçici olmayan dağılımı kaçınılmaz olarak önemli yan veya toksik etkilere neden olmaktadır. Nitekim, kemoterapötik ilaçlar çoğunlukla nefrotoksisite, hepatoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, reproduktif disfonksiyon gibi yan etkilerle ilişkilidir (4, 5).

2.6.1. Sisplatin'in Keşfi ve Moleküler Yapısı

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar arasında yaygın olarak kullanılan sisplatin, ilk olarak 1845'te İtalyan bir kimyager tarafından tanımlanmıştır ve 1893'te kimyasal yapısı ortaya konmuştur (40). Daha sonra 1960'lı yıllarda *Escherichia coli* bakterisinde sitotoksik etkisi keşfedilmiş ve 1970'li yılların sonunda germ hücre kaynaklı kanser tedavisinde anahtar rol oynadığı belirlenerek FDA onaylı ilk platin ilaç grubu olmuştur. Sisplatin, sis-diamindikloroplatin II (CDDP), sisplatinum ve sis-diamindikloroplatinyum olarak da adlandırılmaktadır. Düzlemsel kare geometrik şekle sahiptir (Şekil 2.9). Merkezinde bir platin atomu, çevresinde iki Cl atomu ve iki NH₃ grubu ile karakterize bir bileşiktir (39). Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı-turuncu renkte toz halde bulunur. Suda az çözünmesinin yanı sıra dimetilprimanit ve N,N – dimetilformamid de ve serum fizyolojikte çözünür. Sisplatin; 301.1 gm/mol ağırlığa, 3.74 g/cm³ yoğunluğa, oda sıcaklığında 2.53 g/L suda çözünürlüğe ve 270 °C'de erimeye noktasına sahiptir (6, 41).



Şekil 2.9. Sisplatinin moleküler yapısı (42).

2.6.2. Sisplatin'in Sitotoksik Mekanizması ve Yan Etkileri

Sisplatin; baş-boyun, özofagus, akciğer, testis, ovaryum, rahim ağzı ve mesane kansinonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (39). Doza bağılı etki mekanizması oldukça yüksektir ve vücuda alındıktan sonra hücre membran proteini olan *Bakır Membran Taşıyıcısı (CTR1)* veya *Organik Katyon Taşıyıcıları-2 (OCT-2)* sisplatinin hücre içinde taşınmasına aracılık eder. Hücre sitozolüne taşınan sisplatin iki Cl^- iyonuna ayrışarak elektrofilik substrat oluşturur ve DNA halkası üzerindeki pürin bazlarının N7 bölgelerine kovalent bağlar ile bağlanarak halka içi çapraz bağlantılar oluştururlar. Sisplatinin genomik veya mitokondriyal DNA halkası üzerinde yapmış olduğu bu çapraz kovalent bağlı eklentiler çift zincirli heliks yapısını çözerek bozar ve DNA onarım mekanizmaları ile Nrf2 gibi birçok sinyal yolağını aktif hale getirir (40, 43). DNA onarım mekanizmaları başarısız olsa bile hücre ölümü veya apoptoz ile sonuçlanır. Sisplatin ile tedavinin diğeri bir avantajı ise replikasyonları farklı aşamalarda durdurarak hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Ancak kanser hücreleri ile sağlıklı hücreler arasında seçici olmayışı ve sitoplazmik proteinleri, fosfolipidleri ve hücresel yapıların aktivitelerini bozması gastrotoksisite, bulantı, kusma, hepatotoksisite, ototoksisite, nefrotoksisite ve azospermi gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır (6, 40).

2.6.3. Sisplatin'in Yan Etki Mekanizması

Normal fizyolojik koşullarda sağlıklı hücreler, *reaktif oksijen türleri(ROS)* ve bunları temizleyen *katalaz(CAT)*, *indirgenmiş glutatyon(GSH)* ve *süperoksit dismutaz(SOD)* antioksidan enzimleri bulundurur ve ROS seviyesi hücrede dengelenir. Ancak Sisplatin uygulanması hücrelerde aşırı ROS üretimine yol açar. Bu da hücre içi protein, lipid ve DNA yapısının bozulmasına ve apoptoz basamaklarının başlatılmasına neden olur (43). Sisplatin iki ana yol ile apoptoz yolağı basamaklarını başlatır.

- I. Ligandlar tümör nekroz faktör- α (TNF- α) bağlanır ve adaptör molekül aracılığıyla prokaspaz-8'in aktive olarak plazma membran inhibe reseptörü kaspaz-8 ve mitokondriyal bozukluğa sebep olan kaspaz-9'u aktive eder. Bu da kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aşağı regüle ederek hücrenin apoptoza gitmesine neden olur.
- II. DNA eklentileri oluşturarak DNA'ya çapraz bağlanır ve replikasyonu engeller. Bu durum hücrel strese neden olarak mitokondriden sitokrom-c salınmasına ve prokaspaz-9'un aktive olmasına neden olarak apoptoz yolağını aktive eder (44).

2.6.4. Sisplatin ve Kombine İlaç Kullanımı

Sisplatinin dezavantajları olarak yan etki ve ilaca karşı direnç, etkinliğini azaltmaktadır. Bu dezavantajları azaltmak veya ortadan kaldırmak için tekli ilaç kullanımı olan monoterapi yerine iki veya daha fazla ilacın kombine şekilde kullanılması ilacın terapötik etkinliğini arttırmada umut vaat etmektedir. Kombine kullanılan ilaçlardan biri kanserli hücreleri ortadan kaldırmak için indüklerken diğer kullanılan ilaç sağlıklı hücreler üzerinde koruyucu etki gösterebilmektedir. Bunlar göz önüne alındığında antioksidan ilaçların kanser ilaçlarıyla kombine kullanılması sağlıklı hücreleri toksisiteden koruyacaktır (7, 43).

2.7. Karotenoidler ve Astaksantin

1930'da Kuhn ve Karrer tarafından β -karotenin yapısı keşfedilmiş ve günümüze kadar ~750 doğal karotenoid tanımlanmıştır (45). Karotenoidler genel olarak 40 karbon atomundan oluşurlar ve karotenler ile ksantofiller olarak iki grupta incelenirler. Karoten grubu hidrojen ve karbon atomlarından oluşurken ksantofil grubu bunlara ek olarak keton veya hidroksi gruplarından birini içermektedir (46). Karotenidler, antikanser ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları ve yaşlanmaya karşı korucu etkiye sahiptir (46).

Şu ana kadar keşfedilen karotenoidlerin ~250'si denizde yaşayan bakteri, fitoplankton, kril, karides, somon ve ıstakoz gibi canlılar tarafından sentezlenmekte ve besin zinciriyle balıklar ve daha büyük deniz canlılarına aktarılmaktadır. Bu deniz karotenoid çeşitleri astaksantin, kantaksantin, β -kriptoksantin, zeaksantin ve lutein vb.'den oluşmaktadır. Vücuda alındığında hidroperoksitleri stabil hale, moleküler oksijeni ortadan kaldırmaya, oksidasyon ilişkili reaksiyonlarını düzenlemede oldukça

etkilidir. Yapılan son çalışmalarda astaksantin, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle ilgi odağı haline gelmiştir (8, 46).

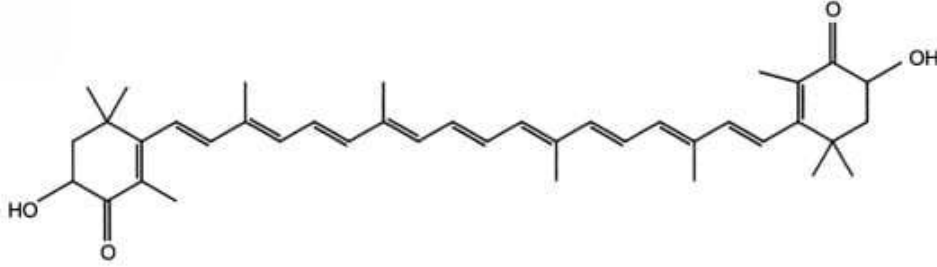
2.7.1. Astaksantin Sentezi

Başlangıçta hayvan takviye yemi olarak kullanılan astaksantin 1990'lerden itibaren biyolojik aktivitesi keşfedilmiştir, 1999 yılında FDA tarafından onaylanmış ve günümüzde kozmetik, farmasötik, nutrasötik ve gıda takviyesi olarak dünya çapında oldukça yaygındır. Genellikle deniz bakterileri, kırmızı maya, yeşil mikroalg ve adonis bitkileri tarafından üretilmektedir. Ticari olarak üretilen astaksantin ise *Paracoccus carotinifaciens* deniz bakterisinden, *Xanthophyllomyces dendrorhous* kırmızı mayasından ve en çok tercih edilen *Haematococcus pluvialis* mikroalginden elde edilmektedir. Doğal astaksantini elde etmenin zorluğu yapay olarak sentezlemeye yönlendirmiştir ve disodyum disüksinat astaksantin (DDA) formu iskemi-reperfüzyon modelinde, CDX-085 formu karaciğer enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Ancak doğal elde edilen astaksantin yapay formlarına göre 20-50 kat daha fazla antioksidan etkiye sahiptir. Astaksantin emilim ve sindirimi lipitlerine benzerdir ve balık yağı, zeytinyağı veya kolesterol içeriği yüksek besinler ile alınması antioksidan etkinliğini arttırmaktadır. Balık yağı ile birlikte vücuda alınması glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerini arttırmakta ve nitrik oksit (NO) seviyesini azaltmaktadır. Astaksantin bağırsaklarda emildikten sonra safra enzimleri ile parçalara ayrılarak pasif difüzyonla enterosit hücrelerine aktarılır ve lipoproteinler aracılığıyla dokulara taşınır (46, 47).

2.7.2. Astaksantin'in Moleküler Yapısı

Kırmızı veya turuncu renkte, yağda çözünebilen maddedir. Astaksantin, moleküler yapısında oksijen bulundurmasıyla diğer karotenoidlerden ayrılır. Molekül yapısında serbest radikalleri nötralize eden polar iki iyon halkası bulundurmakta ve polar olmayan bölgesinde elektron uzaklaştırmayı sağlayan 13 karbon-karbon çift çoklu doymamış bağdan oluşmaktadır (Şekil 2.10). Her iki uçtaki keton ve hidroksil grupları polariteyi artırarak astaksantin hücre membranından geçmesini kolaylaştırmaktadır. Karbon-karbon çift çoklu doymamış bağ bulundurmasıyla cis ve trans olmak üzere iki izomerik formu mevcuttur ve bu özelliği diğer karotenoidlere göre daha çok antioksidan özellik göstermesini sağlamaktadır (8). Başlangıçta su ürünleri yetiştirme yerlerinde balıklar için

yem olarak kullanılan astaksantin, daha sonra FDA tarafından onaylanmış ve gıda takviyesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Takviye olarak kullanılan *Haematococcus pluvialis* mikroalgi tarafından sentezlenen formudur (9, 46).



Şekil 2.10. Astaksantinin moleküler yapısı (8).

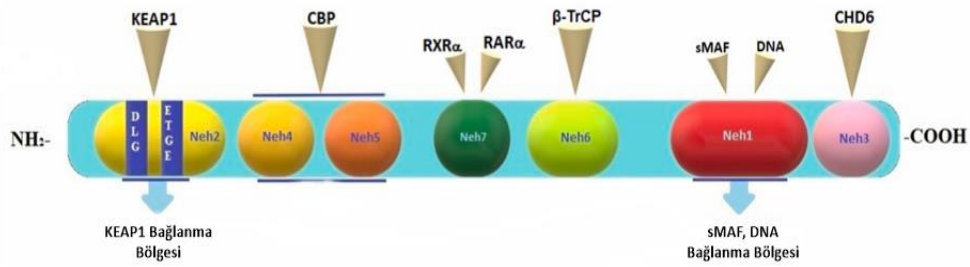
2.7.3. Astaksantin ve Antioksidanlar

Yapılan son çalışmalara göre astaksantin farmasötik ve nutrasötik etkinliğine karşı ilgi giderek artmaktadır. Kanseri, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi kronik durumlar oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres ise proteinleri, lipitleri ve DNA yapısını bozarak hücrede hasar oluşturur. Astaksantin bu hastalıkların neden olduğu oksidatif strese karşı koruma ve inflamatuvar yanıt mekanizmalarını düzenleyerek antioksidan aktivite göstermektedir (9). Ayrıca kombine ilaç olarak kullanılan α -lipoik asitten 75, antosiyaninden 150, polifenolden 200, vitamin E'den 550, Coenzim Q10'dan 800 ve vitamin C'den 6000 kat daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Ek olarak antiinflamatuvar, antiapoptik, antikarsinojenik ve antidiyabetik etkinliği daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (46, 48). Diyabet hastalığının retinopatiye neden olması sonucu oluşan hasara karşı astaksantin hücre içerisinde ARE ile ilişkili Nrf2'yi düzenlediği ve nükleusa taşınarak heme oksijenaz-1 (HO-1) düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir (49). Yine başka bir araştırmada keratinositlerin UV ışınlarının hasarına karşı ROS ve inflamatuvar faktörler olan IL-1 β , TNF- α ekspresyonunu azaltarak koruma sağlamıştır (50). Bu çalışma klinik olarak da uygulanmış ve ağızdan alınan astaksantin UV ışınlarından korumuştur (51).

2.7.4. Astaksantin ve Nrf2 Sinyal Yolu

Oksidatif stres ve inflamasyon durumunda birçok sinyal yolu aktive olmaktadır. Nrf2'de bu sinyal yollarından biridir. Nrf2, protein yıkımı, DNA onarımı, REDOX homeostazisi ve eksojen metabolizma ile immün yanıtın düzenlenmesinde çeşitli işlevleri

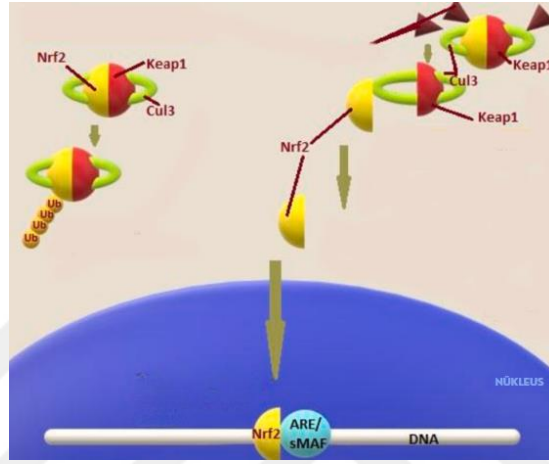
olan kritik bir transkripsiyonel düzenleyicidir. Son yıllarda kanserin önlenmesinde ve tedavisinde temel hedeftir. Hücre sitoplazmasında pasif halde bulunan Nrf2 insanların ikinci kromozomun 2q31.2 bölgesinde bulunan *NFE2L2* geni tarafından kodlanan, 605 aminoasitlik alkali lösin fermuar protein ailesindendir (52). 7 özel aktive ve inhibisyon bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.11). Bu bölgelerden birincisi Neh1 bölgesidir ve DNA veya muskuloaponevrotik fibrosarkomlar (sMaf) bağlanma bölgesi içerir. Neh 2 bölgesi kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1) bağlanma bölgesidir. Neh 3 sitoplazmada Nrf2'nin aktif hale gelmesinde rol alır. Neh 4 ve 5, bağlayıcı proteine (CBP) ve siklik adenosin monofosfat yanıt elemanı aktivatörüne (CREB) bağlanma bölgesidir. Neh 6, β -transducin tekrar proteine (β -TrCP) bağlanma bölgesidir. Neh 7 ise baskılama bölgesidir (53, 54). Nrf2'nin aktivasyonu kanser gelişimini engelleyebilmektedir ancak çok fazla aktive olması ve eksprese edilmesi hücrenin kanserleşmesine, radyasyon ve kemoterapiden hücrenin kaçmasına neden olmaktadır (52).



Şekil 2.11. Nrf2 spesifik bölgeleri (54).

Astaksantin, fosfoinosid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) ve mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK)/hücre dışı sinyal ile düzenlenen protein kinaz (ERK) sinyal yollarını düzenleyebilmektedir. Hücre içine alınan astaksantin birçok sinyal yolağını düzenlemektedir. Bu sinyal yollarından biride Nrf2'dir ve normal fizyolojik şartlarda Nrf2, Keap1 ve Cul3 protein kompleksi şeklinde inaktif halde bulunur ve yarı ömrü yirmi dakikadır (Şekil 2.12). Keap1 üzerinde inaktif sistein bölgesi bulunmaktadır ve oksidanlar, proinflatuar sitokinler veya elektrofilik ajanlar tarafından modifikasyona uğrayarak Nrf2'nin, Keap1'den ayrılarak aktif hale gelmesine neden olur. Keap1'den ayrılan Nrf2, sitoplazmadan nükleusa translokasyon olur ve önce sMaf'a ile heterodimer oluşturur daha sonra antioksidan yanıt elemanına (ARE) bağlanarak antioksidan yanıt elemanının transkripsiyonunu başlatır. Bunlar; Heme Oksijenaz (HO-

1), glutamat-sistein ligaz değiştirici alt birim (GCLM), NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-1 (NQO-1), glutamat-sistein ligaz katalitik (GCLC) ve glutatyon-S-transferaz- α 1'dir (GST- α 1) ve oksidatif strese karşı yanıt oluşur (54-56) . Kanseri hücrelerinin metabolizması genler tarafından kontrol edilemediği için hücrede aşırı ROS birikimine ve antioksidanların çok fazla aktivasyonuna neden olur. Kanseri hücrelerinin Nrf2, Neh 2 bölgeleri mutasyona uğramıştır ve çok fazla aktive olarak kanseri hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına destek olur (52).



