



T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TESTİS ÜZERİNE CİSPLATİNİN APOPTOTİK ETKİSİNE  
KARŞI TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİSİ**

Nurcan ŞAHAN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

DÜZCE, 2020

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik olmayan davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

25.08.2020

Nurcan ŞAHAN



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, ilgi, tecrübeleri ve bilgisi ile yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Meryem ÇAM'a, Yüksek lisans tezimin yapım aşamasında, çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde yanımda olan tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR'a;

Çalışmamın her aşamasında bana destek vererek katılım sağlayan, herhangi bir sorunda ne zaman danışsam zaman ayırıp, ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, bilgi, deneyim ve tecrübelerinden faydalandığım, tez yapımında yönlendirmeleri ve bilgilendirmeleriyle araştırmamı biçimlendiren bölüm hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU 'ya;

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne güler yüzü ile her aşamada yardımcı olan sorumlu yöneticisi Öğr. Gör. Ali GÖK'e;

Ayrıca tezin her aşamasında yanımda olan tezimle ilgili her türlü sorunda öneri ve desteğini veren, karşılaştığım her sorun da yardımları ve nezaketi için dönem arkadaşım Semiha TÜRE'ye;

Tezimin yapım aşamasında her türlü sorunda destek ve yardımları için; diğer dönem arkadaşlarım, Nurhilal ELCİYAR ve Defne Rana OĞUZ'a;

Hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayarak maddi manevi her türlü sıkıntıma göğüs geren benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan hep elinden gelenin fazlasını yapan hayatımdaki tek şansım dediğim kıymetli canım aileme;

Teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bu Tez Düzce Üniversitesi Ayrıca Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019.04.01.904 proje numarası ile desteklenmiştir

NURCAN ŞAHAN

2020

# İÇİNDEKİLER

|                                                      |      |
|------------------------------------------------------|------|
| BEYAN .....                                          | i    |
| ÖNSÖZ.....                                           | ii   |
| İÇİNDEKİLER .....                                    | iii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                | vi   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                 | ix   |
| ÖZET .....                                           | xi   |
| ABSTRACT.....                                        | ix   |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ .....                                | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                               | 3    |
| 2.1. Testis Anatomisi.....                           | 3    |
| 2.2. Testis Embriyolojisi.....                       | 17   |
| 2.3. Testis Histolojisi.....                         | 9    |
| 2.3.1. Seminifer tübüller.....                       | 10   |
| 2.3.1.1. Sertoli hücreleri.....                      | 10   |
| 2.3.1.2. Leydig hücreleri .....                      | 11   |
| 2.3.1.3. Kan-testis bariyeri .....                   | 12   |
| 2.3.2. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez ..... | 14   |
| 2.3.3. Spermiyogenez .....                           | 14   |
| 2.3.4. Spermin yapısı.....                           | 15   |
| 2.3.5. Testis İçi kanallar .....                     | 16   |
| 2.3.6. Epididimis histolojisi.....                   | 17   |
| 2.4. Testis Fizyolojisi .....                        | 17   |
| 2.5. Apoptozis.....                                  | 20   |
| 2.5.1. Testiste apoptozis'in rolü.....               | 22   |
| 2.6. Timokinon .....                                 | 22   |
| 2.6.1. Timokinonun fizikokimyasal özellikleri.....   | 26   |
| 2.6.2. Timokinonun moleküler etki mekanizmaları..... | 26   |
| 2.6.2.1. İnflamasyon aracıları üzerine etkisi.....   | 27   |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.2.2. Peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler üzerine etkisi..... | 27        |
| 2.6.2.3. Apoptoz üzerindeki etkisi.....                                      | 27        |
| 2.6.2.4. Transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisi .....                   | 28        |
| 2.6.3. Timokinonun farmakolojik etkileri.....                                | 29        |
| 2.6.3.1. Anti-kanserojen etkisi .....                                        | 29        |
| 2.6.3.2. Antiinflamatuvar etkisi.....                                        | 30        |
| 2.6.3.3. Antioksidan etkisi.....                                             | 31        |
| 2.6.4. Timokinonun toksisitesinin ve güvenliliğinin değerlendirilmesi .....  | 31        |
| 2.7. Cisplatin .....                                                         | 32        |
| 2.7.1. Cisplatinin farmakokinetik özellikleri.....                           | 33        |
| 2.7.2. Cisplatinin etki mekanizmaları .....                                  | 34        |
| 2.7.2.1. Cisplatinin sitotoksik etki mekanizması .....                       | 34        |
| 2.7.2.2. Cisplatinin üreme sistemine etkisi.....                             | 35        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                               | <b>37</b> |
| 3.1. Deney Hayvanları.....                                                   | 37        |
| 3.2. Maddeler ve Dozlar .....                                                | 37        |
| 3.3. Cerrahi Prosedür .....                                                  | 38        |
| 3.4. Deney Grupları, Maddeler ve Veriliş Yolları .....                       | 38        |
| 3.5. Işık Mikroskopik İnceleme.....                                          | 39        |
| 3.5.1. Hematoksilen - Eozin boyama prosedürü .....                           | 40        |
| 3.5.2. Gomori-Trikrom boyama prosedürü.....                                  | 40        |
| 3.5.3. Periyodik asit schiff boyama prosedürü (PAS).....                     | 41        |
| 3.6. İmmünohistokimya Protokolü .....                                        | 41        |
| 3.6.1. İmmünohistokimyasal boyama aşamaları .....                            | 41        |
| 3.6.1.1. PBS hazırlanışı.....                                                | 42        |
| 3.6.1.2. 0.1 M Sitrat tamponu hazırlanışı .....                              | 42        |
| 3.6.1.3.1. molar NaOH (sodyum hidroksit) hazırlanışı.....                    | 42        |
| 3.6.1.4. %3 Hidrojen Peroksit hazırlanışı.....                               | 43        |
| 3.7. Spermiyogram .....                                                      | 43        |
| 3.8. Sperm Boyaması.....                                                     | 43        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                      | <b>44</b> |
| 4.1. İstatistiksel Bulgular .....                                            | 44        |

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.1. Testis ağırlığına ait bulgular.....           | 44        |
| 4.2.Histolojik Değerlendirme.....                    | 45        |
| 4.2.1. Sperm sayısı (Spermiyogram) ait bulgular..... | 50        |
| 4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme .....         | 52        |
| 4.3.1. Cleaved Caspase - 3 immün işaretleme.....     | 52        |
| 4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular.....               | 56        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>                     | <b>57</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİ .....</b>                       | <b>65</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                            | <b>66</b> |
| <b>8.EKLER.....</b>                                  | <b>78</b> |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>                              | <b>79</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Testis, epididymis ile ductus deferens .....                                                | 4  |
| Şekil 2. Scrotum ve testis.....                                                                      | 5  |
| Şekil 3. Primordial Germ Hücrelerinin Genital Kabartıya Göçü .....                                   | 7  |
| Şekil 4. Seminifer tübül parçası .....                                                               | 11 |
| Şekil 5. Spermatogenez.....                                                                          | 14 |
| Şekil 6. Spermiyogenez .....                                                                         | 16 |
| Şekil 7. Nigella sativa L. bitkisi ve tohumu.....                                                    | 23 |
| Şekil 8. Timokinonun kimyasal yapısı.....                                                            | 26 |
| Şekil 9. Timokinonun kansere karşı mekanizmaları .....                                               | 30 |
| Şekil 10. Cisplatinin moleküler yapısı .....                                                         | 33 |
| Şekil 11. Kontrol ve deney gruplarına ait testis ağırlık değerlerinin grafiği.....                   | 44 |
| Şekil 12. Kontrol grubuna ait testis dokusu normal histolojik görüntüsü....                          | 46 |
| Şekil 13. Cisplatin grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü. ....                             | 46 |
| Şekil 14. Timokinon + Cisplatin grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü .....                 | 47 |
| Şekil 15. Timokinon grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü.....                              | 47 |
| Şekil 16. Sham grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü.....                                   | 48 |
| Şekil 17. Cisplatin grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü .....                             | 48 |
| Şekil 18. Timokinon + Cisplatin ve Timokinon gruplarına ait testis dokusu histolojik görüntüsü ..... | 49 |
| Şekil 19. Kontrol ve Cisplatin gruplarına ait testis dokusu histolojik görüntüsü.....                | 49 |
| Şekil 20. Timokinon + Cisplatin ve Timokinon gruplarına ait testis dokusu histolojik görüntüsü.....  | 50 |
| Şekil 21. Kontrol ve deney gruplarına ait spermiyogram değerlerinin grafiği.....                     | 50 |
| Şekil 22. Kontrol ve Sham grubuna ait sperm histolojik görüntüsü.....                                | 51 |
| Şekil 23. Cisplatin ve Timokinon + Cisplatin gruplarına ait sperm histolojik görüntüsü.....          | 51 |
| Şekil 24. Timokinon grubuna ait sperm histolojik görüntüsü.....                                      | 52 |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 25.</b> İmmunohistokimyasal boyama ve deney gruplarının negatif ve pozitifleri.....                              | 53 |
| <b>Şekil 26.</b> Kontrol grublarına ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama .....            | 54 |
| <b>Şekil 27.</b> Cisplatin grubuna ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama.....              | 54 |
| <b>Şekil 28.</b> Timokinon + Cisplatin grubuna ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama ..... | 55 |
| <b>Şekil 29.</b> Timokinon grubuna ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama.....              | 55 |
| <b>Şekil 10.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait Cleaved Caspase - 3 ile ait apoptotik değerlerinin grafiği.....          | 56 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Nigella sativa L. tohumunun genel içeriği .....                  | 24 |
| <b>Tablo 2.</b> Nigella sativa L. tohumu uçucu yağının kimyasal bileşenleri..... | 25 |
| <b>Tablo 3.</b> Deney grupları, maddeler ve veriliş yolları .....                | 38 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                            |   |                                        |
|----------------------------|---|----------------------------------------|
| <b>ABP</b>                 | : | Androjen bağlayıcı protein             |
| <b>AMH</b>                 | : | Antimüllerian hormon                   |
| <b>Akt</b>                 | : | Protein Kinaz B                        |
| <b>A<math>\beta</math></b> | : | Beta-amiloid                           |
| <b>Caspaz</b>              | : | Sistein aspartik asid spesifik proteaz |
| <b>CAT</b>                 | : | Catalaz                                |
| <b>CAPE</b>                | : | Kafeik Asit Fenetil Ester              |
| <b>CIS</b>                 | : | Cisplatin                              |
| <b>DAB</b>                 | : | Dimetil aminobenzen                    |
| <b>DS</b>                  | : | Diklofenak sodyum                      |
| <b>dER</b>                 | : | Granülsüz endoplazmik retikulum        |
| <b>DMSO</b>                | : | Dimetil sülfoksit                      |
| <b>HCG</b>                 | : | İnsan koryonik gonodotropin            |
| <b>FDA</b>                 | : | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi          |
| <b>Erk</b>                 | : | Kinazlar                               |
| <b>FSH</b>                 | : | Folikül uyarıcı hormon                 |
| <b>GnRH</b>                | : | Gonodotropin salgılatıcı hormon        |
| <b>GST</b>                 | : | Glutasyon S-Transferaz                 |
| <b>i.p</b>                 | : | İntraperitoneal                        |
| <b>LT</b>                  | : | Lökotrienler                           |
| <b>LO</b>                  | : | lipooksigenaz                          |