şekil 2.12. Nrf2 sinyal yolağı (54).

Normal fizyolojik şartlar altında sağlıklı bir hücrede Nrf2 seviyeleri kontrollü bir şekilde arttırılırsa kanserleşme önlenir. Ancak uzun süreli aktivasyonu kanserli hücrelerin artmasına hatta metastazına neden olmakta ve ayrıca kemoterapik ilaçlara karşı hücreye direnç kazandırmaktadır. Nrf2'nin bu karanlık yüzü henüz aydınlatılamamakla birlikte araştırmalar devam etmektedir (57).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Beyanı

Bu proje İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından HAYBİS 17821 kodu ile onaylanmıştır. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-3360 proje koduyla finanse edilmiştir.

3.2. Deney Hayvanları ve Tasarım

Deneyde kullanılan hayvanlar İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden satın alındı. Proje kapsamında WSSPAS (Web-Based Sample Size & Power Analysis Software programı) kullanılarak minimum örneklem büyüklüğü hesaplandı. Buna göre I. tip hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1-beta) 0.8 ve etki büyüklüğü 0.65 olacak şekilde her bir grupta en az 8 hayvan olarak tespit edildi. Ancak sisplatin uygulanacak gruplarda ölüm riski nedeniyle 10 hayvan kullanıldı.

Deneyde 16 haftalık 300-350 gram ağırlığında 36 adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her bir gruptaki sıçanlar deney süresi boyunca iki plastik kafeste barındırılacak şekilde yerleştirildi ve $24\pm2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saatlik karanlık/aydınlık döngü altında deney odalarında tutuldu. Standart pelet yemine ve içme suyuna sınırsız erişim sağlandı ve bir hafta boyunca kafeslerde alışma sürecine tabi tutuldu. Kontrol ve astaksantin (AST) grubunda 8, sisplatin (CP) ve astaksantin+sisplatin (AST+CP) grubunda 10 adet sıçan olacak şekilde gruplar oluşturuldu (Tablo 3.1). Deney süresi 10 gün olacak şekilde düzenlendi ve deneye başlamadan önce hayvanların ağırlığı ölçülerek not edildi.

Kontrol grubuna deney süresi boyunca oral gavaj (o.g) ile 1 mg/kg zeytinyağı (58) verildi. AST grubu için deney süresi boyunca 25 mg/kg astaksantin (Orzax Ocean) (59) 1 mg/kg zeytinyağı içerisinde homojenize bir şekilde karıştırarak o.g. ile verildi. CP grubuna deneyin ilk günü 7 mg/kg intraperitoneal (i.p.) sisplatin (BDLpharm) (60) uygulandı ve deney süresi boyunca o.g. ile 1 mg/kg zeytinyağı verildi. CP+AST grubuna ise deneyin ilk günü 7 mg/kg i.p. sisplatin uygulandı ve deney süresi boyunca 25 mg/kg astaksantini (59) 1 mg/kg zeytinyağı içerisinde homojenize bir şekilde karıştırılarak o.g. ile verildi.

Tablo 3.1. Deney tasarımı

Gruplar	Uygulama Süresi
Kontrol	10 gün boyunca o.g. 1 mg/kg zeytinyağı verildi.
AST	10 gün boyunca o.g. ile zeytinyağı içerisinde çözündürülmüş 25 AST mg/kg verildi.
CP	Deneyin 1. günü tek doz i.p. 7mg/kg CP uygulandı ve 10 gün boyunca o.g. ile zeytinyağı verildi.
AST+CP	Deneyin 1. Günü tek doz i.p. 7mg/kg CP uygulandı ve 10 gün boyunca o.g. ile zeytinyağı içerisinde çözündürülmüş 25 mg/kg AST verildi.

3.3.Deneyin Sonlandırılması

10 günlük deney süresinden sonra 11. gün hayvanların önce vücut ağırlıkları ölçülerek not edildi. Sisplatin grubundan bir sıçanın öldüğü kaydedildi. Ardından ketamin/ksilazin (50 mg/kg-5 mg/kg) anestezisi altında karın bölgeleri açılarak kalpten kan örnekleri alındı. Daha sonra bu kan örnekleri 3000 RPM’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları ependorf tüplere alınarak biyokimyasal analizler için -80°C’de saklandı. Sağ ve sol testisler, epididimisler ile birlikte çıkarılarak ayrıldı ve sağ testislerin ağırlıkları ölçülerek not edildi. Sağ testis histolojik analizler için %10’luk formaldehit solüsyonuna alındı. Sol testisler ise biyokimyasal analizler için aliminyum folyolara sarılarak -80°C’de saklandı. Sperm parametreleri için sağ epididimisin kauda bölgesi çıkarılarak 1 ml serum fizyolojik su ile doldurulan ependorf tüpleri içinde +4°C saklandı.

3.4. Histolojik Yöntemler

Alınan testis dokuları histopatolojik değerlendirmeler için %10’luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Daha sonra tespit maddesinden alınan dokular hızlı bir şekilde trimlenerek plastik kasetler içerisine konuldu ve tekrar formaldehit solüsyonuna alındı. Tespit olan testisler, daha sonra doku takip işlemleri için Tissue-Tek VIP/SAKURA marka cihaza alınarak dehidrasyon, şeffaflaştırma ve infiltrasyon aşamalarına tabi tutuldu.

Dehidrasyon aşaması; dokudan suyun alkol ile uzaklaştırılmasına dayanmaktadır. Dokular %70-80-96 ve %99'luk (absolü) alkol serilerine alındı. Her bir seri içerisinde 1'er saat bekletildi.

Şeffaflaştırma aşaması; dokunun şeffaflaşarak alkol ile ksilenin yer değiştirmesine dayanır. Absolü alkolden alınan dokular üç ksilen serisinden geçirildi. Her bir ksilen aşamasında 1'er saat bekletildi.

İnfiltrasyon aşaması; ksilenden çıkarılan dokular sıcak parafin içerisinde alındı. Bu aşamadaki amaç doku içerisinde parafinin nüfuz etmesidir. Dört parafin serisinde 1'er saat bekletilerek doku içerisinde ksilenin parafin ile yer değiştirmesi sağlandı.

Bloklama; bu aşama dokuların infiltrasyon maddesi içerisinde gömülmesine dayanır. Testis dokusu bir yüzey özelliği arz etmediği için trimlenen en geniş yüzeyi alta gelecek şekilde metal kasetler içerisinde sıcak parafin konulup dondurularak bloklandı. Bu işlem için Leica EG1160 markalı cihaz kullanıldı.

Kesit alma; parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom cihazında 5 µm kalınlığında kesitler alınarak DEN092A markalı parafin su banyosu üzerinde +55°C'de açılması bekletildi ve immünohistokimyasal analizler için polilizin kaplı pozitif lamlara, hematoksilen-eozin (H-E) boyama için ise rodajlı lamlara doku kesitleri alındı.

3.4.1. Mayer's Hematoksilen-Eozin Metodu

Bu boyama metodunun amacı, hematoksilen ile hücre nükleuslarını ve eozin ile hücre sitoplazmasını boyamaktır. Bu metod için Leica CV5030 marka boyama cihazı kullanıldı. Öncelikle doku kesitleri, etrafındaki parafinin erimesi için +65°C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 3 ksilen serisine alındı ve her bir seride 5'er dakika bekletilerek alkol serilerine alındı. Kesitler %99'luk (absolü) alkolden başlayarak %80 ve %70'lik her bir seride 3'er dakika bekletildi. Distile suya alınarak ~1 dakika bekletildi ve Mayer's hematoksilene alınarak 10 dakika beklendi. Daha sonra 3 çeşme suyu serisine alınarak 5'er dakika yıkandı ve eozine alınarak 2 dakika bekletildi. Eozin boyamasından sonra dokular %70, %80 ve absolü alkol serilerinde 3'er dakika bekletilerek ksilene alındı ve 3 ksilen serisinde 5'er dakika bekletilerek boyama işlemi tamamlandı.

3.4.2. İmmünohistokimya Metodu

Bu yöntem, hücrede hem protein ekspresyonunu hem de lokalizasyonunu belirleyerek görselleştirmek amacıyla kullanılır. Yöntemde doku içindeki belirli proteinleri (antijenleri) etiketleyerek ışık mikroskopuyla görünür hale getirmek için spesifik antikorlar kullanılmaktadır. İmmünohistokimya için bu projede; Nrf2, HO-1, kaspaz-3, 3 β -HSD, vimentin ve PCNA antikorları kullanıldı.

Deparafinizasyon aşaması; dokudan parafini uzaklaştırmak için yapılır. Sepete dizilen lamalar +65°C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 3 ksilen serisinde 5'er dakika bekletilerek parafin uzaklaştırıldı.

Dehidrasyon aşaması; ksilenden alınan dokular %99, %80 ve %70'lik alkol serilerinde 3'er dakika bekletildi. Bu aşamada dokuya nüfuz eden alkol, ksilen ile yer değiştirmektedir.

Rehidrate aşaması; dokuya tekrar suyun kazandırılması için yapılır. Alkol serilerinden alınan dokular distile suya konularak 5 dakika rehidrate edildi.

Sitrat tamponu (pH: 6.0); dokudaki antijenik bölgeleri ortaya çıkarmak için yüksek basınç altında bekletilmesine dayanır. Lamalar sitrat tamponu içine alındı ve 2100 Retriever marka otoklavda 121 °C'de 15 dakika kaynatıldı ve daha sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokular distile suya ve daha sonra fosfat tamponlu saline (PBS) alındı. PBS'ten çıkarılan dokuların etrafı hidrofobik kalem ile çizilerek boya platformuna dizildi.

Hidrojen peroksit blok aşaması; dokudaki endojen peroksidazları inhibe ederek kullanacağımız antikorun yanlış pozitiflik vermesini engellemektedir. Platforma yatay şekilde dizilen lamalar üzerine hızlı bir şekilde hidrojen peroksit blok damlatarak 12 dakika bekletildi. Daha sonra PBS'e alınarak yıkandı.

Protein blok aşaması; protein blok dokudaki biyotin ve avidini inhibe ederek sekonder antikor aşamasında kullanılacak olan biyotinlenmiş keçi anti-polivalentinin dokudaki avidine bağlanmasını sağlayarak yanlış pozitiflik vermesini engellemektedir. Doku kesitlerine damlatılan protein blok 5 dakika bekletildikten sonra uzaklaştırıldı ve kesitler PBS solüsyonunda yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi.

Primer antikor aşaması; üretici firma tarafından verilen bilgilere göre dilüe edilerek hazırlanan primer antikor doku kesitleri üzerine damlatılarak yaklaşık 1saat bekletildi ve PBS’te yıkandı (Tablo 3.2).

Sekonder antikor (biyotinlenmiş keçi anti-polivalent) aşaması; sekonder antikorun dokuda primer antikora bağlanmasına dayanır. Damlatıldıktan sonra 15 dakika bekletildi ve PBS’e alınarak yıkandı.

Streptavidin peroksidaz aşaması; biyotinlenmiş protein ve molekülleri tespit etmek için kullanılan sekonder antikor, dokular üzerine damlatılarak 15 dakika bekletildi ve PBS ile yıkandı.

AEC kromojen aşaması; kromojen peroksidaz enzimi varlığında kırmızı renk oluşturur. Kromojen aşamasından sonra tüm dokular PBS’e alındı.

Mayer’s Hematoksilen aşaması; hücre nükleuslarının boyanmasına dayanır. PBS’den alınan lamalar hematoksilene konularak 5 dakika bekletildi ve önce çeşme suyunda daha sonra da distile suda 2 dakika yıkandı. Sepetten alınan lamalar kurutma kağıdı üzerine yatay şekilde konularak su bazlı kapatıcı damlatıldı ve lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda görüntülemek için hazır hale getirildi.

Tablo 3.2. Antikor dilüsyon oranları

Primer Antikor	Dilüsyon Oranı	Üreticisi
Nrf2	1:300	Thermo Fisher Scientific
HO-1	1:100	Santa Cruz
Kaspaz-3	1:100	Santa Cruz
3 β -HSD	1:100	Santa Cruz
Vimentin	1:100	Santa Cruz
PCNA	1:100	Santa Cruz

3.5. Histolojik Değerlendirme

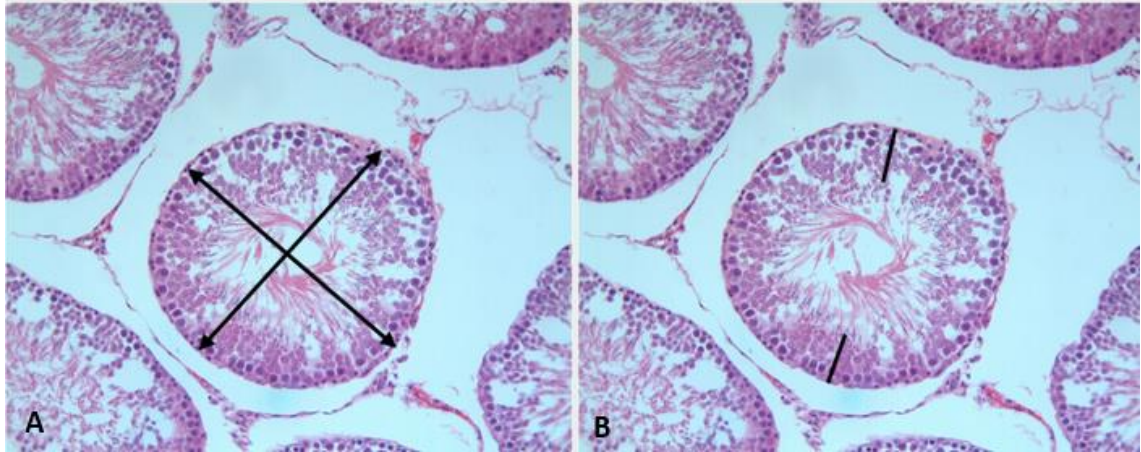
Her bir örnekten rastgele seçilen 30 adet seminifer tübül, atrofi, germ hücre dejenerasyonu, mayotik duraklama, çok çekirdekli dev hücre oluşumu ve olgunlaşmamış germ hücrelerinin lümene dökülmesi gibi dejeneratif değişiklikler açısından incelendi. Tübüler dejenerasyon; yoksa 0, tübülün %1-%25'ini içeriyorsa 1, tübülün %26-%50'sini içeriyorsa 2 ve tübülün %51-%100'ünü içeriyorsa 3 olarak skorlandı (Tablo3.3).

Ayrıca, her preparattan 20x büyütmede, VIII. aşamada bulunan 50 adet yuvarlak ve yuvarlağa yakın seminifer tübülün çapı ve epitel kalınlığı ölçüldü (Şekil 3.1).

Değerlendirmeler Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, İngiltere) ile yapıldı.

Tablo 3.3. Histopatolojik puanlama

Derece	Yaygınlık (% olarak)
0	Dejenerasyon Yok
1	%1-25
2	%26-50
3	%51-100



A. Seminiser tübül çap ölçümü. B. Seminifer tübül epitel kalınlığı ölçümü.

Şekil 3.1. Seminifer tübül çap ve epitel yükseklik ölçümü.

3.6. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Nrf2, HO-1, kaspaz-3, vimentin ve 3 β -HSD proteinleri için yapılan değerlendirmede her bir örnekten 30 seminifer tübüldeki boyanma, immünreaktivitenin yaygınlığı (0: 0-%25, 1: %26-50, 2: %51-75, 3: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +1: hafif, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı (Tablo 3.4). Toplam boyanma skoru (H); yaygınlık x şiddet hesaplanarak elde edildi (61).

Tablo 3.4. H skor değerlendirme

İmmünreaktivite Yaygınlığı		İmmünreaktivite Yoğunluğu	
4	%100-76	3	Güçlü Boyanma
3	%75-51	2	Hafif Boyanma
2	%50-26	1	Zayıf Boyanma
1	%25-0	0	Boyanma Yok

PCNA, hücre bölünmesine hazırlık aşaması olan S fazındaki hücreleri görünür hale getirmek için kullanılan bir belirteçtir. PCNA proteini için immünreaktivite değerlendirilmesi immünreaktif hücre yoğunluğuna göre (4: %95-100, 3: %94-80 2: %79-50 ve 1: %49 >) yapıldı (62). Değerlendirmeler Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win görüntü analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd. Cambridge, İngiltere) ile gerçekleştirildi (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. PCNA immünreaktivite değerlendirme

Derece	PCNA immünreaktif hücre yoğunluğu (% olarak)	
4	1-2 Hücre Kaybı	%95-100
3	3-10 Hücre Kaybı	%94-80
2	10-30 Hücre Kaybı	%79-50
1	30< Hücre Kaybı	%49 >

3.7. Sperm Sayısının Değerlendirilmesi

Deney sonunda epididimisin kauda bölgesi çıkarılarak 1 cc serum fizyolojik ile dolu eppendorf tüplerine alındı ve +4°C’de saklandı. Eppendorf tüpler içerisinden çıkarılan epididimisler parçalara ayrılarak spermeler ortaya çıkarıldı ve tekrar eppendorf tüpler konuldu. Daha sonra 5000 RPM’de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları başka eppendorflara alındı ve homojenize edildi. Homojenize edilen spermelerden 15 µl mikro pipet yardımıyla çekilerek Thoma lamı üzerine damlatıldı ve X200 büyütmede sperm yoğunluğu değerlendirildi. Thoma lamı üzerinde 16 büyük kare ve her karede 16 küçük

kare bulunmaktadır. Yani toplamda 256 küçük kare bulunmaktadır ve değerlendirme için 16 büyük karenin dört kaşesi ve ortadan herhangi bir büyük kare değerlendirmeye alındı. Lam üzerine alınan her bir örnekte 5 büyük kare yani 80 küçük kare üzerine düşen spermiler sayılarak not edildi ve daha sonra istatistiksel analizleri yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Thoma lamı sperm sayımı

3.8. Biyokimyasal Analizler

Çalışma sonunda kurban edilen hayvanların sol testisleri, biyokimyasal analizler için hızlı bir şekilde toplanarak -80°C 'de kaldırıldı. Daha sonra çalışılmak üzere çıkarılan dokular ayrı ayrı tartılarak her örnekten 100 ± 10 mg alındı. Ultra Turrax T25 bazik homojenizatör kullanılarak parçalandı ve 1 mL PBS (50mM, pH=7.4) ile homojenize edildi. Daha sonra Bandelin Sonopuls HD 2070 ultrasonik homojenizatör (IKA Labortechnik; IKA-Werke, Staufen, Almanya) ile 3×15 saniye sonikasyona tabi tutuldu. Elde edilen bu homojenat 14000 RPM 'de 10 dakika santrifüz edildi ve süpernatant kısımları toplanarak ependorf tüplere alındı ve -20°C 'de saklandı. Protein konsantrasyonlarını belirlemek için standart BSA ile sıgır albümini kullanılarak Bradford yöntemi ile değerlendirildi (63).