|                                 |   |                                              |
|---------------------------------|---|----------------------------------------------|
| <b>MiM</b>                      | : | Müllerian inhibitör madde                    |
| <b>Nk</b>                       | : | Doğal öldürücü                               |
| <b>P53</b>                      | : | Protein 53                                   |
| <b>Pt</b>                       | : | Platin                                       |
| <b>Pb</b>                       | : | Kurşun                                       |
| <b>ROS</b>                      | : | Reaktif oksijen türleri                      |
| <b>SOD</b>                      | : | Süperoksit dismutaz                          |
| <b>PPARS</b>                    | : | Peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptör |
| <b>TBF</b>                      | : | Testis belirleyici faktör                    |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>  | : | Tümör nekroz faktörü alfa                    |
| <b>TQ</b>                       | : | Timokinon                                    |
| <b>Nf- <math>\kappa</math>b</b> | : | Nükleer faktör kappa beta                    |
| <b><math>\mu</math>g</b>        | : | Mikrogram                                    |
| <b><math>\mu</math>l</b>        | : | Mikrolitre                                   |

## ÖZET

### TESTİS ÜZERİNE CİSPLATİNİN APOPTOTİK ETKİSİNE KARŞI TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİSİ

Nurcan ŞAHAN

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Ağustos 2020, 79 Sayfa

Bu tez çalışmasıyla, biyolojik etkileri olduğu bilinen ve son yıllarda yapılan araştırmalarda önemi artan timokinon ile bir antitümör ilaç olan Cisplatinin testis dokusu üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldırmayı veya en aza indirmeyi amaçladık. Bu amaçla 29 adet, Wistar albino rat rastgele 1. Kontrol (n = 4), 2. Sham (n = 4), 3. Cisplatin (n = 7), 4. Cisplatin + Timokinon (n = 7), 5. Timokinon (n = 7), gruplarına ayrıldı. 2. grup Sham grubuna 10 gün boyunca gavaj yoluyla mısır yağı (500 µl) verildi. 3. Cisplatin grubuna 1.5 mg / kg / gün Cisplatin 3, 5 ve 7. günlerde intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. 4. Timokinon + Cisplatin grubuna; gavaj yolu ile mısır yağı (500 µl) + timokinon 50 mg / kg / gün ve cisplatin 3, 5 ve 7. günlerde 1.5 mg / kg / gün intraperitoneal olarak uygulandı. 5. grup Timokinon grubuna 10 gün boyunca gavaj yoluyla timokinon (50 mg / kg / gün + mısır yağı (500 µl)) verildi. Deneyin ilk aşamasında ratların vücut ağırlıkları ölçüldü. Deneyin 10. günde anestezi altında deneklerin testisleri alındı, histopatolojik incelemeler için alınan testisler rutin işlemlere tabi tutuldu. Epididimisten alınan örneklerden sperm sayımları yapıldı. Spermiler hemotoksilen eozin ile boyandı. Testisler HE, Gomori trikrom ve PAS boyaları ile boyandı. Cleaved Caspase - 3 antikoru ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. Işık mikroskopik inceleme sonucunda; timokinonun cisplatinin neden olduğu testiküler hasarı ve germ hücre apoptozisini azalttığı tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler;** Antioxidant, Cisplatin, Cleaved Caspase–3, Timokinon, Apoptozis.

## **ABSTRACT**

### **AGAINST APOPTOTIC EFFECT OF CISPLATIN ON TESTIS PROTECTIVE EFFECT OF THYMOKINONE**

Nurcan ŞAHAN

Master Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor Asst. Prof. Kayıhan KARAÇOR

August 2020, 79 Page

With this thesis, we aimed to eliminate or minimize the adverse effects of Cisplatin, an antitumor drug, Cisplatin, on the testicular tissue with thymoquinone, which is known to have biological effects and has increased in recent years. For this purpose, 29 Wistar albino rats randomly 1. Control (n = 4), 2. Sham (n = 4), 3. Cisplatin (n = 7), 4. Cisplatin + (n = 7), 5. Thymoquinone (n = 7) was divided into groups. Corn oil (500 µl) was administered to the second group of Sham group by gavage for 10 days. 3. Cisplatin group 1.5 mg / kg / day cisplatin 3, 5 and 7. days were administered by intraperitoneal injection. 4. Thymoquinone + Cisplatin group; corn oil (500 µl) by gavaj + thymoquinone 50 mg / kg / day and cisplatin 3, 5 and 7. on days, 1.5 mg / kg / day was administered intraperitoneally. The 5th group of Timokinon group was given thymocinone 50 mg / kg / day + corn oil (500 µl) by gavage for 10 days. In the first stage of the experiment, the body weights of the rats were measured. On the 10th day of the experiment, testes of the subjects were taken under anesthesia, and the testicles taken for histopathological examinations were routinely processed. Sperm counts were performed from samples taken from the epididymis. Sperms were stained with hematoxylin eosin. The testicles were stained with HE, Gomori trichrome and PAS paints. Immuno histochemical staining was performed with Cleaved Caspase - 3 antibody. As a result of light microscopic examination; It was found that thymoquinone reduced testicular damage and germ cell apoptosis caused by cisplatin.

**Keywords:** Antioxidant, Cisplatin, Cleaved Caspase - 3, Thymoquinone, Apoptosis.

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II), testis, yumurtalık, gastrik, pulmoner, prostat, baş ve boyun, mesane ve servikal kanserler, lenfoma ve osteosarkom gibi birçok kanser türünün tedavisinde başarıyla kullanılan etkili bir antineoplastik ajandır. Bununla birlikte, ototoksisite, nefrotoksisite, miyelotoksisite, gastrointestinal toksisite ve nörolojik, hematolojik ve üreme sistemini de içeren ciddi yan etkileri cisplatinin klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Çok sayıda çalışma, cisplatin'in üreme sistemi toksisitesinde reaktif oksijen radikallerinin (ROS) ve oksidatif stresin (OS) rolünü göstermiştir <sup>1</sup>.

Kemoterapik ilaçlar tümör hücrelerinin büyüme ve üremesini durdurarak hücreleri yok ederken, tümör ile sağlıklı hücre arasındaki benzerliklerden dolayı sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedir <sup>2</sup>.

*Nigella sativa* L. Ranunculacea (Düğün çiçeğigiller) familyasından yıllık bir bitkidir. Ülkemizde siyah tohumu “çörek otu” olarak bilinir. Çörek otunun besinlere eklenerek veya farmasötik olarak da kullanımı yaygındır. Yapılan araştırmalarda çörek otu tohumunun % 36 - 38'in çeşitli yağlardan oluştuğu gösterilmiştir. Uçucu yağ bölümünün temel içeriğinin ise timokinon (TQ) olduğu tespit edilmiştir <sup>3,4</sup>.

Kanserin uzun süren kemoterapik tedavisi masraflıdır ve yan etkilerinden dolayı araştırmalar yönünü, doğal olarak bulunan, yüksek etkiye sahip, daha az yan etkiye neden olan doğal ürünlere çevirmiştir. Dünyanın birçok yerinde besin maddesi olarak kullanılan doğal ürünlerin, üreme sistemi üzerine koruyucu etkileri yanında kanser gibi birçok hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde de kullanıldığı belirtilmektedir. Çörek otu yağının temel maddesi olan timokinonun antioksidan, antitümör, antidiyabetik, antihistaminik, antiinflamatuvar ve üreme sistemi üzerinde olumlu etkileri raporlanmıştır <sup>5</sup>.