3.8.1. Malondialdehit (MDA) Seviyelerini Değerlendirme

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) seviyesi Kunio ve arkadaşları tarafından bildirilen metoda göre belirlendi (64). $500 \mu\text{L}$ PBS (50 mM; pH 7.4) içeren tüplere 0.05 g karaciğer ve testis dokusu tartılarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenatlar 4°C , 10.000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra

süpernatantlardan 100 µL cam tüplere alınarak üzerine 200 µL % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 11 distile su ile hazırlanan 700 µL %0.8 TBA ve %20 asetik asit çözeltisi ilave edildi. Cam tüpler 60 dakika boyunca (100 °C) su banyosunda inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Karışım 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Oluşan pembe renkli kromojenin absorbansı bir mikrolaka okuyucu (BioTek Instruments, ABD) ile 532 nm'de ölçülmüştür. Örneklerdeki MDA seviyeleri standart olarak 1.1.3.3-tetrametoksipropen kullanılarak standart bir eğriden hesaplandı. Dokulardaki MDA seviyeleri nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.8.2. Total Glutasyon (tGSH) Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Karaciğer ve testis dokularındaki tGSH içeriği Arbo ve ark. (65) tarafından uygulanan yöntemle göre belirlendi. İlk olarak 0.24 mM NADPH ve 0.7 mM DTNB çözeltisi PBS (71.5 mM Na₂HPO₄, 71.5 mM NaH₂PO₄ ve 0.63 mM EDTA; pH 7.5) tamponu içinde taze olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu çoklu plakaya 100 µL numune, standart ve kör bırakıldıktan sonra 65 µL taze hazırlanmış reaktif (0.24 mM NADPH ve 0.7 mM DTNB) ilave edildi. Karışım daha sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben her kuyucuğa 40 µL taze glutasyon redüktaz solüsyonu (10 U/mL PBS) eklenerek reaksiyonun gerçekleşmesi ve sarı bir renk elde etmek için 3 dakika 37 °C'de inkübe edildi. 5-tiyo-2- nitrobenzoik asit oluşumunun absorbansı bir mikrolaka okuyucu (BioTek Instruments, ABD) aracılığıyla 412 nm'de izlendi. Her numunedeki tGSH seviyesini hesaplamak için standart eğri kullanıldı ve elde edilen sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 40 µL taze glutasyon redüktaz çözeltisi eklenerek sarı renk alması için 3 dakika bekletildi. Daha sonra 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit absorbansı, mikro plaka okuyucu tarafından 412 nm'de takip edildi. tGSH seviyeleri nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.8.3. Testosteron Hormon Testi

Testis dokularındaki testosteron seviyesinin belirlenmesi için Elabscience'dan (Testosteron, ELISA Kit. Katalog No: E-EL-0155, Wuhan, Çin) temin edilen 0.31-20 ng/mL tespit aralığı ve 0.17 ng/mL hassasiyete sahip olan ELISA kitindeki protokoller takip edilerek ölçüldü. Testosteron miktarı yaş doku ağırlığı başına salınan ng cinsinden testosteron konsantrasyonu olarak edildi.

3.9.İstatistiksel Analiz

Çalışma sonunda elde edilen veriler, IBM SPSS Statistics uygulaması 27.0 sürümü kullanılarak analizleri yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Shapiro-Wilk testi ile karar verildi. Normal dağılım gösteren veriler Anova (Tamhane T2) testi ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler için parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanıldı ve ikili gruplar arası karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmesiyle Mann-Whitney-U testi ile yapıldı. Zamana bağlı farklılıkların belirlenmesinde *paired sample* T testi kullanıldı. Veriler dağılımına göre medyan (minimum-maksimum) ve aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma sonunda elde edilen bulgular şekil ve tablolar ile gösterilerek açıklanmıştır. Test sonuçlarının anlamlılık dereceleri $p<0.05$ ise anlamlı, $p>0.05$ ise anlamlı bir fark yoktur şeklinde yorumlandı.

4.1. Hayvan Vücut Ağırlık Bulguları

Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıklarının karşılaştırmalı istatistiksel analizleri yapıldı (Tablo 4.1). Kontrol ve AST grupları, deney başlangıcı ve sonu vücut ağırlıkları yönünden benzer bulundu. Diğer yandan, CP ve AST+CP gruplarında deney sonrası vücut ağırlıklarının, deney başlangıcındaki ağırlığa göre anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0.05$).

Tablo 4.1. Deney başlangıcı ve sonu arasındaki vücut ağırlık oranları

Gruplar	Deney başlangıcı	Deney sonu
Kontrol	325.25±39.75	329.63±35.93
AST	326.50±22.50	325.50±20.28
CP	333.40±36.68	289.10±40.42 ^a
AST+CP	340.89±37.07	314.00±43.52 ^a

Veriler AO±SS olarak ifade edildi. ^aDeney başlangıcına göre anlamlı göre azalma ($p<0.05$).

4.2. Testis Ağırlık Bulguları

Çalışma sonunda elde edilen sağ testis doku ağırlıklarının istatistiksel analizleri yapıldı (Tablo 4.2). Sonuçlara göre kontrol ve AST gruplarında testis ağırlıkları benzer bulundu. CP grubunda ortalama testis ağırlığı kontrol ve AST gruplarına göre hafif düzeyde azalmış olmakla beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. AST+CP grubunda, CP grubu ile karşılaştırıldığında, testis ağırlığında bir artış olduğu ancak bu artışın da anlamlı olmadığı tespit edildi.

Tablo 4.2. Ortalama testis ağırlığı.

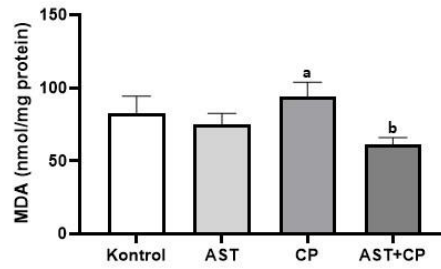
Gruplar	Testis ağırlığı
Kontrol	1.43±0.12
AST	1.40±0.07
CP	1.32±0.12
AST+CP	1.38±0.09

Veriler AO±SS olarak ifade edildi.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. MDA Seviyesi

MDA seviyesi, kontrol ve AST gruplarında benzer ($p>0.05$) bulundu. CP grubunda MDA seviyesinin, kontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). Diğer yandan, AST+CP grubunda, MDA seviyesinin CP grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). MDA seviyesi gruplar arası karşılaştırıldı (Şekil 4.1).

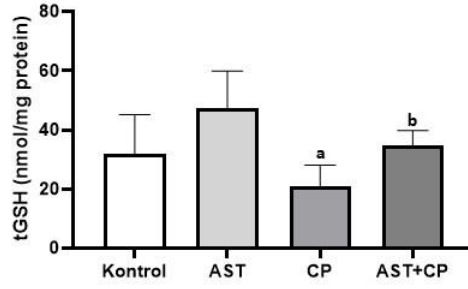


Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$), ^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$).

Şekil 4.1. MDA seviyelerinin karşılaştırılması.

4.3.2. tGSH Seviyesi

tGSH seviyesinin, en yüksek AST grubunda tespit edilmekle birlikte, kontrol ve AST gruplarında istatistiksel olarak benzer olduğu bulundu. En düşük tGSH seviyesi CP grubunda saptandı ($p<0.01$). Diğer yandan, tGSH seviyesi yönünden, CP grubu ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmazken; CP grubu ile AST grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. AST+CP grubunda ölçülen tGSH seviyesinin CP grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde yüksek olduğu bulundu ($p<0.01$). tGSH seviyesi gruplar arası karşılaştırıldı (Şekil 4.2).

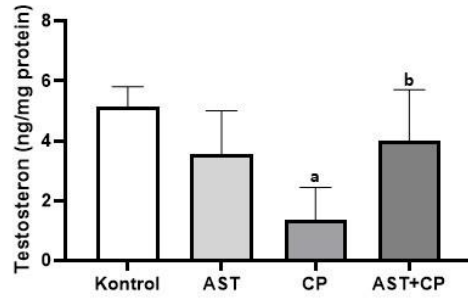


Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aAST grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), ^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.01$).

Şekil 4.2. tGSH seviyelerinin karşılaştırılması.

4.3.3. Testosteron Seviyesi

En yüksek serum testosteron seviyesi kontrol grubunda ölçüldü. Bununla birlikte, testosteron seviyesi, kontrol ve AST gruplarında istatistiksel olarak benzer bulundu. CP grubunda, testosteron seviyesinin düşük olduğu ve bu farkın kontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). AST+CP grubunda, testosteron seviyesinin CP grubuna göre belirgin olarak yükseldiği tespit edildi ($p < 0.05$). Serum testosteron seviyesi gruplar arası karşılaştırıldı (Şekil 4.3).



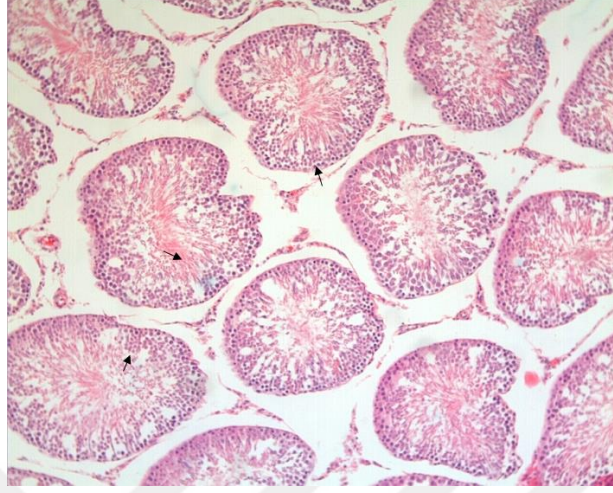
Serum testosteron seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), ^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.01$).

Şekil 4.3. Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.

4.4. Histopatolojik Bulgular

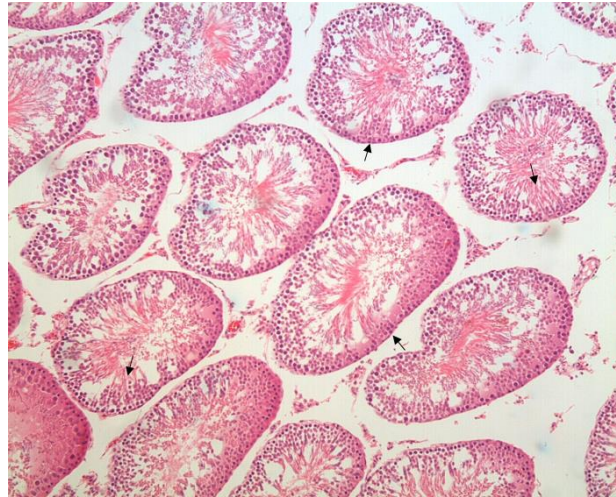
Histolojik incelemeler sonucunda, kontrol (Şekil 4.4) ve AST (Şekil 4.5) gruplarında seminifer tübüllerin büyük bir kısmı normal histolojik görünümde izlendi. Sertoli ve spermatogenik seri hücreleri belirgin olarak ayırt edilen seminifer epitel, normal görünüme sahipti. Ortalama tübül çapı ve seminifer epitel kalınlığı, sırasıyla,

kontrol grubunda $307.73 \pm 11.86 \mu\text{m}$ ve $52.81 \pm 1.12 \mu\text{m}$; AST grubunda $308.97 \pm 9.81 \mu\text{m}$ ve $53.16 \pm 1.97 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Bu parametreler yönünden kontrol ve AST grupları istatistiksel olarak benzer bulundu.



Kontrol grubu seminifer tübül yapıları normal histolojik görünümünde (oklar) izlenmektedir (H-E,X100).

Şekil 4.4. Kontrol grubu histopalotjik değerlendirme.

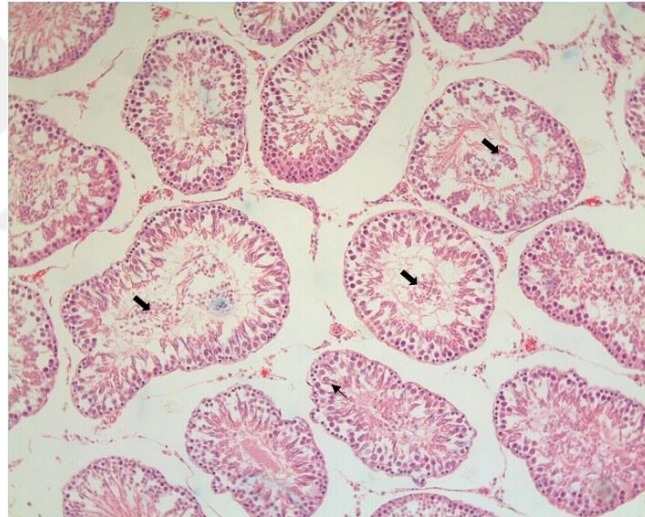


AST grubu seminifer tübül yapısı kontrol grubu ile benzer histolojik görünümünde (oklar) izlenmektedir (H-E, X100).

Şekil 4.5. AST grubu histopalotjik değerlendirme.

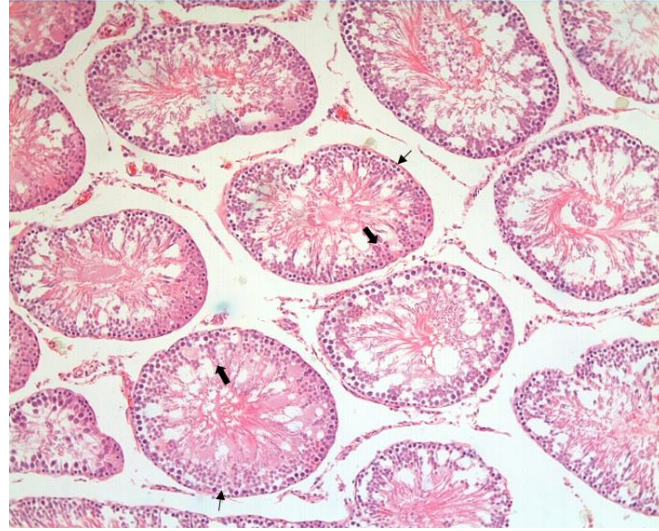
CP grubunda seminifer tübüllerde dejeneratif değişiklikler izlendi. Yer yer gözlenen atrofik tübül, spermatogenik hücrelerdeki mayotik duraksama, çok çekirdekli

dev hücrelerin varlığının yanı sıra bu gruptaki en dikkat çekici değişiklik olgunlaşmamış germ hücrelerinin lümene dökülmesiydi (Şekil 4.6). Bu değişiklikler yönünden CP grubu kontrol ve AST gruplarından istatistiksel olarak farklı bulundu ($p<0.001$). CP grubunda ölçülen ortalama tübül çapının ($299.67\pm7.30 \mu\text{m}$) kontrol ve AST gruplarına benzer olduğu ancak, ortalama seminifer epitel kalınlığının ($50.93\pm1.27 \mu\text{m}$) kontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). AST+CP grubunda seminifer tübüllerde izlenen dejeneratif değişiklikler CP grubuna göre hafif düzeyde azalmış olmakla birlikte, istatistiksel olarak bu farkın anlamlı olmadığı saptandı (Şekil 4.7). Bu grupta ortalama tübül çapı ($303.34\pm13.11 \mu\text{m}$) CP grubuna benzer bulunurken ortalama seminifer epitel kalınlığının ($52.92\pm1.99 \mu\text{m}$) ise CP grubuna göre belirgin şekilde arttığı bulundu ($p<0.05$). Histopatolojik değerlendirme sonuçları (Tablo 4.3) seminifer epitel kalınlığı (Şekil 4.8) ve seminifer tübül çapı (Şekil 4.9) değerlendirildi.



CP grubunda gelişimini tamamlamamış spermatogenik hücrelerin (ok) lümene dökülmesi (kalın oklar) dikkat çekmektedir (H-E, X100).

Şekil 4.6. CP grubu histopatolojik değerlendirme.



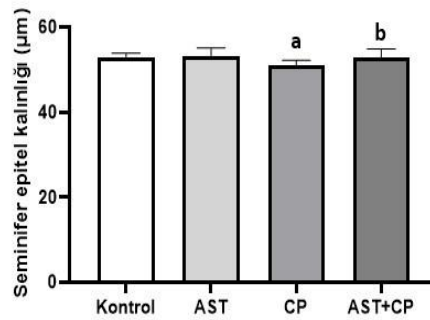
AST+CP grubunda lümene dökülen gelişimini tamamlamamış hücrelerin azaldığı (oklar) ve dejenerasyonun hafiflediği gözlenmektedir (H-E, X100).

Şekil 4.7. CP+AST grubu histopatolojik değerlendirme.

Tablo 4.3. Histopatolojik değerlendirme

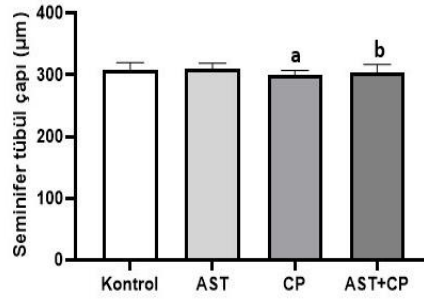
Gruplar	Histopatolojik Skor
Kontrol	0.0 (0.0-1.0)
AST	0.0 (0.0-1.0)
CP	0.0 (0.0-3.0) ^a
AST+CP	0.0 (0.0-3.0)

Veriler medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST gruplarına göre anlamlı bir azalma ($p < 0.001$).



Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. Epitel kalınlığı ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$), ^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.8. Seminifer epitel kalınlığı değerlendirme.



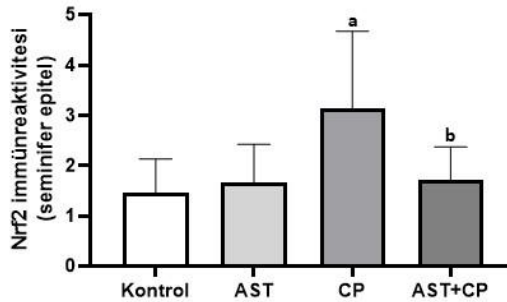
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. Tübül çapı ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$), ^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.9. Seminifer tübül çapı değerlendirme.

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

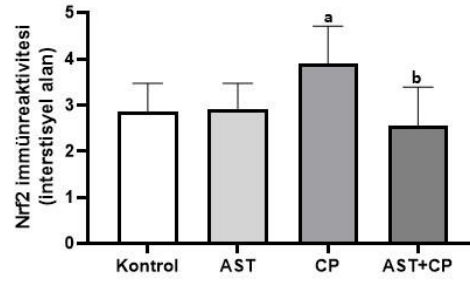
4.5.1. Nrf2, HO-1 ve kaspaz-3 immünreaktivitesi

Nrf2 (Şekil 4.10 ve 4.11), HO-1 (Şekil 4.16 ve 4.17) ve kaspaz-3 (Şekil 4.22 ve 4.23) immünreaktivitesi hem seminifer epitelde hem de interstisyel alanda değerlendirildi. Buna göre kontrol ve AST gruplarında hafif düzeyde izlenen Nrf2 (Şekil 4.12 ve 4.13), HO-1 (Şekil 4.18 ve 4.19) ve kaspaz-3 (Şekil 4.24 ve 4.25) immünreaktivitelerinin benzer olduğu gözlemlendi. Diğer yandan CP grubunda Nrf2 (Şekil 4.14), HO-1 (Şekil 4.20) ve kaspaz-3 (Şekil 4.26) proteinlerin immünreaktivitesinde, kontrol ve AST gruplarına kıyasla belirgin bir artış saptandı ($p < 0.05$). Diğer yandan, AST+CP grubunda Nrf2 (Şekil 4.15), HO-1 (Şekil 4.21) ve kaspaz-3 (Şekil 4.27) protein immünreaktivitesinin azaldığı ve bu azalmanın CP grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).



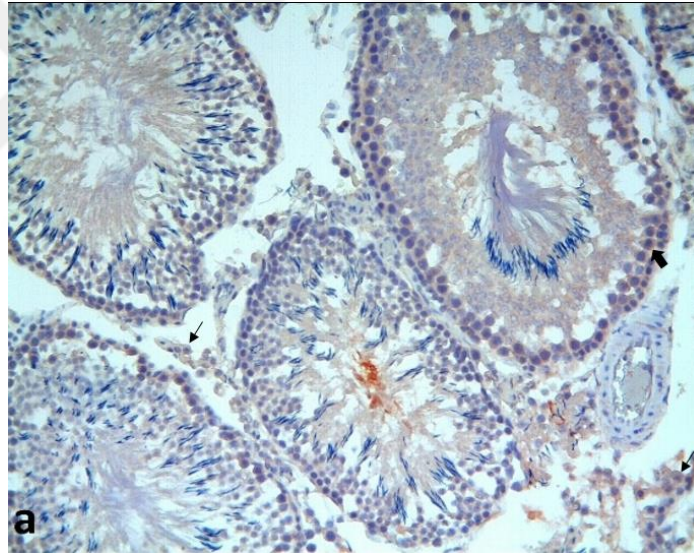
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$), ^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.10. Seminifer epitel Nrf2 değerlendirme.



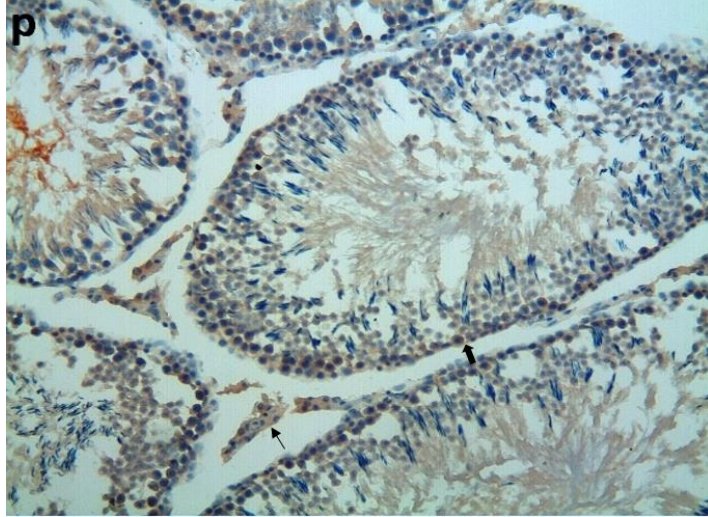
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.11. İnterstisyel alan Nrf2 değerlendirme.



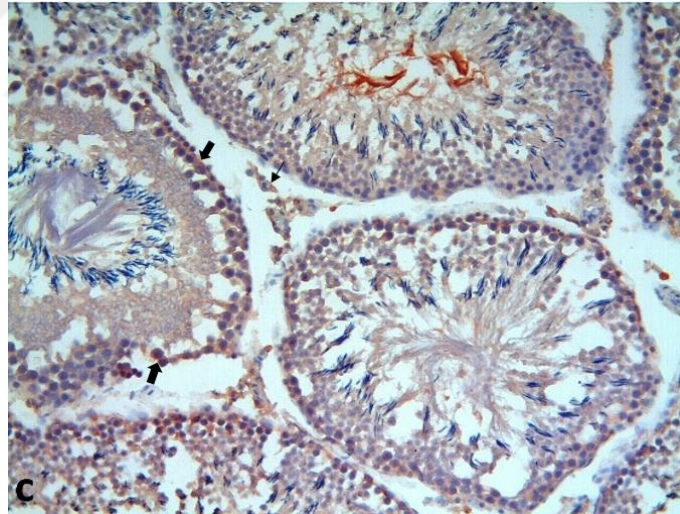
Kontrol grubu seminifer epitel (kalın ok) ve interstisyel alanda hafif (ince ok) düzeyde Nrf2 immünreaktivitesi izlenmekte (X200).

Şekil 4.12. Kontrol grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.



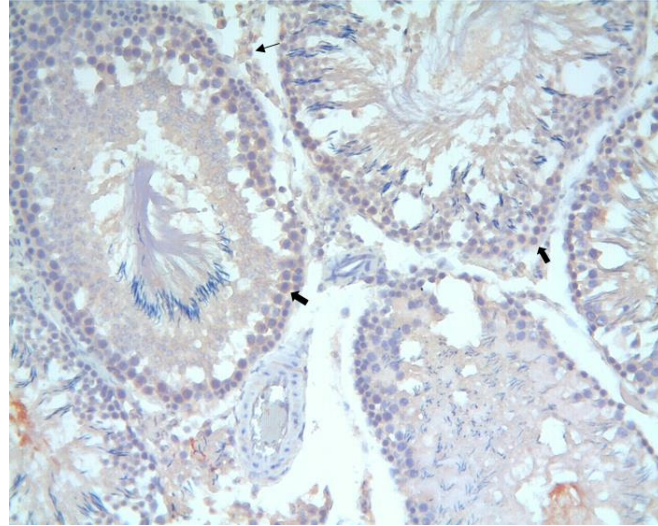
AST grubunda kontrol grubu ile benzer şekilde seminifer epitel (kalın ok) ve interstisyel alanda hafif (ince ok) düzeyde Nrf2 immünreaktivitesi izlenmekte (X200).

Şekil 4.13. AST grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.



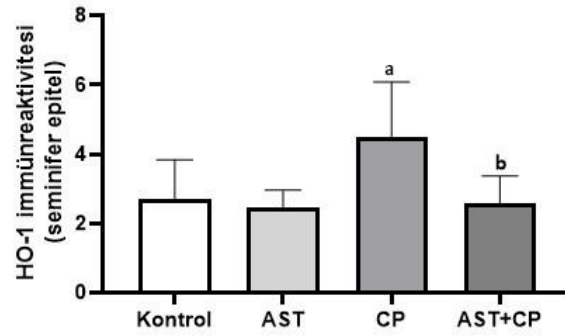
CP grubunda kontrol ve AST gruplarına göre artmış (oklar) Nrf2 immünreaktivitesi izlenmekte (X200).

Şekil 4.14. CP grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.



AST+CP grubunda Nrf2 immünreaktivitesi kontrol grubuna benzer şekilde izlenmekte (X200).

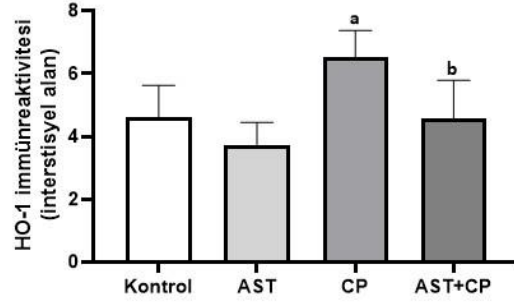
Şekil 4.15. CP+AST grubu Nrf2 immünreaktivite değerlendirme.



Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),

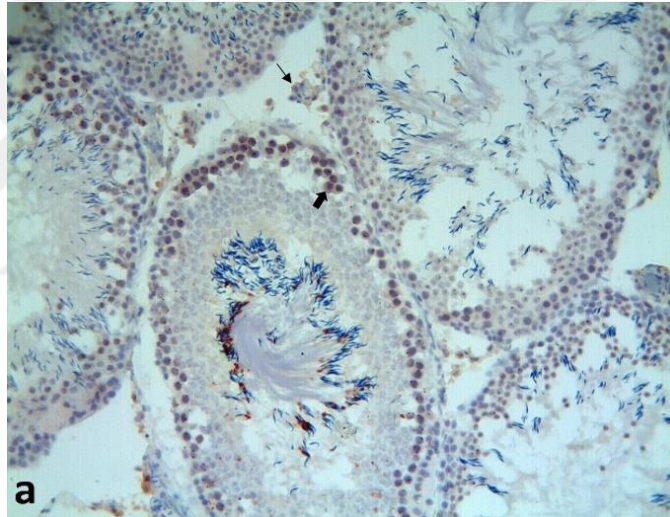
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.16. Seminifer epitel HO-1 değerlendirme.



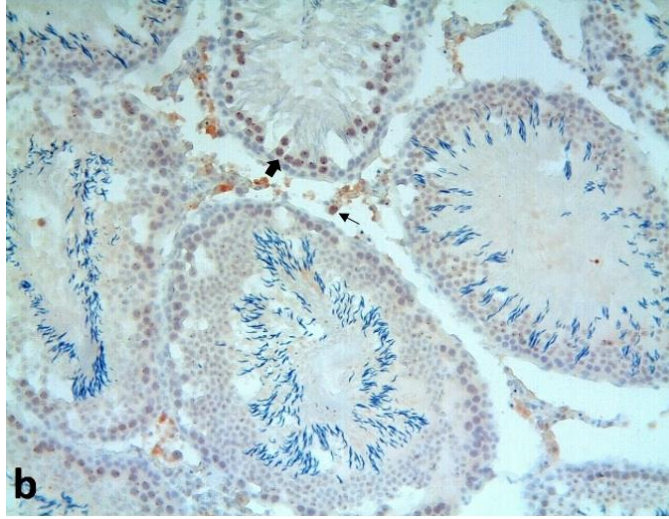
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.17. İnterstisyel alan HO-1 değerlendirme.



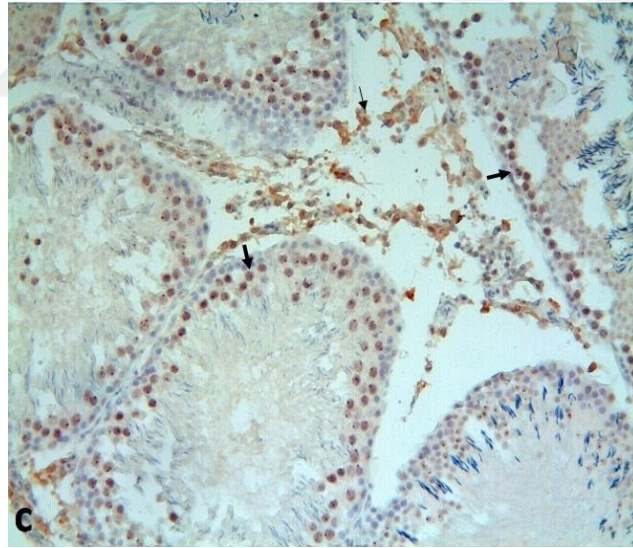
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.18. Kontrol grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.



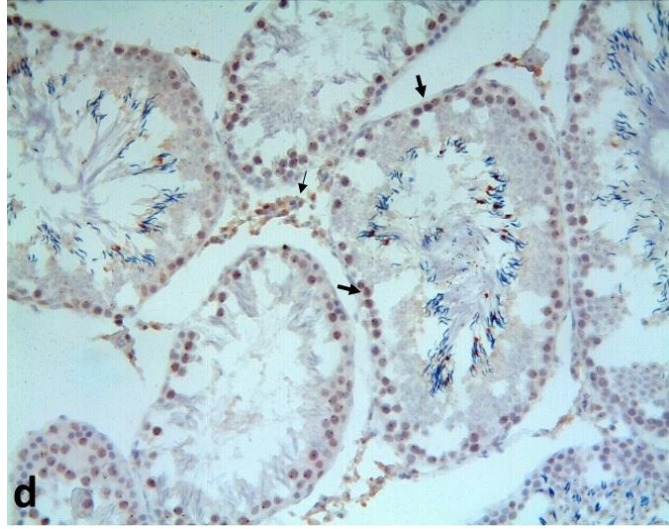
AST grubu seminifer epitel ve interstisyel alanda hafif (oklar) düzeyde HO-1 immünreaktivitesi izlenmekte (X200).

Şekil 4.19. AST grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.



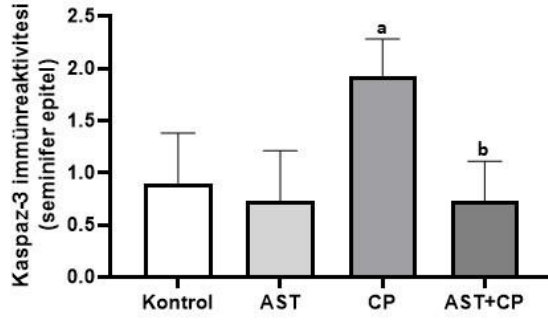
CP grubu HO-1 immünreaktivitesi kontrol grubuna göre belirgin bir artış (oklar) izlenmekte (X200).

Şekil 4.20. CP grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.



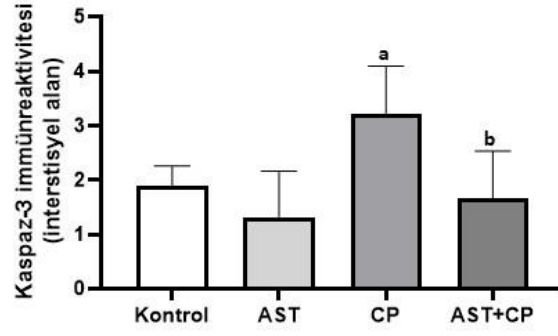
AST+CP grubu HO-1 immünreaktivitesi kontrol grubuna benzer olduğu izlenmekte (X200).

Şekil 4.21. CP+AST grubu HO-1 immünreaktivite değerlendirme.



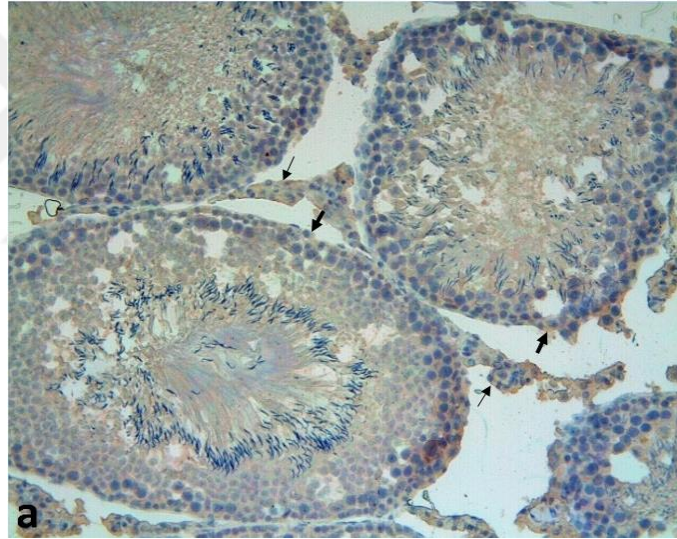
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.22. Seminifer epitel kaspaz-3 değerlendirme.