Biz de timokinonun bu özelliklerinden yola çıkarak cisplatinin testis dokusunda yaptığı harabiyetin timokinon kullanımıyla en aza indirilebileceğini veya ortadan kaldırılabileceğini düşünmekteyiz.

Kanser tedavisi sonrasında hastalarda infertilite oranının gittikçe artması sebebiyle bu konuyla ilgili yeni tedavi ve koruma yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bizde bu çalışmamızda bu sorunun temelini oluşturan etkenlerden biri olan testis dokusu hasarında çörek otunun etken maddesi timokinonun koruyucu etkinliği olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Bu çalışmayla ışık mikroskopik inceleme için histokimyasal boyama yöntemlerinin yanısıra ve cleaved caspase - 3 kullanılarak yapılan immuno histokimyasal boyama ile cisplatinin testis dokusu üzerindeki apoptotik etkilerini ve bu apoptotik etkiler üzerinde timokinonun koruyucu etkisini bir arada göstermeye çalıştık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testis Anatomisi

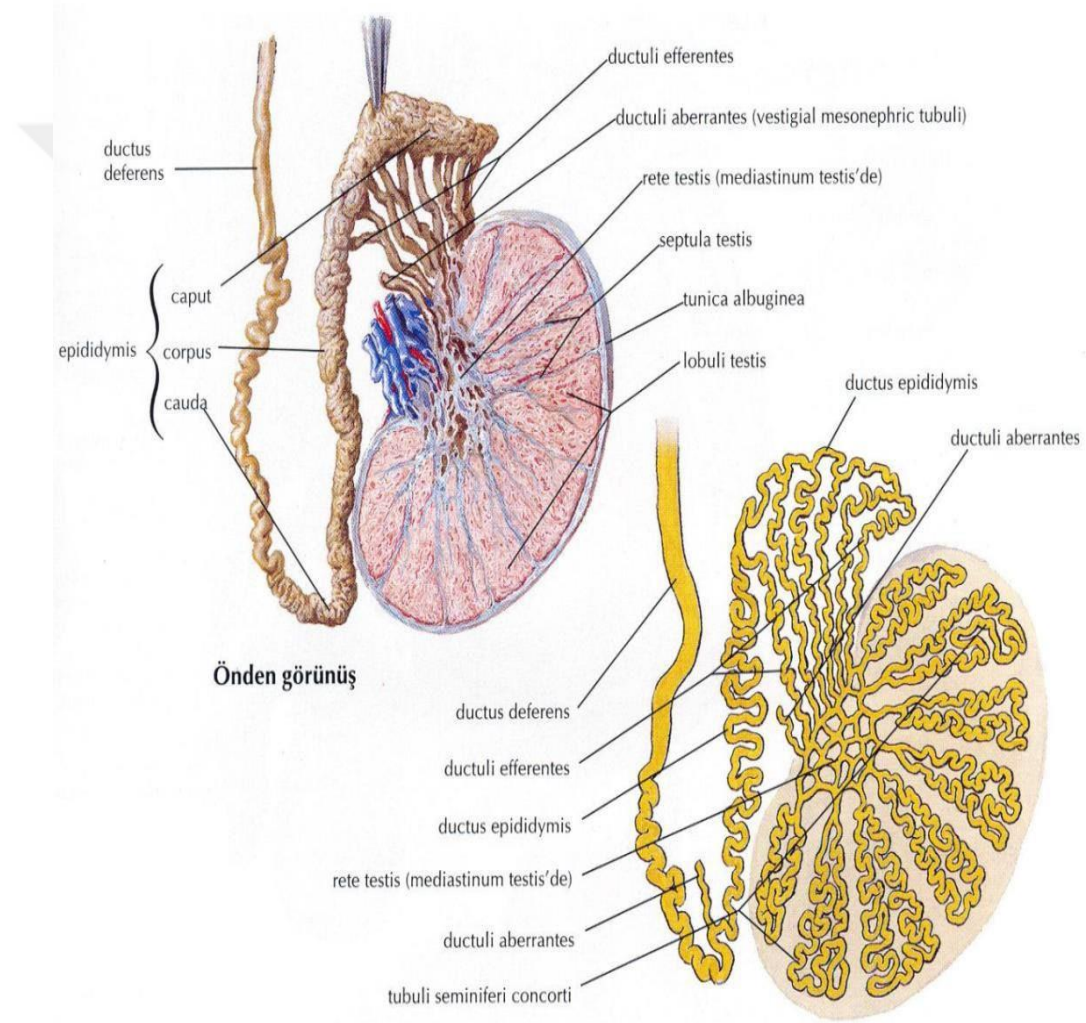
Testisler erkek üreme organı olup; penisin arka alt kısmında bulunan, symphysis pubica altında yer alır. Testisler funniculus spermaticusa ile asılı bulunan, sağlı sollu bir çifttir. Skrotum denilen bir kese içerisinde bulunurlar. Dıştan scrotomu ikiye ayıran deri kabartısına raphe scroti denir. Testisler yanlardan basık olup, oval şekillidir. Testislerin boyutları ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm kalınlığında ve genişliğindedir. Ortalama ağırlıkları ise 10-14 gramdır. Testisler aynı büyüklükte olmalarına rağmen sol testis daha aşağıda yer alırken, sağ testis ise sol testise göre % 10 daha ağırdır. Ağır olmasının sebebi ise sol taraftaki funiculus spermaticus'un sağ tarafa göre daha uzun olmasıdır. Testislerin ısısı, vücut ısısından 3-4 °C daha düşüktür. Scrotum derisi üzerinde ince kıllar, ter bezleri ve yağ bezleri bulunur <sup>6,7</sup>. Testisin iki yüzü facies medialis ve facies lateralis diye adlandırılır. Margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı; extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu bulunmaktadır <sup>8</sup>.

Testislerin scrotum içerisindeki yönü düz değildir. Üst ucu dışa ve öne, alt ucu ise arkaya ve içe doğru olarak bulunur. Konveks ön kenarı biraz da dışa - aşağı doğru, daha düzgün olan arka kenarı da, biraz yukarı - içe doğru bakar. Testisin alt ucu yani extremitas inferior, kısmında cauda epididymis bulunur. Testisin üst ucu olan extremitas superiora, kısmında ise caput epididymis bulunur. Epididymis ise testislerin arka kenarının dış kısmına bağlanmıştır <sup>8</sup>. Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere üç kılıf ile çevrilidir.

**Tunica vaginalis;** dışta lamina parietalis ve içte lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki tabakadır. Lamina visceralis testisi ve epididymisi birbirine bağlarken lamina parietalis dış yüzü düz olup mezotelle kaplıdır <sup>8</sup>.

**Tunica albuginea;** olarak adlandırılan sıkı, fibroz bağ yapı testis yüzeyini örterek ve testisin arka bölgesinde içe doğru kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir. Fibroz bağ doku içerisinde bulunan düz kas hücreleri, kasılarak spermin efferent duktuslara doğru ilerletilmesine ve sonuç olarak ejakülasyona yardımcı olurlar.

Mediastinum testisten köken alan bağ doku uzantılarına septula testis denir ve testisi 200 - 300'den fazla lobuluslere ayırır ve lobuli testis adını alır. Lobuli testis içinde tübüli seminiferi contorti adı verilen kanalcıklar vardır ve bunların tamamı testis parankimini oluşturur. Seminiferi contortiler mediastinum testise yakın bir yerde tübüli rekti olarak isim verilen düz kanalcıkla devam eder. Tübüli rekti mediastinum testise girdikten sonra burada rete testis olarak adlandırılan bir ağ oluşturur. Rete testisler 6 - 12 adet efferent kanalla epididimin baş kısmına bağlanır<sup>8,9</sup> ( Şekil 1.).

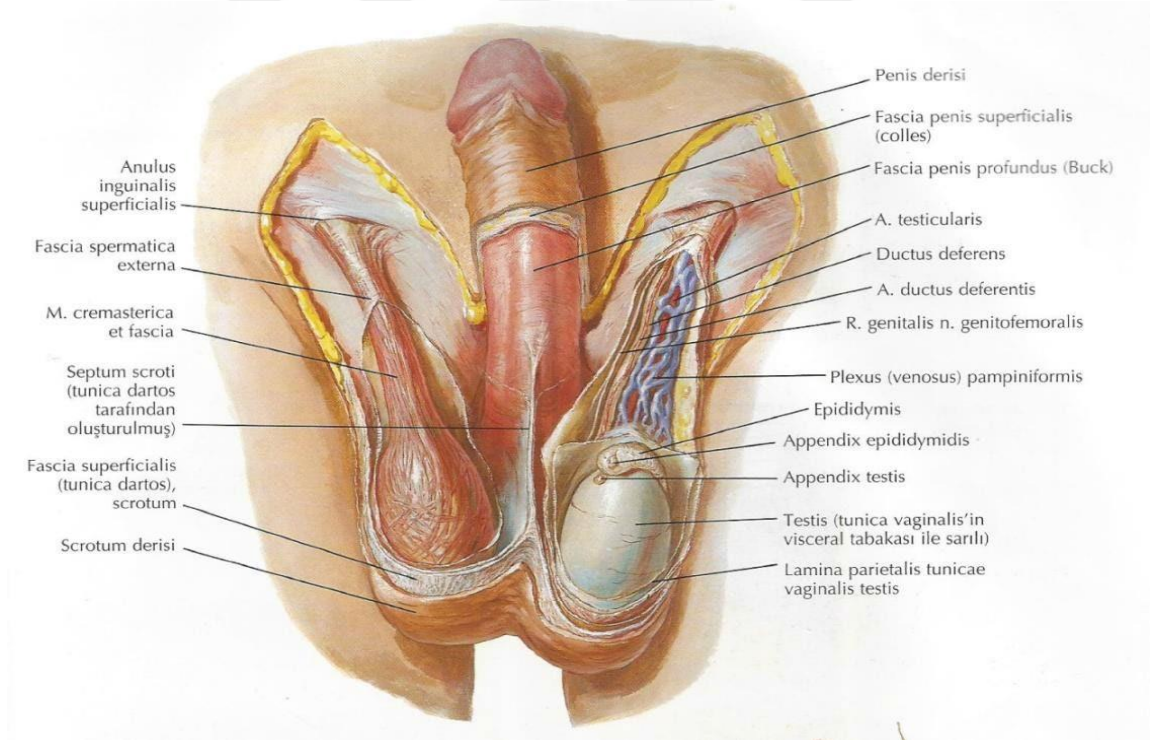


Şekil 2. Testis, Epididymis ile Ductus Deferens<sup>9</sup>.