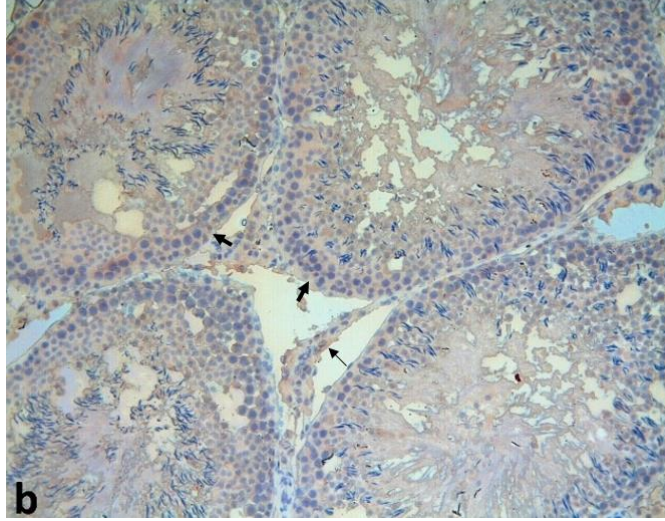
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.23. İnterstisyel alan kaspaz-3 değerlendirme.



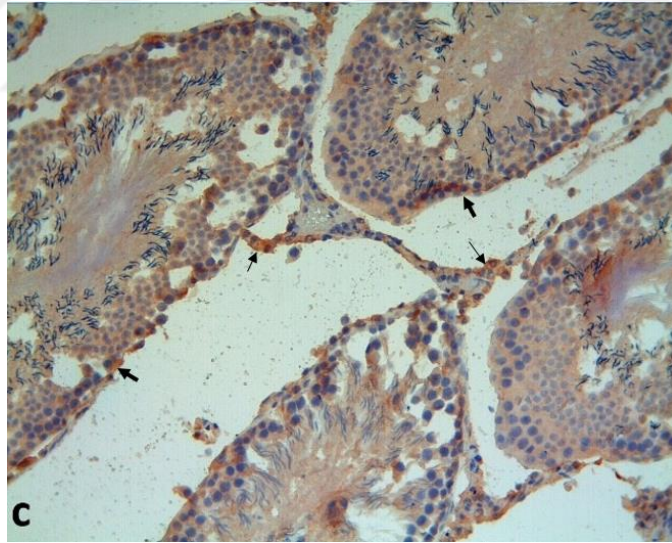
Kontrol grubu seminifer epitel (kalın oklar) ve interstisyel alanda (ince oklar) kaspaz-3 immünreaktivitesi hafif düzeyde izlenmekte (X200).

Şekil 4.24. Kontrol grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.



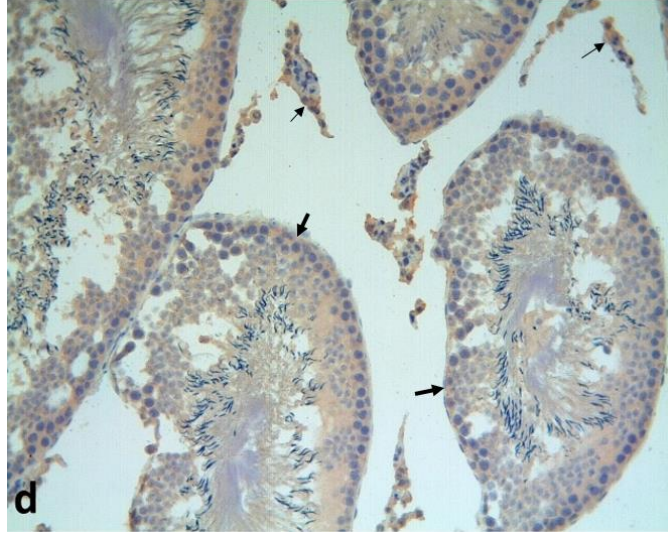
AST grubu seminifer epitel (kalın oklar) ve interstisyel alanda (ince ok) kaspaz-3 immünreaktivitesi hafif düzeyde izlenmekte (X200).

Şekil 4.25. AST grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.



CP grubu, kontrol ve AST gruplarına göre şiddetli (kalın ve ince oklar) immünreaktivite göstermekte. (X200).

Şekil 4.26. CP grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.

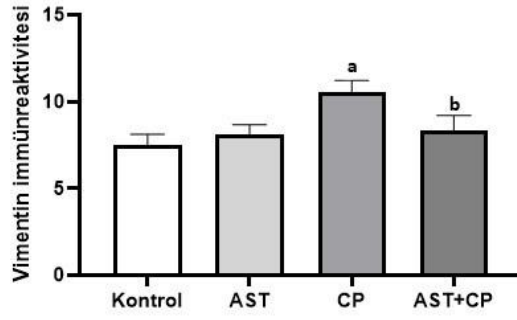


AST+CP grubu CP grubuna göre seminifer epitel ve interstisyel alanda immünreaktivitenin azaldığı (kalın ve ince oklar) dikkati çekmekte (X200).

Şekil 4.27. CP+AST grubu kaspaz-3 immünreaktivite değerlendirme.

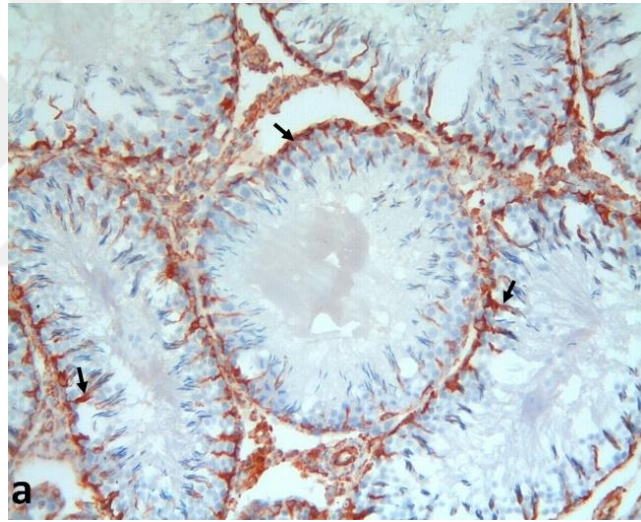
4.5.2. Vimentin İmmünreaktivitesi

Sertoli hücre belirteci olarak hücre iskeleti proteini olan vimentin kullanıldı (Şekil 4.28). Kontrol ve AST gruplarında (Şekil 4.29 ve 4.30) vimentin immünreaktivitesi, perinükleer sitoplazmik bölgede daha yoğun olmakla birlikte Sertoli hücre sitoplazmasında belirgin şekilde izlendi. İstatistiksel olarak bu gruplarda vimentin immünreaktivitesinin benzer olduğu bulundu Diğer yandan, CP grubunda Sertoli hücre sitoplazmasında şiddetli vimentin immünreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 4.31). CP grubunda izlenen bu immünreaktivite artışı, kontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). AST+CP grubunda (Şekil 4.32) vimentin immünreaktivitesinde CP grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı saptandı ($p<0.05$).



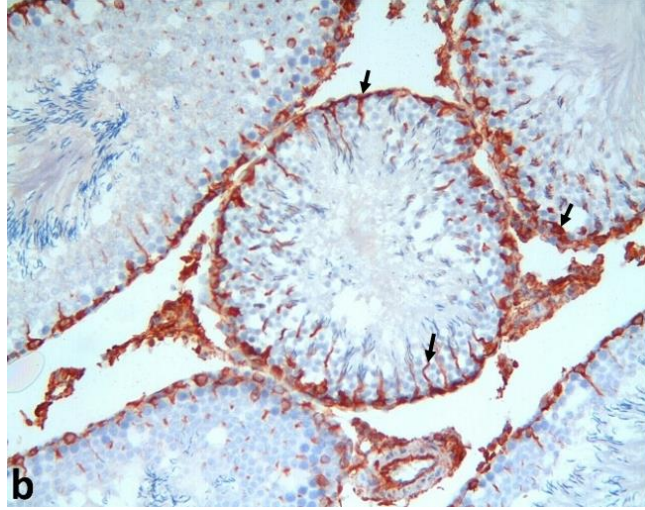
Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.28. Vimentin immünreaktivite değerlendirme.



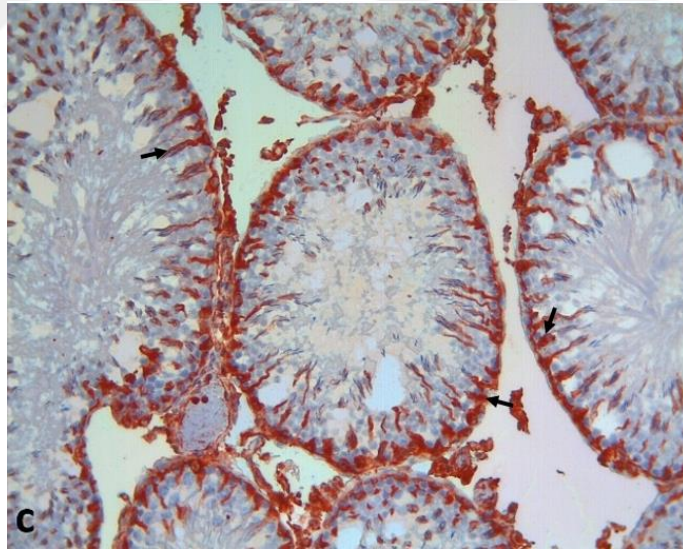
Kontrol grubu vimentin immünreaktivitesi Sertoli sitoplazmasında (oklar) belirgin şekilde izlenmekte (X200).

Şekil 4.29. Kontrol grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.



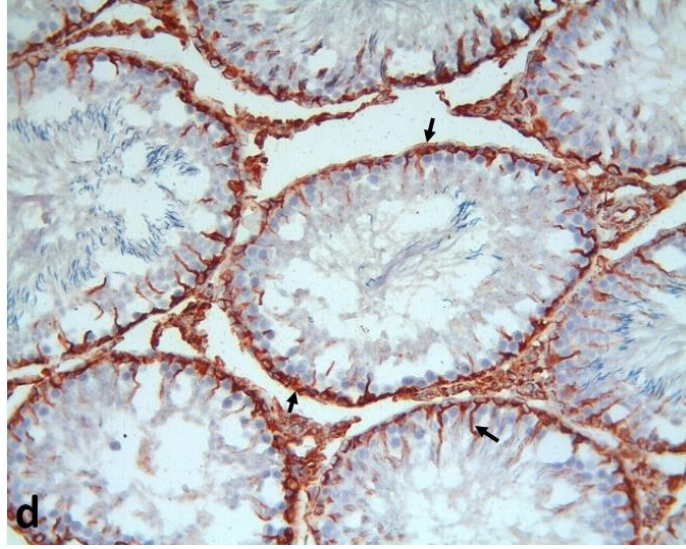
AST grubu kontrol grubu ile benzer şekilde vimentin immünreaktivitesi Sertoli sitoplazmasında belirgin şekilde izlenmekte (X200).

Şekil 4.30. AST grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.



CP grubunda kontrol ve AST gruplarına göre vimentin immünreaktivitesinde belirgin bir artış (oklar) izlenmekte (X200).

Şekil 4.31. CP grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.

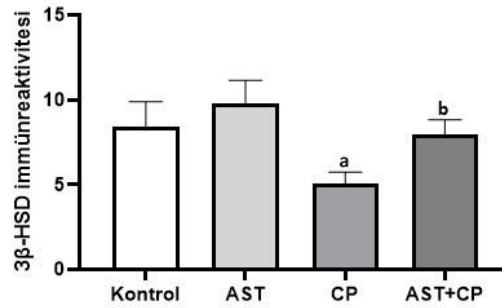


CP+AST grubu kontrol ve AST gruplarına benzer (oklar) immünreaktivite izlenmekte (X200).

Şekil 4.32. CP+AST grubu vimentin immünreaktivite değerlendirilme.

4.5.3. 3 β -HSD İmmünreaktivitesi

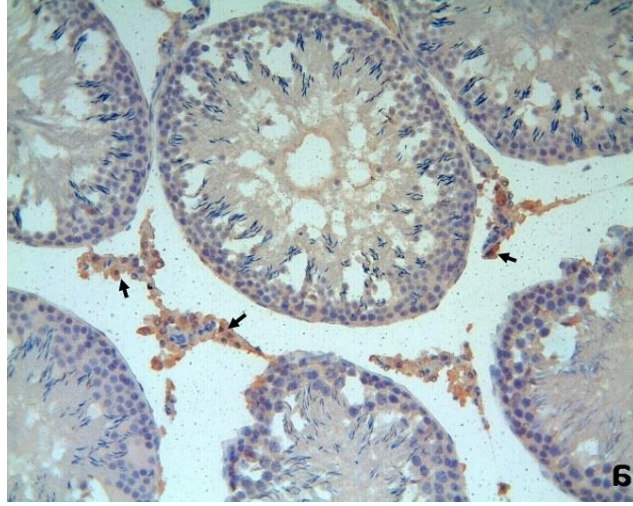
Leydig hücre belirteci olarak testosteron sentezinde anahtar rol oynayan membrana bağlı bir enzim olan 3 β -HSD kullanıldı. En yüksek immünreaktivite AST grubunda gözlemlendi (Şekil 4.33). Bununla birlikte istatistiksel olarak kontrol (Şekil 4.34) ve AST (Şekil 4.35) grupları benzer bulundu. Diğer yandan, 3 β -HSD immünreaktivitesinin CP grubunda (Şekil 4.36), kontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında belirgin olarak düşük olduğu saptandı. AST+CP grubunda ise immünreaktivite şiddetinin CP grubuna göre yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu bulundu (Şekil 4.37).



Veriler AO $\pm$ SS olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),

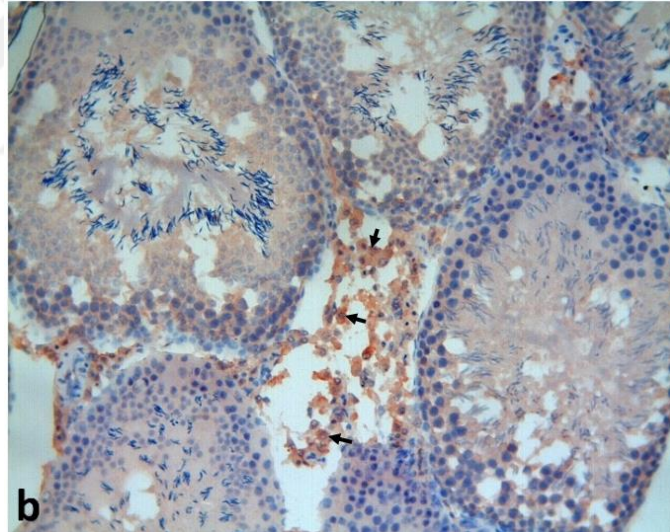
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.33. 3 β -HSD immünreaktivite değerlendirme.



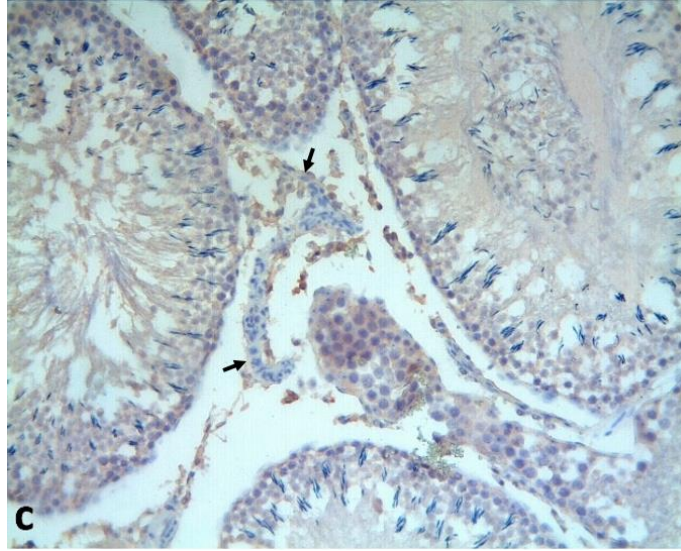
Kontrol grubu 3 β -HSD immünreaktivitesi gösteren (oklar) Leydig hücreleri izlenmekte (X200).

Şekil 4.34. Kontrol grubu 3 β -HSD immünreaktivite değerlendirilme.



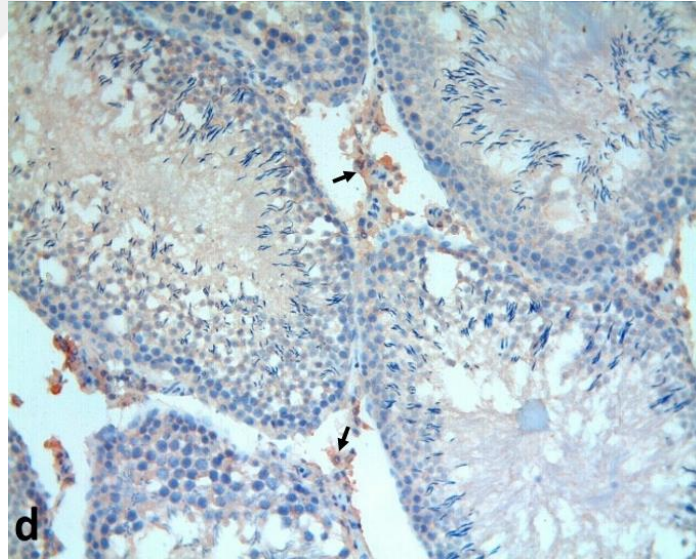
AST grubu kontrol grubu ile benzer (oklar)  ekilde 3 β -HSD immünreaktivitesi gösteren Leydig hücreleri izlenmekte (X200).