**Tunika vasküloza;** ise kan damarlarını içeren gevşek bir bağ dokudan oluşur. Tunika albugineanın iç kısmında bulunur ve testis içindeki tüm yüzeyi kaplar<sup>8,9,10</sup>.

Skrotumun arterleri; skrotumun ön tarafını arteria pudenda externa, arka tarafını ise arteria pudenda interna besler. Ayrıca aortdan çıkan arteria testicularis ve arteria cremastericadan da besleyici dallar alır. Skrotumun venleri olan vena scrotalisler arterlere eşlik eder ve vena pudenda externa ile birleşir <sup>11</sup> (Şekil 2.). Testis'in lenfatik drenajı ise, nodi lymphatici lumbales ve nodi lymphatici preaortici'ye gerçekleşir <sup>8</sup>.

Testis ve epididimisin venleri önce plexus pampiniformis denilen kıvrıntılı bir ven plexusunu oluştururlar. Plexus pampiniformis, spermatik kordun içinde anterior ve posterior gruplara ayrılan 10 - 12 adet venden meydana gelir. Her grup internal inguinal halkanın proksimalinde iki ven oluşturacak şekilde üç veya dört ven tarafından drene edilir. Bu venler ekstrapitoneal boşluğa testiküler arterin iki yanından girerler. Sağdaki ven vena cava inferiora, soldaki ise renal vene dökülür <sup>9,10,11</sup>.



Şekil 3. Scrotum ve Testis <sup>9</sup>.

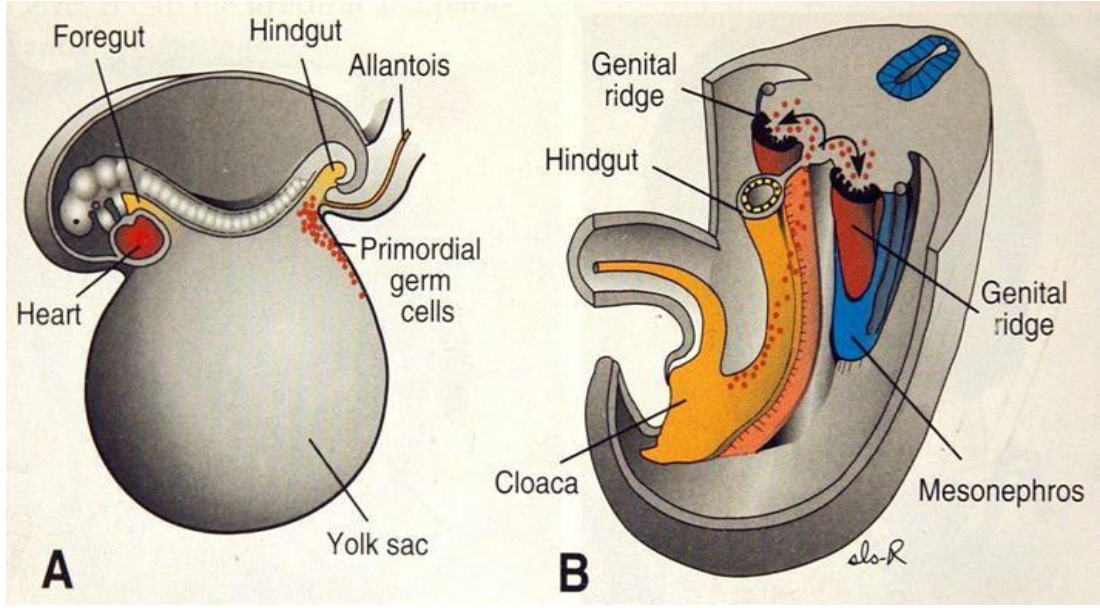
Testisin innervasyonu, superior mezenterik ve renal arter bölgesindeki aortik pleksuslar ile ilişkili genel viseral duyu lifleri ve sempatik lifler ile sağlanır. Bu lifler testise testiküler arterler ile birlikte gelir ve testise sempatik ve duyusal innervasyon taşırlar<sup>9,10,11,12</sup>.

## 2.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun kromozomu ve genetik cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da cinsiyet karakteristikleri embriyogenezin 7. haftasına kadar gelişme göstermez. Genital sistem her iki cinste de erken dönemde benzer özellikler gösterir<sup>13,14</sup>. Gonadlar (overler ve testisler) üç kaynaktan oluşurlar;

1. Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
2. Altındaki mezenşim (embriyonik bağ doku)
3. Primordiyal germ hücreleri (erken dönemdeki farklılanmamış seks hücreleri)<sup>13,14</sup>.

Gonadlar karın arka duvarında intermedier mezodermden mezonefrozun medialinde oluşan gonadal kabartıdan gelişirler. Epitel alttaki mezenşim içerisine proliferer olarak primer seks kordonlarını oluşturur. Germ hücreleri 3. hafta sonunda allantoise yakın son bağırsak epiteli içinde oluşur ve 5. haftadan itibaren gonadlara göç etmeye başlar. 6. haftada ise gonadları işgal ederler (Şekil 3.). Primordiyal germ hücreleri genital kabartılara ulaşamazlarsa gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklılanmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır<sup>13</sup>. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaşmadan önce ve ulaşması takibinde genital kabartı epiteli proliferer olur ve mezenşim içerisindeki yüzeye bağlantılı kordonlar (primitif cinsiyet kordonları) oluştururlar. Her iki cinste de embriyolarda kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. Bu dönemde gonadların ayırt edilebilmesi mümkün değildir. Bu evredeki gonada; farklılanmamış gonad denilmektedir<sup>13,14</sup>.



**Şekil 4.** Primordial Germ Hücrelerinin Genital Kabartıya Göçü <sup>13</sup>.

Gelişimin 7. haftasına kadar her iki cinsiyet için genel tek bir gonad tipi vardır. Bu dönem gonadal gelişimin farksızlaşmış evresidir. Testis belirleyici faktör (TBF) için lüzumlu olan SRY geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerinde yer alır. Testis belirleyici faktör etkisi altındaki gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlara (seminiferöz tübül primordiyumları) farksızlaşır. Seminiferöz kordonların oluşumu SOX9 ve FGF9 genlerinin ekspresyonları ile sağlanır <sup>13,14</sup>.

### Testis Gelişimi

Testis belirleyici faktör, gonadal kordonları etkileyerek, onların farksızlaşmış gonadın medulla derinliklerine doğru uzamasına sebep olur. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle ağzlaşır ve rete testisi oluşturur. Gonadal kordonlar yüzey epiteliyle ilişkilerini yitirirler, organ tunika albuginea ile epitelden ayrılır ve puberteye kadar gonadal kordonlar kapalı bir şekilde kalırlar. Genişleyen testis dejenere olmuş mezonefroza ayrılır. Kendi mezenterisi olan, mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminiferöz tübüllere, tubuli rekti ve rete testise dönüşürler <sup>13,14</sup>.

Seminifer tübüller interstisyel hücreleri oluşturan mezenşim ile ayrılırlar. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) üretmeye başlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital organların gelişmesini ve farksızlaşmasını uyarırlar.

Seminifer tübüller ise puberteye kadar solid halde bulunur. Tübüllerin lümeni, pubertede açılır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu ise testosteron üretimini sağlayarak 8 - 12 haftada en yüksek değerine ulaşır. Fetal testisler Antimüllerian hormon (AMH) veya Müllerian Inhibitör Faktör (MiM) adı verilen hormonu da salgılar. AMH sertoli hücrelerinden salgılanır. Seminiferöz tübüllerin; Pubertede lümenleri açılarak seminifer t b l sleri oluşturur. Seminifer tübüllerin duvarında ise iki tip hücre bulunmaktadır <sup>13,14</sup>.

**-Sertoli hücreleri**, destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.

**-Spermatogonia**, primordiyal sperm hücreleri olan bu hücreler, primordiyal germ hücrelerinden meydana gelirler <sup>13,14</sup>.

Fetal gelişim sırasında, testislerin yüzey epiteli d zle erek testisin dış yüzündeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktuliyi oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam etmektedir. Efferent duktuli, mezonefrik kanalından oluşan duktus epididimisi ile bağlanır <sup>14</sup>.