Şekil 4.35. AST grubu 3 β -HSD immünreaktivite değerlendirilme.



CP grubu Leydig hücre immünreaktivitesinde belirgin şekilde azalma (oklar) izlenmekte (X200).

Şekil 4.36. CP grubu 3β-HSD immünreaktivite değerlendirilme.



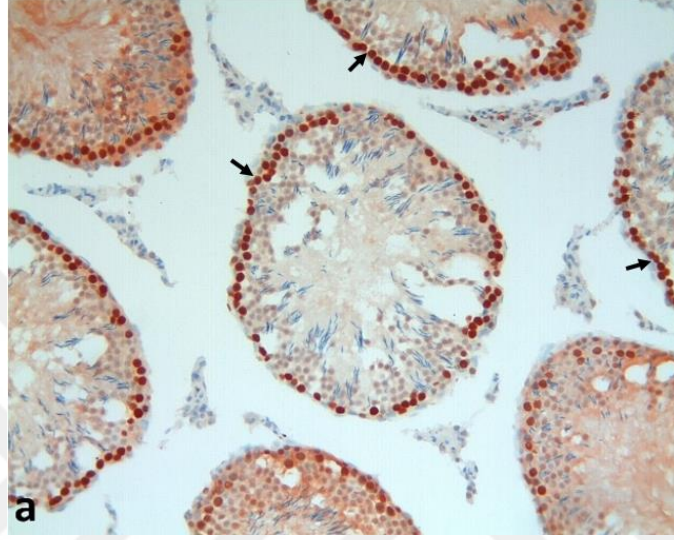
AST+CP grubu CP grubuna göre Leydig hücre immünreaktivitesinde belirgin bir artış (oklar) izlenmekte (X200).

Şekil 4.37. CP+AST grubu 3β-HSD immünreaktivite değerlendirilme.

4.5.4. PCNA İmmünreaktivitesi

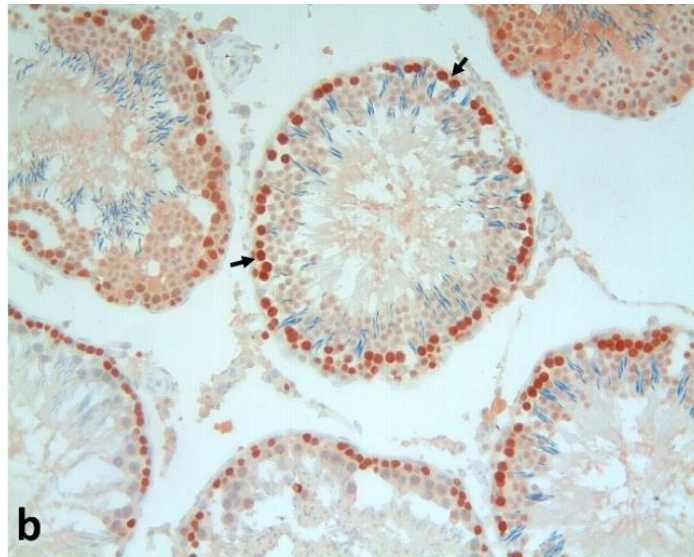
Proliferatif hücre nükleer antijeni olan PCNA, hücre bölünmesinin bir belirteçidir. PCNA immünreaktif hücre yoğunluğunun kontrol (Şekil 4.38) ve AST (Şekil 4.39)

gruplarında benzer olduğu bulundu. CP grubunda (Şekil 4.40), immünreaktif hücre yoğunluğunda kontrol ve AST gruplarına göre belirgin bir azalma tespit edildi. AST+CP grubunda (Şekil 4.41), CP grubu ile karşılaştırıldığında, PCNA immünreaktif hücre yoğunluğunda anlamlı bir artışın olduğu saptandı ($p<0.05$). CP+AST grubunda nükleer boyanma, kontrol ve AST gruplarına benzer oranda artış gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.42).



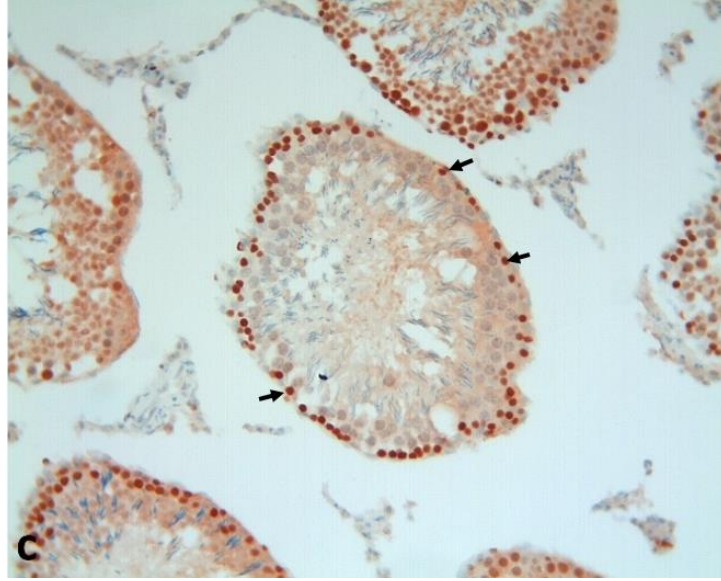
Kontrol grubu nükleer boyanma yoğun (oklar) şekilde izlenmekte (X200).

Şekil 4.38. Kontrol grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.



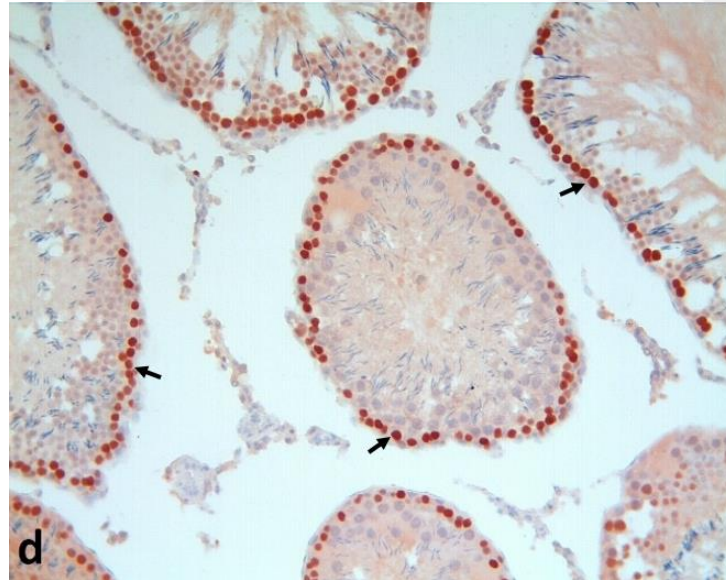
AST grubunda kontrol grubu ile benzer yoğunlukta (oklar) nükleer boyanma izlenmekte (X200).

Şekil 4.39. AST grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.



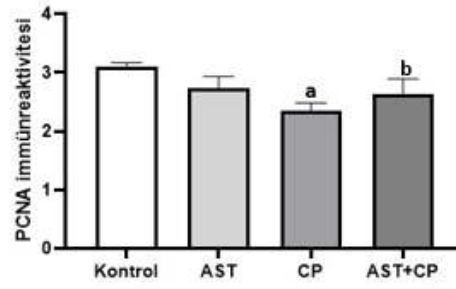
CP grubu kontrol AST gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (oklar) izlendi (X200).

Şekil 4.40. CP grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.



CP+AST grubu CP grubuna göre nükleer boyanmada anlamlı bir artış (oklar) izlendi (X200).

Şekil 4.41. CP+AST grubu PCNA immünreaktivite değerlendirme.

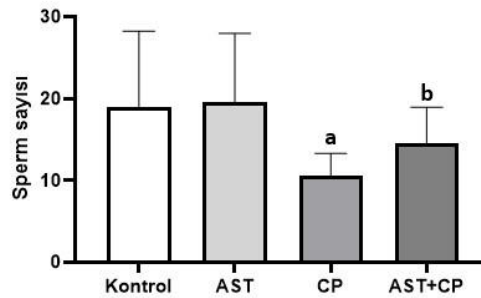


Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.42. PCNA değerlendirme.

4.6. Sperm Sayısı

Sperm sayısı kontrol ve AST gruplarında benzer bulunurken CP grubunda sperm sayısının kontrol ve AST gruplarına göre belirgin şekilde azaldığı saptandı (Şekil 4.43). AST+CP grubunda sperm sayısının CP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p < 0.05$).



Veriler $AO \pm SS$ olarak ifade edildi. ^aKontrol ve AST grupları ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$),
^bCP grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

Şekil 4.43. Sperm sayı değerlendirme.

5. TARTIŞMA

Kanser, dünyada ölümlle sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. Doku veya organlarda hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşur. Hücrelerin kanserleşmesine genetik yatkınlık, biyolojik kanserojenler, kimyasal ve fiziksel kanserojen maddelere maruziyet neden olabilmektedir. Evresi ve türüne bağlı olarak kanser, radyasyon, kemoterapi gibi geleneksel tedaviler veya gen, hormon ve immüno terapi gibi yeni tedavi yöntemleriyle tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Kemoterapi, bir veya daha fazla ilacın kombine olarak kullanılmasıdır ve yaygın bir tedavi yöntemidir (66).

Sisplatin, platin ilaç grubuna ait ve baş-boyun, meme, mesane, akciğer ve over kanserlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Dünyadaki kanser hastalarının yaklaşık %50'si sisplatin ile tedavi edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar sisplatinin hedefe özgü olmayıp diğer dokulara da zarar vermesi birçok yan etkiye neden olmaktadır (66). Nefrotoksisite, nörotoksisite, hepatoksisite ve gastrotoksisite gibi ciddi yan etkileri vardır. Testis üzerindeki yan etkileri ise testis toksisitesi, azospermi, testosteron seviyelerinde düşüş, Leydig hücre disfonksiyonu ve sperm DNA hasarıdır (37, 67). Mevcut çalışma, sisplatinin yan etkisi olan testis hasarını azaltmak ve ortadan kaldırmak için karotenoid bir bileşik olan astaksantin koruyucu ve tedavi edici etkisini biyokimyasal ve histolojik olarak ortaya koymuştur.

Astaksantin, yengeç, karides gibi deniz canlılarında doğal olarak bulunan ve inflamasyona neden olan sinyal yollarını inhibe eden güçlü bir antioksidan bileşiktir. Yağda kolay bir şekilde çözünmektedir. Ticari olarak *Haematococcus pluvialis* mikroalginden elde edilmektedir. Oksidatif stres durumunda birikmiş ROS türlerini parçalamada, inflamatuvar sitokinleri düzenlemede ve hücrel hasarı engellemede aktif rol almaktadır (68).

Sisplatin kaynaklı toksisitede yer alan en önemli mekanizmalardan biri oksidatif strestir. Sisplatin hücre içi ROS birikimini artırarak oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres, oksidanların üretimi ile antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıdır. Bu dengesizlik, hücrenin hasarına ve ölümüne yol açan metabolik değişiklikleri indükler. Çalışmamızda CP'nin oksidatif stres üzerine etkileri MDA ve tGSH seviyeleri ölçülerek değerlendirildi. Lipid peroksidasyonunun en önemli son

ürünlerinden olan MDA, oksidatif stresin önemli bir göstergesidir. GSH ise oksidatif strese karşı hücrenin koruyucu mekanizmasının önemli bir bileşenidir.

Çalışmamızda, kontrol ve AST gruplarıyla karşılaştırıldığında, CP grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte MDA seviyesinin yüksek, tGSH seviyesinin ise belirgin şekilde düşük olduğu saptandı. Bu sonuçlar CP'nin testis dokusunda oksidan/antioksidan dengesini bozarak oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak çok sayıdaki çalışma CP'nin testis dokusunda oksidatif stres oluşturduğunu bildirmiştir (69, 70). Oksidatif stres hücrel hasara ve apoptoza yol açan metabolik değişiklikleri uyarır. Nitekim çalışmamızda da CP grubunda kaspaz-3 immünreaktivitesi, kontrol ve AST gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. CP grubuna ait testiküler dokuda, hem interstisyel alanda hem de seminifer epitelde yaygın kaspaz-3 pozitif hücrelere rastlandı. Kaspaz-3, önemli apoptotik enzimlerden biri olup apoptozun geri döndürülemez noktasının bir belirtecidir. Önceki çalışmalar da CP uygulamasının aşırı kaspaz-3 ekspresyonuna neden olduğunu göstermiştir (71, 72). CP grubunda bu bulgularla uyumlu olarak, kontrol ve AST gruplarına kıyasla seminifer tübül lümenlerinde sıklıkla olgunlaşmamış germ hücrelerine rastlandı. Ayrıca CP grubunun seminifer epitel kalınlığının da belirgin olarak düşük olduğu tespit edildi. Tian ve ark. da CP'nin seminifer epitelde düzensizliğe ve hasara yol açtığını, gelişimini tamamlamamış spermatogenik hücrelerin seminifer tübül lümenine dökülmesine ve seminifer epitel kalınlığında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (73).

Hücreler toksik oksidatif ajanlara maruz kaldıklarında, hücre içi antioksidan savunma yollarını aktive ederek kendilerini korumaya çalışır. Bu hücrel savunma yollarından biri Nrf2/HO-1 sinyal yolağıdır. Nrf2, oksidatif strese karşı hücrel yanıtların transkripsiyonel ana düzenleyicisidir. Normal fizyolojik koşullar altında Nrf2, kompleksler oluşturmak için Kelch benzeri epiklorohidrin ile ilişkili proteinlere (Keap1) bağlanır. Bu kompleksler sitoplazmada aktin tarafından sabitlenir ve düşük aktivitedir. Sitozolde Nrf2'ye bağlanan Keap1, bir substrat adaptör proteini olup Cul3'e bağımlı E3 ubiquitin ligazı tarafından Nrf2'nin poliubikitinlenmesini sağlar. Keap1, ubiquitin aracılığıyla bir süreçte proteozom yoluyla sitoplazmik Nrf2'nin sürekli yıkılarak düşük seviyelerde olmasını sağlar. Nrf2 yıkımı, stresli olmayan koşullar altında düşük bazal ekspresyona izin verir. Oksidatif stres veya diğer patolojik uyarılar altında, Keap1'in sistein kalıntısı, Nrf2'nin fosforilasyonunu indükler. Bu durum Nrf2 birikimi ve Nrf2'nin kompleksten salınarak nükleusa geçişiyle sonuçlanır. Nrf2 nükleusa taşındıktan sonra

sMaf proteinleri ile heterodimerize olur ve antioksidan reaksiyon elemanlarına (ARE'ye) bağlanır. Bu bağlanma, sitoprotektif ve detoksifiye edici genlerin transkripsiyonunu indükleyerek primer olarak HO-1 olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırır. HO-1, bir prooksidan olan hem proteininin bilirubine, karbon monoksit ve demire parçalanmasından sorumlu olan bir enzimdir. Primer fonksiyonunun yanı sıra HO-1 güçlü sitoprotektif, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilere de sahiptir (74). Çalışmamızda CP uygulanan grupta hem seminifer epitel hem de interstisyel alanda Nrf2 ve HO-1 immünreaktivitesinin kontrol ve AST gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olduğu saptandı. Bu bulgular, literatür bilgileriyle uyumlu olarak, CP uygulamasıyla artmış oksidatif strese karşı testiküler doku hücrelerinde hücresel savunma yollarının belirgin şekilde aktive olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın bu sonuçlarıyla uyumlu olarak, Abdel-Wahab ve arkadaşları da tek doz 7 mg/kg CP uyguladıkları çalışmada, CP'nin testiküler dokuda Nrf2 ve HO-1'in mRNA ekspresyon seviyelerini kontrol gruplarına göre önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir (75). Benzer şekilde, Yu ve arkadaşları CP ile indüklenen nefrotoksisite modelinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, CP grubu böbrek dokularında Nrf2 ve HO-1 ekspresyonunda artış olduğunu kaydetmişlerdir (76). Bu sonuçların aksine CP'nin çeşitli dokularda Nrf2 ve HO-1 ekspresyonlarını düşürdüğünü bildiren çok sayıda çalışmada da mevcuttur (77, 78). CP'nin Nrf2 ve HO-1 seviyelerindeki bu farklılıklar uygulanan CP dozu ve deney süresi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Mevcut çalışmada, AST, CP'nin neden olduğu artmış MDA seviyesini düşürürken, azalmış tGSH seviyesini yükseltmiştir. Yılmaz N ve arkadaşları testis torsiyonu/detorsiyonu oluşturulan ratlarda AST'nin MDA ve TOS seviyelerini düşürerek; tGSH ve TAS seviyelerini ise yükselterek testis dokusunda iskemik hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada AST'nin spermatogenik hücrelerde kaspaz-3 immünreaktivitesini azalttığı bildirilmiştir (79). İskemi-reperfüzyon modelinin oluşturulduğu bir başka çalışmada AST uygulanan grupta MDA seviyesinin düştüğü, antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı, kaspaz-3 pozitif hücre sayısının azaldığı kaydedilmiştir (80). Çalışmamızda da AST+CP grubunda, CP grubu ile karşılaştırıldığında, kaspaz-3 immünreaktif hücre yoğunluğunun azaldığı tespit edildi. Ek olarak, AST+CP grubunda seminifer tübül dejenerasyonun hafiflediği, seminifer epitel kalınlığının arttığı izlendi. Literatür bilgileriyle uyumlu olarak mevcut çalışmadan elde edilen bu bulgular, güçlü bir antioksidan ve ROS temizleyicisi olan AST'nin, CP ile indüklenen testiküler toksisiteye karşı koruyucu etkisini göstermektedir.

Çalışmamızda AST+CP grubunda, Nrf2 ve HO-1 immünreaktivitesinin belirgin şekilde azaldığı dikkat çekti. Bu bulgularımız önceki çalışmaların verileriyle çelişmektedir. Farklı deneysel modellerle indüklenen organ toksisite çalışmalarında, AST'nin, Nrf2/HO-1 genlerinin ekspresyonunu artırdığı ve böylece oksidatif stres düzeyini azaltarak doku hasarını hafiflettiği bildirilmiştir (81, 82). Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar AST'nin, CP'nin olası etkilerini önemli ölçüde bertaraf ederek hücre homeostazını koruduğunu düşündürmektedir. AST, kendine özgü kimyasal yapısı, özellikle 13 konjuge çift bağ içeren merkezi polien zinciri nedeniyle, singlet oksijeni nötralize ederek, serbest radikalleri temizleyerek ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu yoluyla membran yapısını koruyarak oksidatif hasara karşı doğal bir ajan olarak hareket edebilir. Ek olarak, AST SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi oksidatif strese yanıt veren enzimlerin ekspresyonunu artırarak ROS oluşumunu azaltır (83).

Çalışmamızda CP grubunda çok sayıda tübül lümeninde gelişimini tamamlamamış spermatogenik hücre grupları izlendi. Bu grupta seminifer epitel kalınlığının da belirgin olarak azaldığı tespit edildi. CP grubundaki bu değişiklikler, yukarıda belirtildiği gibi artmış oksidatif stres nedeniyle spermatogenik hücrelerin apoptozuyla ilişkilendirilebileceği gibi bu hücreleri destekleyen Sertoli hücre disfonksiyonunu da düşündürmektedir. Seminifer epitelde bulunan somatik bir hücre türü olan Sertoli hücreleri, spermatogenik hücrelere fiziksel ve metabolik olarak destek sağlamak, sperm salınımına yardımcı olmak, fagositoz yapmak ve immünolojik bir bariyer görevi görmek de dahil olmak üzere intratestiküler ortamın korunmasında rol oynar. Sertoli hücrelerinin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirmesinde hücre iskeletinin önemli bir rolü vardır (84). Hücre iskeleti proteinleri, tüm hücrelerin sitoplazmasında birbirine bağlı protein filamentlerinden oluşan karmaşık dinamik ağlar oluşturarak hücrelerin yapısal ve işlevsel bütünlüğüne katkıda bulunur (85). Sertoli hücrelerinin hücre iskeleti sistemindeki bozulmaların, bozulmuş spermatogenez ve seminifer tübül dejenerasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (86).

Hücre iskeleti sisteminin önemli bir bileşeni olan vimentin, Sertoli hücrelerini tanımlamak için bir belirteç olarak kullanılır. Vimentin hücreye mekanik destek sağlar, hücre şeklini ve nükleer pozisyonu korur, spermatogenik hücrelerle Sertoli hücre bağlantısında önemli bir rol oynar (87, 88). Birçok çalışma testiküler toksisite durumlarında vimentin ekspresyon seviyesinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir (89-91). Ancak çalışmamızda, önceki çalışmaların sonuçlarının aksine, CP uygulamasının vimentin immünreaktivitesini, kontrol ve AST gruplarına göre önemli düzeyde artırdığı

tespit edildi. Saito ve ark. çalışmalarında E vitamini eksikliğinin Sertoli hücrelerinde vimentin ekspresyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, artan vimentin ekspresyonunun, yaşlanma veya kimyasal maddeler nedeniyle çevrenin bozulduğu durumlarda, Sertoli hücrelerinin germ hücreleriyle etkileşimlerini yeniden kurmak amacıyla gösterdikleri hücrel bir tepki olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Mevcut çalışmada, en dikkat çekici bulgu olarak seminifer tübül lümenlerinde gelişimini tamamlamamış spermatogenik hücrelerin varlığı, Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler arasındaki etkileşimin bozulmasıyla ilişkilendirilebilir. Araştırmacılar ayrıca, vimentin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin, morfolojik olarak izlenmesi zor olan spermatogenik disfonksiyonun erken bir işareti de olabileceğini kaydetmişlerdir (84).

Proteomik çalışmalar, vimentinin prostat ve meme kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde metastazla ilişkili bir faktör olduğunu ve metastaz sırasında hücre şeklini ve hareketliliğini değiştiren epitel-mezenkimal geçiş sürecinde vimentin miktarının arttığını göstermiştir (92). Bu nedenle, vimentinin artmış seviyeleri, bozulmuş homeostatik işlevlerin işareti olabilir. Mevcut çalışmada AST uygulaması, CP'nin Sertoli hücrelerinde vimentin ekspresyonu üzerindeki etkilerini ve testis dokusunun histopatolojik değişikliklerini hafifletti. Önceki çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı olarak AST'nin, CP tarafından indüklenen oksidatif stresi önleyerek hücre homeostazını koruduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda CP grubunda seminifer epitelde izlenen histopatolojik değişiklikler için bir başka mekanizma testosteron seviyesindeki anormal azalma olabilir. Testosteron, spermatogenez ve erkek fertilitésinin sürdürülmesi için gerekli bir hormon olup çeşitli biyosentetik enzimlerin kaynağı olan Leydig hücrelerinde sentezlenir. Kong ve ark. (93), testosteron sentezinin bir dizi enzimin dahil olduğu karmaşık bir süreç olduğunu bildirmiştir. P450 yan zincir kesme enzimi (CYP11A1), testosteron sentezinin ilk adım enzimidir ve testosteronun hammaddesi olan kolesterolün pregnenolona dönüşümünü gerçekleştirir. 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD3B1) daha sonra pregnenolonu progesterona dönüştürür ve progesteron, 17 α -hidroksilaz (CYP17A1) yoluyla androstendiona dönüştürülür. 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD17B), androstendionun testosterona dönüştürülmesinde son adım enzimidir (73).

Oksidatif stres, Leydig hücrelerinde testosteron üretimini azaltan başlıca faktörlerden biridir. Birçok çalışma, ROS'un STAR protein ekspresyonunu ve 3 β -HSD ve CYP11A1 aktivitesini azaltarak testosteron üretimini değiştirdiğini göstermektedir. Mitokondriler, steroid hormon biyosentezi için kritik bölge olduğundan, ROS'un neden

olduğu mitokondriyal membran potansiyelinin dağılması, testis testosteronunun aşağı regülasyonuna da neden olur (94). Önceki çalışmalar, CP'nin testis Leydig hücrelerinde ROS seviyelerini artırırken testosteron sentezinde yer alan enzimlerin mRNA ekspresyonunu inhibe edebileceğini ve bunun da nihayetinde Leydig hücrelerinde testosteron sentez bozukluklarına yol açabileceğini göstermiştir (73, 95). Çalışmamızda, CP Leydig hücrelerinde 3 β -HSD immünreaktivitesinde kontrol ve AST gruplarına göre belirgin düzeyde bir azalmaya neden oldu. Ek olarak, mevcut çalışmada CP grubunda, interstisyel alanda kaspaz-3 immünreaktif hücre yoğunluğunun da kontrol ve AST gruplarına göre yüksek olduğu izlendi. Dolayısıyla CP, Leydig hücrelerinin disfonksiyonuna ve testiküler steroid sentezi bozukluğuna neden olarak ve/veya Leydig hücre apoptozunu indükleyerek testosteron düzeylerini azaltır ve bu durum da bozulmuş spermatogeneze yol açabilir. Bozulmuş spermatogenez ise spermatogenik hücrelerin gelişimini tamamlayamayarak epitelden dökülmesine ve böylece seminifer epitelin incelmesine neden olabilir.

Wang J-Y ve ark. fare Leydig hücrelerinde hidrojen peroksit ile indükledikleri oksidatif strese karşı AST'nin etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, Leydig hücrelerinde oksidatif stresin StAR proteini, 3 β -HSD ve testosteron ekspresyon seviyelerini düşürdüğünü ancak AST'nin oksidatif stresi hafifleterek bu proteinlerin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir (94). Mevcut çalışmada da AST+CP grubunda, AST'nin testiküler dokuda oksidatif stresi önlediği, 3 β -HSD ve testosteron ekspresyon seviyelerini belirgin şekilde artırdığı tespit edildi.

Çalışmamızda CP'nin neden olduğu azalmış germ hücre proliferasyonu üzerine AST'nin etkilerine de bakıldı. Hücre döngüsünün S fazında maksimum ekspresyon seviyesine ulaşan PCNA, DNA polimeraz için yardımcı bir proteindir. Bu nedenle, PCNA hücrelerin proliferatif aktivitesini tespit etmek için güvenilir bir belirteç olarak kullanılır (96). Önceki çalışmalarda, CP tedavisinin germ hücrelerinde PCNA ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (97, 98). Çalışmamızda da CP uygulanan sıçanlarda PCNA pozitif hücre yoğunluğu anlamlı şekilde azaldı. CP uygulamasının seminifer epitelde neden olduğu kaspaz-3 immünreaktivitesindeki artış ve PCNA pozitif hücre yoğunluğundaki azalma daha fazla spermatogenik hücrenin hasarlandığını ve daha az hücrenin hayatta kalabildiğini göstermektedir. AST uygulaması, PCNA pozitif hücre yoğunluğunda önemli ölçüde bir artış sağlayarak CP'nin germ hücre proliferasyonu üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletti. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, AST'nin muhtemelen oksidatif stresi azaltarak germ hücre sağ kalımını ve çoğalmasını artırdığını ortaya koymaktadır. Ulucan

A. ve ark. formaldehit kaynaklı spermatogenik hücre proliferasyonunda azalma ve apoptozundaki artışa karşı AST'nin koruyucu etkilerini rapor etmişlerdir (99). Kim J-H ve ark. da AST'nin sinir progenitör hücrelerinin proliferasyonu ve kök hücre potansiyelleri üzerine etkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, fosfatidilinositol 3-kinaz ve mitojenle aktive edilen protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz sinyal yollarının aktivasyonu ile AST'nin bu hücrelerin proliferasyonunu etkili bir şekilde indüklediğini ve kök hücre potansiyellerini artırabileceğini ortaya koymuşlardır (100).

Mevcut çalışmada CP uygulaması nedeniyle ortaya çıkan tüm bulguların bir sonucu olarak, CP sperm sayısını önemli ölçüde düşürdü. Önceki çalışmalarda da sperm sayısının CP uygulamasıyla azaldığı rapor edilmiştir (101, 103). Normal testis fonksiyonu sırasında düşük seviyelerde üretilen ROS kapasitasyon, hiperaktivasyon ve sperm-oosit füzyonu dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Konsantrasyonu ve lokalizasyonuna bağlı olarak ROS, hücre sağkalımını veya apoptotik yolları aktive edebilir (104, 105). Sperm plazma zarı yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden ve sperm sitoplazması düşük düzeyde enzimatik/enzimatik olmayan antioksidanlar içerdiğinden, yüksek düzeyde ROS sperm fonksiyonlarına zararlı olabilir (106). Buna karşın AST uygulaması CP'nin sperm yoğunluğu üzerindeki etkilerini belirgin şekilde hafifletti. Lu ve ark, antioksidan özelliklerine dayanarak AST'nin hücre zarı bütünlüğünü koruyarak ve ROS seviyelerini azaltarak oksidatif hasardan kaynaklanan sperm ölümünü azalttığını bildirdi (107). Heidari Khoei H ve ark. da metotreksat ile indüklenen testiküler toksisitede AST uygulanması, sperm sayısında, hareketliliğinde, canlılığında ve normal morfolojisinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağladığını bildirmişlerdir (108).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, sisplatin ile indüklenen testis toksisitesinde astaksantin histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal etkinliği tespit edildi.

Elde edilen histopatolojik sonuçlara göre, kontrol grubu ile AST uygulanan gruplar karşılaştırıldığında bazalde spermatogonyum ve Sertoli hücreleri, lümene uzanan spematogonik seri hücreler normal histolojik görünümü sergilerken sadece CP uygulanan grupta bazaldeki hücrelerin yapısal olarak bozulduğu, seri hücrelerin lümene döküldüğü gözlemlendi. CP grubu ile CP uygulanıp AST ile tedavi edilen grup karşılaştırıldığında hücrelerin normal histolojik görünümünü yansıtarak lümene dökülen seri hücrelerin azaldığı gözlemlendi.

İmmünohistokimyasal bulgulara göre, Nrf2/HO-1 sinyal yolağı kontrol ve AST gruplarında hem seminifer epitelde hem de interstiyel alanda hafif düzeyde immünreaktivite gösterirken CP grubunda bu immünreaktivitenin artması oksidatif strese karşı hücrelerin antioksidan yollarını aktive etmesi sonucunu çıkardı. Benzer şekilde kaspaz-3 immünreaktivitesi de CP grubunda artarak apoptoz yolağını aktive etmesini kanıtlayan hem seminifer tübül hücrelerinde hem de interstiyel alanda yoğun boyanma gözlemlendi. CP uygulanıp AST ile tedavi edilen grup Nrf2/HO-1 ve kaspaz-3 immünreaktivitesinde zayıf boyanma ve anlamlı bir azalma gözlemlendi. İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücre belirteci olan 3β -HSD, kontrol ve AST gruplarında yoğun immünreaktivite gösterirken CP grubunda CP'nin neden olduğu hasarla birlikte zayıf immünreaktivite gösterdi. CP+AST grubunda ise anlamlı bir artış ile birlikte kontrol ve AST uygulanan gruplara benzer reaktivite gösterdi. Hücre iskeleti proteini olan ve Sertoli hücre belirteci olarak kullanılan vimentin, kontrol ve AST gruplarında benzer immünreaktivite gösterirken CP grubunda anlamlı bir azalma, CP+AST grubunda ise anlamlı bir artış gözlemlendi. Hücre proliferasyonunu belirlemede kullanılan PCNA, kontrol ve AST gruplarında yüksek düzeyde reaktivite gösterirken CP grubu spermatogonyumlarında anlamlı bir düşüş ve zayıf boyanma gözlemlendi. CP uygulanıp AST ile tedavi edilen grupta ise CP grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlarda AST'nin güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğunu gözler önüne sermektedir.

Biyokimyasal analizlere göre testosteron hormonu ve oksidatif stres belirteci olan MDA, kontrol ve AST gruplarında benzer seyredirken tGSH seviyeleri, AST grubunda kontrol grubuna göre yüksek seviyede seyretmektedir. CP uygulanan grupta ise MDA

seviyesinde anlamlı bir artış gözlenirken tGSH ve testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. CP+AST grubu MDA seviyesinde anlamlı bir azalma, tGSH ve testosteron seviyesinde ise anlamlı bir artış gözlemlendi.

Bu sonuçlar astaksantin ve sispaltin gibi sağlıklı hücreleri de etkileyen ajanlara karşı antioksidan ve antiinflatuar etki göstererek koruma ve iyileştirme sağladığını gözler önüne sermektedir. Klinik çalışmalarla desteklenerek sispaltin ile kombine şekilde kullanılabileceği ümit edilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Gyamfi J, Kim J, Choi J. Cancer as a metabolic disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(3):1155.
2. Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J. Cancer Ther.* 2009;1(2):4.
3. Zaimy M, Saffarzadeh N, Mohammadi A, Pourghadamyari H, Izadi P, Sarli A, et al. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 2017;24(6):233-43.
4. Arafa MH, Atteia HH. Protective role of epigallocatechin gallate in a rat model of cisplatin-induced cerebral inflammation and oxidative damage: impact of modulating NF- κ B and Nrf2. *Neurotoxicity research.* 2020;37(2):380-96.
5. Hao Y, Miao J, Liu W, Peng L, Chen Y, Zhong Q. Formononetin protects against cisplatin-induced acute kidney injury through activation of the PPAR α /Nrf2/HO-1/NQO1 pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2021;47(2):511-22.
6. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;740:364-78.
7. Negrette-Guzman M. Combinations of the antioxidants sulforaphane or curcumin and the conventional antineoplastics cisplatin or doxorubicin as prospects for anticancer chemotherapy. *Eur. J. Pharmacol.* 2019;859:172513.
8. Si P, Zhu C. Biological and neurological activities of astaxanthin. *Mol. Med Rep.* 2022;26(4):1-12.
9. Davinelli S, Saso L, D'Angeli F, Calabrese V, Intrieri M, Scapagnini G. Astaxanthin as a modulator of Nrf2, NF- κ B, and their crosstalk: molecular mechanisms and possible clinical applications. *Molecules.* 2022;27(2):502.
10. Vardi N, Yorukoglu K. Erkek Genital Sistemi Histoloji ve Patolojisi. *Histoloji ve Patoloji*, 2. Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri, 2023:519-43.
11. Sadler TW. Second week of development: Bilaminar germ disc. *Langman's medical embryology*. 14th ed. London, Wolter Kluwer, 2022:51-87.
12. Rouiller-Fabre V, Habert R, Livera G, editors. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. *Annales d'endocrinologie.* 2014:4.
13. Chaffey N, Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. Oxford University Press. 2003.