## **Genital Kanalların Gelişimi**

Genital kanalların farklanması hormonların etkisiyle gerçekleşir. Mezonefroz dejenere olduğunda, mezonefrik tübüllerden bazıları duktuli efferentesleri oluştururlar. Sertoli hücrelerinden salgılanan Müllerian Inhibitör Faktör (MiM) paramezonefrik kanalın regresyonuna neden olurken, 8. haftada leydig hücrelerinden salgılanmaya ba layan testosteron mezonefrik kanalın erkek genital kanalları oluşturmasını sağlar. Mezonefrik kanalın (Wolf kanalı) proksimal kısımları kıvrıntılı bir hal alır ve duktus epididimisi oluşturur. Mezonefrik kanal duktus epididimisten çıktıktan sonra kalın bir kas tabakasıyla sarılarak vesikula seminalise kadar duktus deferensisi oluşturur <sup>13,14</sup>. Mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru seminal bezler oluşur. Seminal bezlerin kanalı ile üretra arasında kalan mezonefrik kanal kısmı ejakulatuar kanal olarak adlandırılır.

26. haftada pelvisdeki büyüme ve embriyodaki boyut artı ı ile birlikte testisler inguinal kanalda ilerler ve skrotuma inmeye ba lar <sup>13</sup>.

Testislerin büyümesi, batin içinde büyüyen organların oluşturduğu intraabdominal basınçta artışa ve gerileyen mezonefroz, testislerin karın arka duvarı boyunca hareketine yardımcı olur. Bu süreç testisten skrotuma uzanan gubernakulum testis eşliğinde ve androjen hormonların kontrolünde gelişir. Testisler fetal hayatın 3.ayından itibaren skrotuma inmeye başlar. Term doğmuş bebeklerin % 97'sinden fazlasında testisler skrotum içerisinde. Genellikle doğumda inmemiş testis olan bebeklerin çoğunda testisler bir yaşına kadar skrotuma iner <sup>13,14,15</sup>.

### 2.3. Testis Histolojisi

Testisler, bir çift skrotum içine yerleşmiş olan, testosteron ve spermatozoonların üretiminden sorumlu olan organlardır. Skrotum da asılı şekilde yer alan testisler dıştan kapsül ile çevrelenmiştir. Bu kapsül ise 3 tabakadan oluşmaktadır.

1. Tunika Vaginalis: Testisin en dışında bulunur. Düzleşmiş mezotelyal hücrelerinden oluşan katmandır. Kapalı seröz kesenin visseral tabakası peritondan köken alır. Testisin ön ve yan yüzeylerini sarar ve ayrıca yüzeyde skrotum üzerinden tunika vaginalisin paryetal tabakasını oluşturur. Tunika vaginalis; dışta paryetal tabaka, içte visseral tabakadan oluşur ve testisin yan ve ön kısımlarında tunika albugineayı örter <sup>16,17,18,19</sup>.
2. Tunika albuginea: En kalın ve belirgin tabakası olup, testise giren - çıkan kan ve lenf damarları bu tabakada bulunur. Yoğun bir fibroelastik bağ doku yapısında düz kas hücreleri yer alır <sup>16,17,18,19</sup>.
3. Tunika vasküloza: En iç tabaka olan tunika vasküloza ise damardan zengin gevşek bağ dokusudur <sup>16,17,18,19</sup>.

Tunika albuginea testisin arka yüzünden kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum kapsüle doğru ince, fibröz uzantılarla testisin 250 - 300 kadar piramidal kompartmanlara böler bunlara lobuli testis (testis lobülleri) denir. Her bir lobülde sayıları 1 - 4 arasında değişen kıvrıntılı seminifer tübüller bulunur. Seminifer tübüllerin mediastinum testiste bulunan düz kısımlarına ise tubulus recti (düz tübüller) denir. Tubulus rectiler ise mediastinum testis içinde anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testislere açılırlar. Stroma gevşek bağ dokusu, damarlar, sinirler ve interstisyel hücrelerden (Leydig hücreleri) oluşur <sup>18,19</sup>.

### 2.3.1. Seminifer tübüller

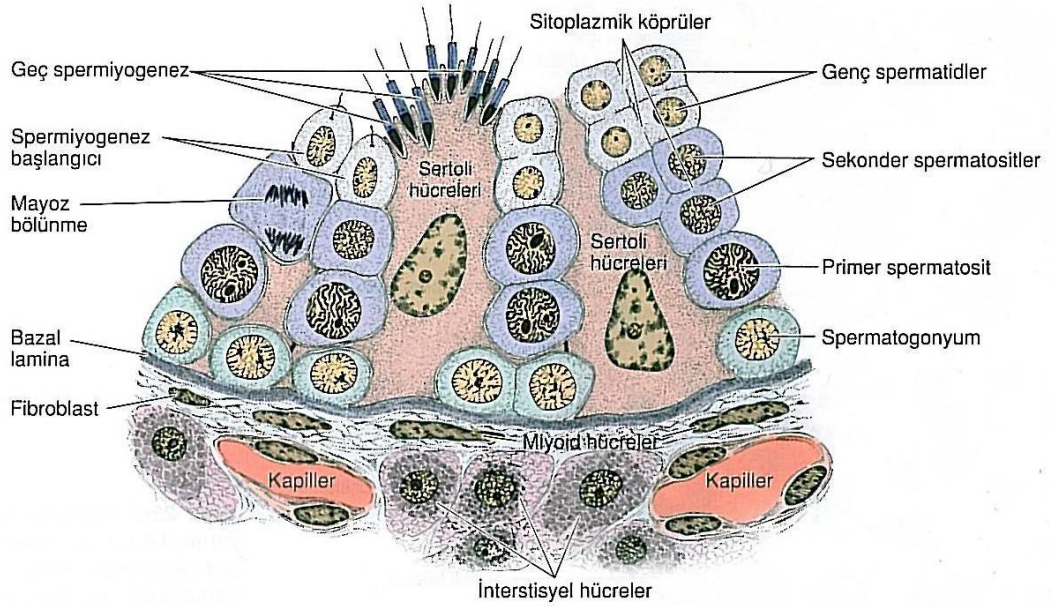
Testis hacminin büyük bir bölümünü oluşturan seminifer tübüller her testiste ortalama 250-1000 adet bulunur ve bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık olarak 250 metredir. Her tübül 150-250  m (mikrometre)  apındadır. Tübüller kıvrımlı ve uçlarına doğru lümeni daralarak tubuli rekti (düz tübül) olarak adlandırılan kısa segmentler halinde devam eden kanallar şeklinde uzanırlar. Rete testis kanalları anastomozlaşarak, yaklaşık 10 - 20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanır <sup>18,19</sup>. Seminifer tübüller; sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere iki hücre içeren özelleşmiş germinal ya da seminifer epitel ile döşelidir. Epitel bazal laminasının altında fibröz bağ dokusu bulunur. Bazal lamina altında miyoid hücre bulunur. Miyoid hücreler tübüllerin zayıf bir şekilde kasılmasını sağlarlar. Seminifer tübüller arasındaki interstisiyel dokuda, lenf damarları, makrofajlar, mast hücreleri ve androjen üreten Leydig hücreleri bulunur <sup>18</sup>. Germinal epitelde iki tip hücre bulunur: Büyük-bölünmeyen; sertoli (destek hücreleri) hücreleri ve b l nebiyen; spermatogenik seri hücreleri <sup>18,19,20</sup>.

#### 2.3.1.1. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri seminifer tübüller içinde spermatogenik serinin hücreleri ile bağlı bulunurlar. Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreleri çevreleyen ve aralarındaki boşlukları dolduran geniş apikal ve lateral yüzeyleri bulunan hücrelerdir <sup>18,19,20</sup> (şekil 4.). Seminifer tübüllerin bazal laminasına oturan sertoli hücreleri, uzun prizmatik hücreleridir. Sertoli hücrelerinin çekirdekleri oluklu, oval ya da üçgen şeklinde olup  kromotik boyanırken, çekirdekçikleri ise heterokromatinler ile ilişkili ve belirgindir. Sitoplazmalarında bol miktarda granülsüz, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Bunun yanında golgi kompleksleri iyi gelişmiş olup, mitokondri ve lizozom içerir. Hücreler birbirleriyle zonula okludens tipi bağlantı kurarlar. Bu bağlantı seminifer tübül lümenini çepeçevre sararak kesintisiz hücre tabakası oluştur. Bu tabaka kan-testis bariyeri olarak fonksiyon görür. Spermatogonyumlardan sırasıyla spermatosit ve spermatid adı verilen hücreler oluşur. Bu hücreler sertoli hücrelerinin yan duvarları boyunca lümene doğru göç ederler. Spermatositler sertoli hücrelerinin yan duvarlarında, spermatidler ise apikal duvarlarındaki oyuklar içerisine yerleşirler <sup>18,19</sup>.

Sertoli hücrelerinin görevleri şunlardır;

- Spermatozoonları destekler, korur ve besler <sup>18,19</sup>.
- Spermiyogenez esnasında oluşan artık cisimcikleri fagosite eder <sup>18,19</sup>.
- Follikül stimule edici hormon (FSH) kontrolü altında androjen-bağlayıcı-protein (ABP) sekresyonu yaparlar. Bu protein, testosteronu bağlayarak seminifer tübül içerisinde birikmesine neden olur. Ayrıca, Follikül stimule edici hormon (FSH) salınım ve sentezini baskılayan inhibin salgılar <sup>18,19</sup>.
- Kan- testis bariyerini oluşturur <sup>18,19</sup>.
- Fetal gelişim döneminde antimüllerian hormon sentez ve sekresyonunu yapar <sup>18,19</sup>.



Şekil 5. Seminifer tübül parçası <sup>18</sup>.