14. Pawlina W, Ross MH. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology, 6thed. Lippincott Williams & Wilkins, 2010:784-816.
15. Perić MH, Takahashi M, Ježek D, Cunha GR. Early development of the human embryonic testis. *Differentiation*. 2023;129:4-16.
16. Hutson JM, Li R, Southwell BR, Newgreen D, Cousinery M. Regulation of testicular descent. *Pediatr Surg. Int.* 2015;31(4):317-25.
17. Logsdon NT, Sampaio FJ, Favorito LA. The role of intra-abdominal pressure in human testicular migration. *Int Braz J Urol.* 2020;47(1):36-44.
18. Favorito LA, Costa SF, Julio HR, Sampaio FJ. The importance of the gubernaculum in testicular migration during the human fetal period. *Int Braz J Urol.* 2014;40(6):722-29.
19. Snell RS. Pelvis ve perine. İçinde: Yildirim M (Çeviren). *Topografik Klinik Anatomi*. 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık , 2015: 215-46.
20. Dalley II AF, Agur AM. Pelvis and perineum. *Moore's clinically oriented anatomy*, 1sted. New York, Wolters Kluwer Health, 2023: 614-98.
21. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas, 17th ed. New York, McGraw-Hill Education, 2024:356-98.
22. Miyaso H, Ogawa Y, Itoh M. Microenvironment for spermatogenesis and sperm maturation. *Histochem Cell Bio.* 2022;157(3):273-85.
23. Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of reproduction*. 2018;99(1):101-11.
24. Zhu Q, Li H, Wen Z, Wang Y, Li X, Huang T, et al. Perfluoroalkyl substances cause Leydig cell dysfunction as endocrine disruptors. *Chemosphere*. 2020;253:126764.
25. Bhattacharya I, Dey S. Emerging concepts on Leydig cell development in fetal and adult testis. *Front. Endocrinol.* 2023;13:9.
26. Zomer HD, Reddi PP. Characterization of rodent Sertoli cell primary cultures. *Mol. Reprod. Dev.* 2020;87(8):857-70.
27. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016.
28. Mruk DD, Cheng CY. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocrine reviews*. 2015;36(5):564-91.
29. Trost N, Mbengue N, Kaessmann H. The molecular evolution of mammalian spermatogenesis. *Cells Dev.* 2023;175:203865.

30. Cannarella R, Condorelli RA, Mongioi LM, La Vignera S, Calogero AE. Molecular biology of spermatogenesis: novel targets of apparently idiopathic male infertility. *Int. J. Mol. Med. Sci.* 2020;21(5):1728.
31. Staub C, Johnson L. Spermatogenesis in the bull. *Animal.* 2018;12(s1):s27-s35.
32. Varuzhanyan G, Chan DC. Mitochondrial dynamics during spermatogenesis. *J Cell Sci.* 2020;133(14):jcs235937.
33. Zakrzewski P, Lenartowska M, Buss F. Diverse functions of myosin VI in spermiogenesis. *Histochem Cell Biol.* 2021;155(3):323-40.
34. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod.* 2017;96(1):2-12.
35. Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(8):524-38.
36. Wu M, Zhang Z, Mo F, Shi X, Sun D, Zhao L, et al. Recent advances in electrochemical MOF-based aptasensors for cancer biomarker detection: A review. *Microchem J.* 2024;110924.
37. Eren H, Mercantepe T, Tumkaya L, Mercantepe F, Dil E, Horsanali MO, et al. Evaluation of the protective effects of amifostine and melatonin against cisplatin induced testis injury via oxidative stress and apoptosis in rats. *Exp. Mol. Pathol.* 2020;112:104324.
38. Khok Xw, Ng Whd, Lee Ay, Yoon Hj, Devi Mk, Johnston B, et al. Journey towards resiliency: A systematic review and meta-synthesis of cancer patients' experiences. *Eur. J Oncol Nurs.* 2024:102640.
39. Pourmadadi M, Eshaghi MM, Rahmani E, Ajalli N, Bakhshi S, Mirkhaef H, et al. Cisplatin-loaded nanoformulations for cancer therapy: A comprehensive review. *J. Drug Deliv Sci Technol.* 2022;77:103928.
40. Patel S, Sathyanathan V, Salaman SD. Molecular Mechanisms Underlying Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and the Potential Ameliorative Effects of Essential Oils: A Comprehensive Review. *Tissue and Cell.* 2024:102377.
41. Sun W, John U. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC Monogr. Eval Carcinog Risks Hum.* 1997.
42. Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development: a review. *Drugs.* 1993;46(3):360-77.

43. Li K, Li J, Li Z, Men L, Zuo H, Gong X. Cisplatin-based combination therapies: their efficacy with a focus on ginsenosides co-administration. *Pharmacol Res.* 2024;107175.
44. Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-21.
45. Galasso C, Corinaldesi C, Sansone C. Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. *Antioxidants.* 2017;6(4):96.
46. Adiguzel E, Ulger TG. A marine-derived antioxidant astaxanthin as a potential neuroprotective and neurotherapeutic agent: A review of its efficacy on neurodegenerative conditions. *Eur. J. Pharmacol.* 2024;176706.
47. Grimmig B, Kim S-H, Nash K, Bickford PC, Douglas Shytle R. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. *Geroscience.* 2017;39:19-32.
48. Kınal ME, Tatlıpınar A, Uzun S, Keskin S, Tekdemir E, Özbeyli D, et al. Investigation of astaxanthin effect on cisplatin ototoxicity in rats by using otoacoustic emission, total antioxidant capacity, and histopathological methods. *Ear Nose Throat J.* 2021;100(4):198-205.
49. Baccouche B, Benlarbi M, Barber AJ, Ben Chaouacha-Chekir R. Short-term administration of astaxanthin attenuates retinal changes in diet-induced diabetic *Psammomys obesus*. *Curr. Eye Res.* 2018;43(9):1177-89.
50. Yoshihisa Y, Rehman MU, Shimizu T. Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2014;23(3):178-83.
51. Ito N, Seki S, Ueda F. The protective role of astaxanthin for UV-induced skin deterioration in healthy people—A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients.* 2018;10(7):817.
52. Wu L, Hu Z, Song X-f, Liao Y-j, Xiahou J-h, Li Y, et al. Targeting Nrf2 signaling pathways in the role of bladder cancer: From signal network to targeted therapy. *Biomed Pharmacother.* 2024;176:116829.
53. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biophys Acta Mol. Cell Res.* 2018;1865(5):721-33.

54. Kryszczuk M, Kowalczyk O. Significance of NRF2 in physiological and pathological conditions an comprehensive review. *Arch Biochem Biophys.* 2022;730:109417.
55. Wu Q, Zhang X-S, Wang H-D, Zhang X, Yu Q, Li W, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Mar Drugs.* 2014;12(12):6125-41.
56. Muri J, Kopf M. Redox regulation of immunometabolism. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(6):363-81.
57. Wang H, Liu X, Long M, Huang Y, Zhang L, Zhang R, et al. NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. *Sci Transl Med.* 2016;8(334):334-51.
58. Ghilissi Z, Hakim A, Sila A, Mnif H, Zeghal K, Rebai T, et al. Evaluation of efficacy of natural astaxanthin and vitamin E in prevention of colistin-induced nephrotoxicity in the rat model. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 2014;37(3):960-69.
59. Alex M, Sauganth Paul M, Abhilash M, Mathews VV, Anilkumar T, Nair RH. Astaxanthin modulates osteopontin and transforming growth factor β 1 expression levels in a rat model of nephrolithiasis: a comparison with citrate administration. *BJU Int.* 2014;114(3):458-66.
60. El-shafaei A, Abdelmaksoud R, Elshorbagy A, Zahran N, Elabd R. Protective effect of melatonin versus montelukast in cisplatin-induced seminiferous tubule damage in rats. *Andrologia.* 2018;50(9):e13077.
61. Yildiz A, Ozhan O, Ulu A, Dogan T, Bakar B, Ugur Y, et al. Effects of the apricot diets containing sulfur dioxide at different concentrations on rat testicles. *Environ Sci Pollut Res.* 2023;30(29):74301-13.
62. D'Andrea M, Lawrence D, Nagele R, Wang C, Damiano B. PCNA indexing as a preclinical immunohistochemical biomarker for testicular toxicity. *Biotech Histochem.* 2008;83(5):211-20.
63. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
64. Shigeru M, Hiroshi O, Nonbuko O, Takeuchi YK, Hisashi S. Lipoperoxide level of the retina of chick embryo exposed to high concentration of oxygen. *Clinica Chimica Acta.* 1977;80(2):355-60.

65. Arbo MD, Silva R, Barbosa DJ, da Silva DD, Rossato LG, de Lourdes Bastos M, et al. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicol Lett.* 2014;229(1):178-89.
66. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019;88:102925.
67. Fung C, Vaughn DJ. Complications associated with chemotherapy in testicular cancer management. *Nat. Rev. Urol.* 2011;8(4):213-22.
68. Medoro A, Intrieri M, Passarella D, Willcox DC, Davinelli S, Scapagnini G. Astaxanthin as a metabolic regulator of glucose and lipid homeostasis. *J J Funct Foods.* 2024;112:105937.
69. Abdel-Latif R, Fathy M, Anwar HA, Naseem M, Dandekar T, Othman EM. Cisplatin-Induced Reproductive Toxicity and Oxidative Stress: Ameliorative Effect of Kinetin. *Antioxidants.* 2022;11(5).
70. Eren H, Mercantepe T, Tumkaya L, Mercantepe F, Dil E, Horsanali MO, et al. Evaluation of the protective effects of amifostine and melatonin against cisplatin induced testis injury via oxidative stress and apoptosis in rats. *Exp Mol Pathol.* 2020;112:104324.
71. Cummings BS, Schnellmann RG. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(1):8-17.
72. Simsek N, Koc A, Karadeniz A, Yildirim ME, Celik HT, Sari E, et al. Ameliorative effect of selenium in cisplatin-induced testicular damage in rats. *Acta Histochem.* 2016;118(3):263-70.
73. Tian M, Liu F, Liu H, Zhang Q, Li L, Hou X, et al. Grape seed procyanidins extract attenuates Cisplatin-induced oxidative stress and testosterone synthase inhibition in rat testes. *Syst Biol Reprod Med.* 2018;64(4):246-59.
74. Soo E, Welch A, Marsh C, McKay DB. Molecular strategies used by hibernators: Potential therapeutic directions for ischemia reperfusion injury and preservation of human donor organs. *Transplant Rev. (Orlando).* 2020;34(1):100512.
75. Abdel-Wahab BA, Alkahtani SA, Elagab EAM. Tadalafil alleviates cisplatin-induced reproductive toxicity through the activation of the Nrf2/HO-1 pathway and the inhibition of oxidative stress and apoptosis in male rats. *Reprod Toxicol.* 2020;96:165-74.

76. Yu C, Dong H, Wang Q, Bai J, Li YN, Zhao JJ, et al. Danshensu attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through activation of Nrf2 pathway and inhibition of NF- κ B. *Biomed Pharmacother.* 2021;142:111995.
77. Akhigbe RE, Adelowo OE, Ajani EO, Oyesetan RI, Oladapo DD, Akhigbe TM. Testicular toxicity in cisplatin-treated Wistar rats is mitigated by Daflon and associated with modulation of Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- κ B signaling. *J Trace Elem Med Biol.* 2024;85:127489.
78. Alanezi AA, Almuqati AF, Alfwuaires MA, Alasmari F, Namazi NI, Althunibat OY, et al. Taxifolin Prevents Cisplatin Nephrotoxicity by Modulating Nrf2/HO-1 Pathway and Mitigating Oxidative Stress and Inflammation in Mice. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(11).
79. Yilmaz N, Yildiz A, Tanbek K, Kisaoglu A, Yilmaz U, Kose E. Protective effect of astaxanthin on testis torsion/detorsion injury through modulation of autophagy. *Rev Int Androl.* 2024;22(1):29-37.
80. Bašković M, Krsnik D, Himmelreich Perić M, Katušić Bojanac A, Sinčić N, Sonicki Z, et al. Astaxanthin Relieves Testicular Ischemia-Reperfusion Injury-Immunohistochemical and Biochemical Analyses. *J. Clin. Med.* 2022;11(5).
81. Lorestani F, Movahedian A, Mohammadalipour A, Hashemnia M, Aarabi MH. Astaxanthin prevents nephrotoxicity through Nrf2/HO-1 pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 2024;102(2):128-36.
82. Zhang Q, Luo C, Li Z, Huang W, Zheng S, Liu C, et al. Astaxanthin activates the Nrf2/Keap1/HO-1 pathway to inhibit oxidative stress and ferroptosis, reducing triphenyl phosphate (TPhP)-induced neurodevelopmental toxicity. *Ecotoxicol and Environ Saf.* 2024;271:115960.
83. Davinelli S, Saso L, D'Angeli F, Calabrese V, Intrieri M, Scapagnini G. Astaxanthin as a Modulator of Nrf2, NF- κ B, and Their Crosstalk: Molecular Mechanisms and Possible Clinical Applications. *Molecules.* 2022;27(2).
84. Saito H, Yokota S, Kitajima S. Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023;125(5):152046.
85. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Sci (NY).* 1998;279(5350):514-9.

86. Yao C, Li G, Qian Y, Cai M, Yin H, Xiao L, et al. Protection of Pentoxifylline against Testis Injury Induced by Intermittent Hypobaric Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3406802.
87. Aumuller G, Steinbruck M, Krause W, Wagner HJ. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anat Embryol (Berl)*. 1988;178(2):129-36.
88. Xu Y, Lei H, Guan R, Gao Z, Li H, Wang L, et al. Prophylactic protective effects and its potential mechanisms of IcarisideII on streptozotocin induced spermatogenic dysfunction. *Int. J. Mol. Sci*. 2014;15(9):16100-13.
89. Hamam ET, Awadalla A, Shokeir AA, Aboul-Naga AM. Zinc oxide nanoparticles attenuate prepubertal exposure to cisplatin- induced testicular toxicity and spermatogenesis impairment in rats. *Toxicology*. 2022;468:153102.
90. Chen W, Duan P, Tang S, Huang WT, Quan C, Qi SQ, et al. [Effects of bisphenol A on the expression of N-cadherin, Vimentin and FSHR in rat Sertoli cells]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2017;35(2):101-5.
91. Yildiz A, Ozhan O, Ulu A, Dogan T, Bakar B, Ugur Y, et al. Effects of the apricot diets containing sulfur dioxide at different concentrations on rat testicles. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023;30(29):74301-13.
92. Li M, Zhang B, Sun B, Wang X, Ban X, Sun T, et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29(1):109.
93. Kong D, Zhang J, Hou X, Zhang S, Tan J, Chen Y, et al. Acetamiprid inhibits testosterone synthesis by affecting the mitochondrial function and cytoplasmic adenosine triphosphate production in rat Leydig cells. *Biol Reprod*. 2017;96(1):254-65.
94. Wang JY, Lee YJ, Chou MC, Chang R, Chiu CH, Liang YJ, et al. Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells. *Mar Drugs*. 2015;13(3):1375-88.
95. García MM, Acquier A, Suarez G, Gomez NV, Gorostizaga A, Mendez CF, et al. Cisplatin inhibits testosterone synthesis by a mechanism that includes the action of reactive oxygen species (ROS) at the level of P450_{scc}. *Chem Biol Interact*. 2012;199(3):185-91.

96. D'Andrea MR, Lawrence D, Nagele RG, Wang CY, Damiano BP. PCNA indexing as a preclinical immunohistochemical biomarker for testicular toxicity. *Biotech Histochem.* 2008;83(5):211-20.
97. Demir M, Altındağ F. Sinapic acid ameliorates cisplatin-induced disruptions in testicular steroidogenesis and spermatogenesis by modulating androgen receptor, proliferating cell nuclear antigen and apoptosis in male rats. *Andrologia.* 2022;54(4):e14369.
98. Koroğlu KM, Çevik Ö, Şener G, Ercan F. Apocynin alleviates cisplatin-induced testicular cytotoxicity by regulating oxidative stress and apoptosis in rats. *Andrologia.* 2019;51(4):e13227.
99. Ulucan A, Yuksel H, Sahin E, Yakut S, Bozkurt MF. Protective Effects of Astaxanthin Against Formaldehyde Induced Apoptosis of Testicular Tissue in Rats. *Pak Vet J.* 2021;41(3).
100. Kim JH, Nam SW, Kim BW, Choi W, Lee JH, Kim WJ, et al. Astaxanthin improves stem cell potency via an increase in the proliferation of neural progenitor cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11(12):5109-19.
101. Aldemir M, Okulu E, Kösemehmetoğlu K, Ener K, Topal F, Evirgen O, et al. Evaluation of the protective effect of quercetin against cisplatin-induced renal and testis tissue damage and sperm parameters in rats. *Andrologia.* 2014;46(10):1089-97.
102. Alqahtani MJ, Negm WA, Saad HM, Salem EA, Hussein IA, Ibrahim HA. Fenofibrate and Diosmetin in a rat model of testicular toxicity: New insight on their protective mechanism through PPAR- α /NRF-2/HO-1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2023;165:115095.
103. Aa Aly H, G Eid B. Cisplatin induced testicular damage through mitochondria mediated apoptosis, inflammation and oxidative stress in rats: impact of resveratrol. *Endocr J.* 2020;67(9):969-80.
104. Asghari MH, Moloudizargari M, Bahadar H, Abdollahi M. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(5):545-54.
105. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 2014;32(1):1-17.
106. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl.* 2005;26(6):654-60.

107. Dokumacioglu E, Iskender H, Yenice G, Kapakin KAT, Sevim C, Hayirli A, et al. Effects of astaxanthin on biochemical and histopathological parameters related to oxidative stress on testes of rats on high fructose regime. *Andrologia*. 2018;50(7):e13042.
108. Heidari Khoei H, Fakhri S, Parvardeh S, Shams Mofarahe Z, Baninameh Z, Vardiani M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. *Toxin Rev*. 2019;38(3):248-54.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ



EK-2. ETİK KURUL KARARI