### 2.3.1.2. Leydig hücreleri

İnterisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücreleri yuvarlak ya da poligonal, merkezi çekirdekli, çekirdekçiği belirgin, lipid damlacıklarından zengin eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Golgi kompleksi çekirdeğe yakın konumdadır. Salgısını, testosteron ihtiyacına göre sentezler ve biriktirmeden salgılar. Dikkat çekici özelliği geniş granülsüz endoplazmik retikulumlarıdır. Granülsüz endoplazmik retikulumda androjenik steroidlerin biyosentezi için gerekli enzimler bulunur.

Sitoplazmalarında bu enzimlerin yanında peroksizom, lizozomlar ve mitokondriler, golgi kompleksi, lipid damlacıkları ve lipofuksin pigment granülleri bulunur. Testosteron; mitokondri ve granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce sentezlenmektedir. Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteronun salınımı, hipofizden salgılanan bir gonadotropin olan luteinizan hormon (LH) tarafından stimüle edilir<sup>18,19</sup>.

### **2.3.1.3. Kan-testis bariyeri**

Sertoli hücreleri bazolateral kısımlarında, zonula okludens bağlantıları ile seminifer epitelde kan testis bariyerini oluşturur. Bu fiziksel bariyer sayesinde spermatogenik hücreler, vücudun otoimmün saldırılarından korunur. Spermatogonyumlar, tübüllerin bazalinde kan testis bariyerinin hemen altında yer alır, lenfositleri ve diğer bağışıklık hücrelerini içeren damarlı interstisiyel dokudan yalıtılmamış halde bulunurlar. Primer spermatositler geçici olarak bu sıkı bağlantıları bölgesel olarak ayırır ve tübülün adluminal bölmesine ulaşır. Bu sırada spermatositler, sertoli hücrelerine tutunmuş halde bulunur. Spermatogonyumlar gibi bütün spermatositler ve spermatidler sertoli hücrelerinin yüzey katlanmalarının arasındadır. Adluminal göç, kan testis bariyerinin işlevinde herhangi bir aksamaya sebep olmaksızın gerçekleşir, bu durum germ hücrelerinin birbiri ile hücreler arası köprülerle bağlantılı olduğu düşünüldüğünde daha da etkili olmaktadır Sertoli hücreleri de aralarında iyon değişimini sağlayan gap junctionlar ile birbirine bağlanmışlardır. Bu bağlantılar, sıkı bağlantı noktalarındaki geçici değişikliklerin düzenlenmesine ve spermatogenik serinin uyumlu bir şekilde yürütülmesine yardımcı olur. Spermatidlerde flagellum içeren kuyruk gelişirken, bu yapılar sertoli hücrelerinin apikalinden uzanan partiküller olarak görülür<sup>18,19</sup>.

### **2.3.2. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez**

Spermatogenez, spermatogonyumlardan sperm oluşum aşamasıdır. Primordiyal germ hücrelerinden köken alan spermatogenik hücreler çoğalıp farklılaşarak olgun spermeleri meydana getirir. Bu hücreler seminifer epitelde sıralı halde bulunur.

Hipofiz bezinde gonadotropinlerin seviyesinin artması puberteden önce başlar ve yaşam boyunca devam eder <sup>18,19</sup>. Seminifer tübülün bazal laminasının üzerinde diploid yapıda spermatogonyum hücreleri vardır. Küçük, yuvarlak, çapları 12 mikrometre olan hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarının altında olduğu için bu hücreler kan testis bariyerinin dışındadır. Puberteye kadar spermatogenetik hücrelerden sadece spermatogonyumlar mevcutken, puberteden sonra hormonal etki ile bu hücreler mitozla çoğalarak diğer tip hücreleri oluştururlar <sup>17</sup>. Koyu renkli ve oval şekilli spermatogonyum kök hücre olarak hareket eder ve nadir bölünür. Bu hücrenin bölünmesinin ardından iki tip hücre meydana gelir. Birincisi kök hücreye benzer. Diğeri daha soluk boyanan, oval çekirdekli ve daha hızlı bölünebilen özelliklere sahip hücrelerdir <sup>18</sup> ;

**Tip A hücre (Ana hücre) koyu spermatogonyumlar:** Oval bir çekirdeğe ve ince granüllü kromatine sahip hücrelerdir. Mitoz ile ardışık bölünmeler geçirerek yarısı Tip A olarak kalırken, geri kalan kısmı büyüyerek Tip B hücresine dönüşür <sup>18,19</sup>.

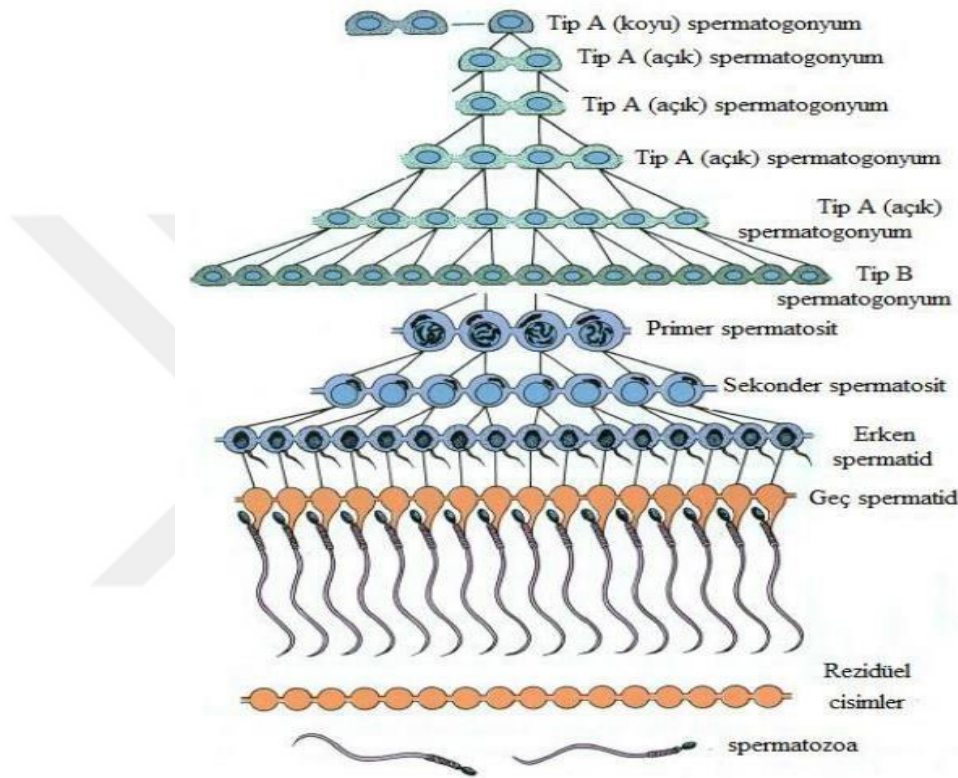
**Tip A açık spermatogonyumlar:** Açık renkli ince granüllü hücrelerdir. Bu hücreler sperm oluşumu farklılaşma sürecinde yer alırlar. Ardışık birkaç mitoz bölünme ile sayıları artar <sup>18,19</sup>.

**Tip B spermatogonyumlar:** Tip A'dan büyük hücrelerdir. Mitozla çoğalan bu hücrelerden primer spermatositler oluşur <sup>18,19</sup>.

Primer spermatositler ökromatik çekirdekli, hacmi en büyük yuvarlak hücrelerdir. Oluştuktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Primer spermatositler spermatogonyumlardan iki kat daha fazla DNA miktarına sahiptir. İlk olarak primer spermatositler sekonder spermatositleri oluşturmak için birinci mayozu gerçekleştirirler. Daha sonra sekonder spermatositler ikinci mayozu gerçekleştirerek haploid (1N) spermatidleri oluşturur. Sekonder spermatositler interfaz evresinde çok kısa süre kalır, hızlı bir şekilde ikinci mayozu gerçekleştirdiği için kesitlerde görülmeleri zordur ve kısa ömürlü olarak tanımlanır <sup>18,19,20</sup>.

İkinci mayozda kromatidlerin birbirinden ayrılmasıyla haploid yapıda bulunan spermatidler, sertoli hücrelerinin kriptaları içinde gömülü halde bulunurlar ve spermiyogenez olarak adlandırılan farklılaşma ile spermiyumları oluştururlar.

Spermatositlerde 1 ve 2. mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) olmadığı için, ikinci bölünmenin ardından hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1N) yapıda spermatositler oluşur<sup>18,19</sup> (Şekil 5.). Döllenme ile birlikte, mayoz bölünme sonucu oluşan bir haploid ovum ve sperm birleşir ve normal diploid kromozom sayısı korunur .



Şekil 6. Spermatogenez<sup>20</sup>.

### 2.3.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez son basamak olup spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için özelleşmiş hücreler olan olgun spermlere dönüşme sürecidir. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır. İkinci mayoz bölünme sonunda her bir spermatid 22 otozomal kromozoma ve bir X veya Y kromozomuna sahiptir. DNA içeriği haploiddir ve bölünme gerçekleşmez. Haploid spermatidler farklılaşarak olgun spermleri oluşturur. Haploid spermatidler küçüktürler ve hücreler seminifer tübül lümenine yakın bulunurlar<sup>18,19,20</sup>.

Spermiyogenez 4 faza ayrılır:

**Golgi Fazi:** Bu fazda spermatid sitoplazması, nükleusun yakınında bulunan oldukça belirginleşmiş olan golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ile dER (Düz endoplazmik retikulum) tübüllerini içerir. Golgi kompleksinde sentezlenen litik enzimler proakrozomal vezikülleri oluşturur ve ardından birleşerek akrozomal vezikül oluştururlar.

Sentriyoller akrozomal vezikülden en uzağa göç eder, bir tanesi bazal cisimcik olarak hareket eder ve Flagella aksonemini oluşturmaya başlar <sup>18,19</sup>.

**Kep Fazi:** Bu fazda akrozomal vezikül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde dağılır ve akrozom adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz hidrolitik enzimlerini içerir. Oositi çevreleyen zona pellusidayı sindirir. Bu işleme, akrozomal reaksiyon denir ve döllenmenin ilk basamaklarından biridir <sup>18,19</sup>.

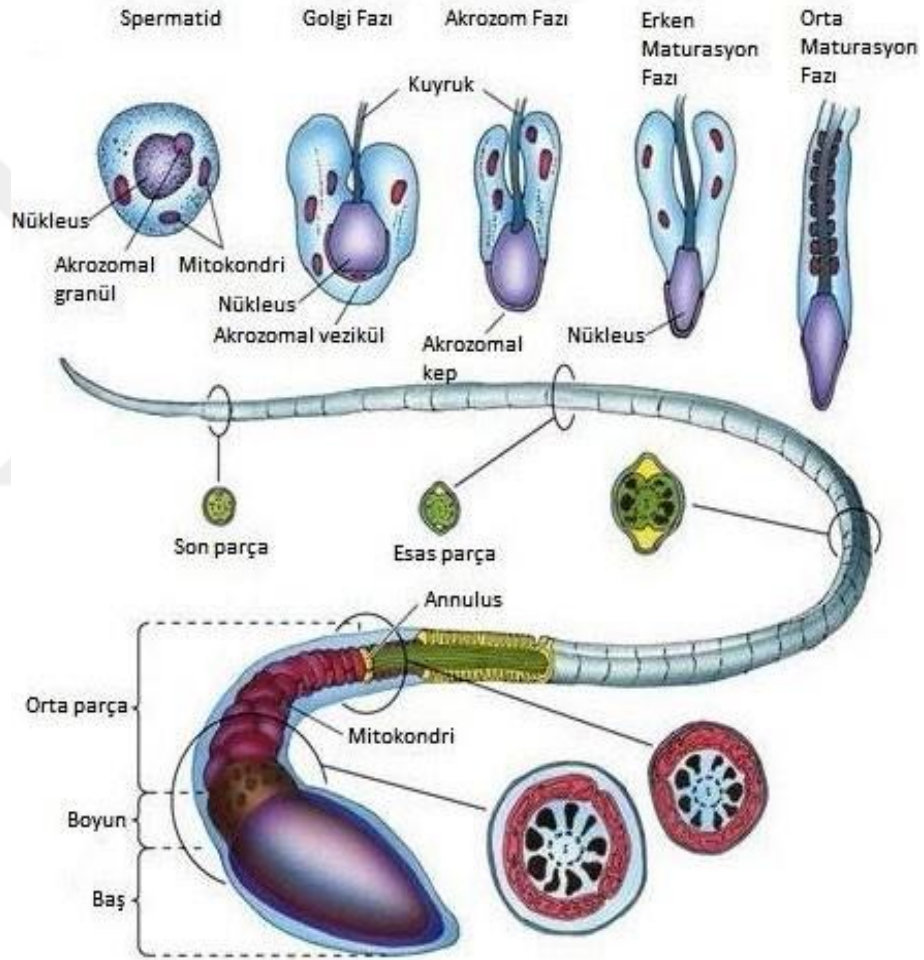
**Akrozomal Faz:** Bu fazda nükleus uzar ve daha yoğun hale dönüşerek, belirgin şekil değişikliğine uğrayan spermatidin baş kısmı sertoli hücresinin içine gömülerek bazal laminaya doğru yönelir. Sentriollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal kısmı çevresinde toplanarak orta parçayı oluşturur. Bu bölge spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur <sup>18,19</sup>.

**Maturasyon Fazi:** Spermin şekillendiği fazdır. Geride kalan artık sitoplazma, sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine salınırlar. Spermatozoonlar, epididimise sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen testis sıvısı ile aktarılır. Bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla ilişkili androjen bağlayıcı proteinleri içerir <sup>18,19</sup> (Şekil 6.).

#### 2.3.4. Spermin yapısı

Spermatogenez sonunda meydana gelen olgun sperm hücreleri, ortalama 60 µm uzunluğundadır. Baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç parçadan oluşur. Plazmalemma ile çevrili baş kısmı, 4 - 5 µm uzunluğunda, 2.5 - 3.5 µm genişliğinde olup 1 µm kalınlığına sahiptir. Akrozom kısmı ile nükleusu içerir. Akrozom, nükleusun ön yarısını örter ve hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler ise daha sonra, oositi saran korona radyata ve zona pellusidadan spermin geçişini kolaylaştırmak için fertilizasyon sırasında salınırlar.

Distal sentriyol, bağlantı parçasında yer alır, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar. Kuyruk ise; orta, esas ve son parça olmak üzere 3 bölüm olarak adlandırılır<sup>18,19,20</sup> (Şekil 6.). Sarmal olarak bulunan mitokondriyonların oluşturduğu kısım olan orta parça, 9 + 2 mikrotübüler yapıdaki aksonem ile yoğun dış fibrilleri içerir. Kuyruğun en uzun kısmı olan esas parça, yedi dış yoğun fibril ile sarılı bir aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Son parça ise sadece aksonemi içerir<sup>20,21</sup>.



Şekil 7. Spermiyogenez<sup>20</sup>.

### 2.3.5. Testis içi kanallar

Testis içi genital kanallar; tubuli rekti, rete testis ve duktuli eferentestir. Bu kanallar, Seminifer tübüllerden gelen sıvıyı ve spermatozoonları duktus epididimise taşır.

- Tubuli rekti: Başlangıcı sertoli hücrelerinden oluşur. Sonra sıkı bağ dokusu ile sarılı prizmatik epitele dönüşür. Tubuli rekti 10 - 20 adet rete testisle devam eder <sup>18,19</sup>.
- Rete testis: Tunika albugenianın kalınlaşmasıyla oluşan mediastinum içinde yer alır. Prizmatik epitel ile döşeli anastomozlaşan kanallar sistemidir <sup>18,19</sup>.
- Duktuli eferentes: Rete testisten epididimise uzanan 10 – 20 adet kanaldır. Epiteli silyalı ve silyasız kübik hücrelerden oluşur ve tarak şeklindedir. Bazal hücreler lümene ulaşmaz ve kök hücrelerdir. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu absorbe eder. Silyalı hücreler epididimise doğru hareketi sağlar. Bazal laminanın altında ise ince bir sirküler kas tabakası vardır <sup>18,19,20,21</sup>.

### 2.3.6. Epididimis histolojisi

Epididimis, testisin üst ve arka yüzeyleri boyunca uzanan hilal şeklinde, uzunluğu yaklaşık 7.5 cm kadar, kanalı ise 4 - 6 cm uzunluğunda bir tüptür. Epididimis kanalı; yuvarlak bazal hücreler ve sterosilyalara sahip yalancı çok katlı silindirik epitel ile döşelidir. Bu hücreler peristaltik kasılmalarıyla spermin kanallar boyunca ilerlemesini sağlayan düz kas hücreleri ve kapiller damarlardan zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bazal lamina üzerine oturur. Epididimis; kaput (baş), korpus (gövde) ve kauda (kuyruk) olarak üç kısma ayrılır. Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermler, duktus epididimis boyunca geçişleri sırasında motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanarak olgun hale gelirler <sup>18,19,20,21</sup>. Epitel hücrelerinin yüzeyleri sterosilya adı verilen, uzun dallanmış düzensiz mikrovilluslar ile kaplanmıştır. Duktus epididimis epiteli spermatogenezde oluşan artık cisimciklerin ortadan kaldırılmasına ve sindirilmesine katılır <sup>18,19</sup>. Duktus epididimis iki tip hücre içermektedir:

**Esas Hücreler**; lümene doğru uzanan, sterosilyalara sahip, uzun prizmatik hücrelerdir.

**Bazal Hücreler**; bazal laminanın üzerinde bulunan, küçük yuvarlak hücrelerdir. Bu hücreler, kanal epitelinin kök hücreleridir <sup>21,22</sup>.

### 2.4. Testis Fizyolojisi

Testisler vücudun dışında skrotum denilen torba şeklindeki yapının içinde, endokrin ve ekzokrin olarak görev alan bir çift bezdir. Endokrin görevi testosteron hormonu üretimi iken; ekzokrin görevi erkek gamet hücresi olan spermatozoonu oluşturmaktır <sup>23,24</sup>.

Embriyonal dönemin başlangıcında vücut boşluğunda bulunan testisler, doğumdan önce yaklaşık 7-8. aylarda skrotuma inerler ve yaşlandıkça hacmi azalır. Testislerin karın boşluğunun dışında bulunmasının nedeni spermatogenez için daha düşük sıcaklık değerinin (32–35 °C) gerekli olmasıdır. Skrotum sıcaklığı vücut sıcaklığının yaklaşık 3 - 4°C altındadır. Bu düşük sıcaklığı sağlayan, spermatik arterler ve venler arasındaki zıt akımdır. Sağlanması gereken sıcaklık çok önemlidir çünkü testislerdeki sıcaklık artışı, seminifer tübül hücrelerine zarar vererek spermatogenezini etkileyebilir. Isı dengesini sağlayan diğer mekanizma ise; zengin venöz pleksusu olan pampiniform pleksusun her testiküler arterin etrafını sararak zıt yönlü ısı akımı ile testiküler ısının sürdürülmesinde etkin olmasıdır. Skrotumdan buharlaşma ile uzaklaşan ter de ısı kaybına katkıda bulunur. Skrotumun ince dartos kasının ve spermatik kordonların kremaster kaslarının kasılması veya gevşemesiyle, testislerin vücuda yaklaştırılması veya uzaklaştırılması ayarlanarak testis sıcaklığı kontrol altında tutulur <sup>24,25</sup>. Birçok şekilde skrotum, testislere özgü sıcaklığı düşürme mekanizmasında görev yapmaktadır.

Testisler; spermlerin üretiminden, depolanmasından, salgılanmasından ve testosteron üretiminden sorumludur. Testislerin yapısında bulunan seminifer tübüller spermlerin üretim yapıldığı yerdir. Seminifer tübüller bazal membran ve peritübüler hücre tabakası ile çevrilidirler. Peritübüler hücreler, peristaltik hareketten sorumlu hücrelerdir. Bu hücrelerin kasılması spermlerin epididime doğru iletilmesini sağlar <sup>24,25</sup>.

Spermler ilk olarak seminifer tübüllerden epididime geçer, sonra epididim vaz deferense açılır daha sonra ise prostat bezine girmeden hemen önce genişlemeye başlar. Prostatın her iki tarafında yer alan seminal veziküller, ampullanın prostat girişine açılır ve hem ampulle hem de seminal vezikül içerikleri ortak bir ejakülatör kanalla prostat gövdesinden geçerek internal üretraya boşalır <sup>25</sup>.

Spermatogenez hormonların etkisiyle gerçekleşir. Bu hormonlar;

#### **Testosteron:**

Testosteron üretimi adenohipofizden salgılanan Luteinizan hormon (LH) etkisiyle gerçekleşmektedir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değildir. Salgılanması geceleri doksan dakikalık aralıklar şeklinde gerçekleşir.

Testosteronun yükselmesi ise LH salgısını durdurur. Luteinizan hormon dışında spermatogenezin başlatılması ile adenohipofizden salgılanan diğer bir hormon ise Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) dur <sup>24,25</sup>. Leyding hücreleri tarafından Testosteron salınımı yapılır ve spermatogenik hücrelerin gelişmesinde gereklidir. Testosteron testislerin ana androjeni olup spesifik testosteron bağlayıcı globülin ve diğer plazma proteinleri ile kanda taşınır. Erkek üreme organlarının farklılaşmasını başlatarak işlevlerinin devam ettirilmesini ve erkek ikincil cinsiyet karakterlerinin oluşmasını sağlar <sup>24,25</sup>.

### **Folikül Uyarıcı Hormon ( FSH )**

Hipotalamustan salgılanan Gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofizin ön lobundan salgılanan FSH salınımını stimüle eder. Folikül uyarıcı hormon sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin ve aktivini uyarır. FSH ayrıca sertoli hücrelerinden Androjen bağlayıcı protein (ABP)'in salgılanmasını da stimüle ederek, spermatogenez için gerekli olan testosteronun seminifer tübül lümenine taşınmasını sağlar. Spermatogenez östrojen ve progesteronlarla inhibe edilirken testosteron hormonu ile stimüle edilir. Spermatozoonlar epididimiste, testiküler sıvı içinde yer alırlar. Sertoli hücreleri ile rete testiste üretilen testiküler sıvıda (proteinler, steroidler, iyonlar) testosteronla birleşen ABP de bulunur. Androjen bağlayıcı protein testosterona bağlanarak seminifer tübül lümeninde yer alır ve böylece spermatogenez uyarılmış olur <sup>24,25</sup>.

### **İnhibin:**

Sertoli hücrelerinde sentezlenen bir proteindir ve hipofizden FSH salınımını inhibe eder. İnhibin devamlı salınırsa FSH'ı baskılar. Üreme hücresi sayısı azalınca da FSH artar <sup>25</sup>.

### **Luteinleştirici Hormon ( LH ):**

Hipotalamustan salgılanan GnRH hipofizin ön lobundan salgılanan LH'ı uyarır. Luteinizan hormon da leydig hücrelerinde testosteronun sentez ve salınımını uyarır. Luteinizan hormon prolaktin ile birlikte Leydig hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde de görev alır. Prolaktin artışı, Leydig hücrelerinden androjenlerin sentezini azaltarak spermatogenezini zayıflatabilir ve bu da infertiliteye neden olur <sup>24,25</sup>.

Testosteron, Hipotalamo-hipofizer kontrol ile negatif geri bildirimde bulunarak LH sekresyonunu iki yolla baskılar <sup>24,25</sup>.

1. Testosteron; Ön hipofize etki ederek, gonadotropik hücrelerin GnRH'a cevap olarak daha az salgı yapmalarına neden olur <sup>24,25</sup>.
2. Hipotalamusu etkileyerek GnRH nöronlarının salgılanmasını azaltır ve bu da gonadotropinlerin sekresyonunu azaltır <sup>24,25</sup>.

## **2.5. Apoptozis**

Programlanmış hücre ölümü terimi olarak ilk defa 1965 yılında kullanılmış daha sonra ise ilk defa 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından Apoptozis terimi bulunmuştur <sup>26,27</sup>. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile benzer anlamda kullanılan kelimelerdir <sup>27,28</sup>. Apoptozis, hücrede meydana gelen bir dizi morfolojik ve biyokimyasal farklılıklara neden olan hücre ölümü şeklidir <sup>28,29</sup>. Apoptozis süreci sırasında, hücrede birçok morfolojik değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler; sırası ile hücrelerin küçülmesi, büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nüklear piknoz ve parçalanma, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimciklerin oluşumu sürecidir. Nükleozomlar arası DNA yıkımı görülür <sup>28,29</sup>.

Apoptotik cisimcikler fagosite olduklarından dolayı dokularda enflamasyon görülmez. Apoptotik süreçte gözlenen aşamalar şu şekilde meydana gelir <sup>28,29</sup>.

1. Apoptozis'in başlatılması,
2. Hücre içi proteazların aktive edilmesi,
3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler,
4. Fagositoz <sup>28,29</sup>.

### **Apoptozis'in Başlatılması**

Apoptotik sürecin başlamasında, hücre içi ve hücre dışı sebepler ile ölüm sinyalleri oluşur. Bu sinyallere maruz kalan hücrelerde, genetik mekanizma uyarılmış olur ve apoptozis başlar <sup>29</sup>. Hücre dışından gelen sinyaller, hipoksi, ısı - sıcaklık değişimleri, ultraviyole ışınları, antitümör ilaçlar ve zararlı maddelerdir. Dış kaynaklı olan sinyaller DNA'ya zarar vererek apoptozise neden olmaktadır <sup>30</sup>.

### **Hücre içi proteazların aktivasyonu**

Hücre içi veya hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan proteazları aktive eder. Bu proteazlara ise caspaz adı verilir (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases) <sup>29,30</sup>. Bilinen 14 caspaz vardır. Bu caspazlar başlatıcı caspazlar (caspaz 2, caspaz 8, caspaz 9, caspaz 10), öldürücü caspazlar (caspaz 3, caspaz 6, caspaz 7) ve sitokin olgunlaşmasından (caspaz 1, caspaz 4, caspaz 5, caspaz 11, caspaz 12, caspaz 13, caspaz 14) sorumlu caspazlar olmak üzere 3'e ayrılır. Caspaz ailesi, apoptozisin başlatılması ve uygulanmasında önemli göreve sahiptirler <sup>31,32</sup>. Apoptozisde, mitokondri önemli rol oynar. Mitokondrial yol, sitotoksik ajanlar ve oksidatif baskı gibi çeşitli nedenlerle intraselüler ve extraselüler etkiler sonucu aktive olur. Apoptotik sinyaller, mitokondriye ait iç ve dış membranlar arasındaki boşluktan sitoplazmaya doğru sitokrom C salınmasına sebep olur. Sitoplazmaya salınan sitokrom C ise burada apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) tutunur. Apaf-1'e tutunan sitokrom C sitoplazmada apoptozom oluşumuna sebep olur. Meydana gelen apoptozomlar ise, caspazları aktive eder. Caspazların aktivasyonu da sonuç olarak apoptozise neden olur <sup>31,32</sup>.

Caspazlar, sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunmaktadır. Ancak proteolitik parçalanmanın ardından aktif hale gelerek caspaz aktivasyonu başlamış olur. İlk etapta caspazlar mitokondride membran hasarı meydana getirirken bunun sonucu olarak zardaki değişimler hücre iskeleti ve çekirdek değişimine neden olan dejenerasyona sebep olurlar. Caspazlar, sitokrom C'nin prokaspaz zimojenlerini de aktif hale getirmektedir <sup>33</sup>.

### **Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler**

Apoptotik sürecin sonlarına doğru, caspazlar DNA kırılmalarına neden olurlar. Aktin filamanının yıkımına bağlı olarak hücre normal şeklini kaybeder. Hücre su kaybederek büzülür ve ardından hücre yüzeyinde kraterler oluşur. Çekirdek de büzülerek parçalanır. Hücrenin parçalanması ile apoptotik cisimcikler meydana gelir <sup>29</sup>.

## **Fagositoz**

Oluşan apoptotik cisimcikler, çevredeki parankim hücreleri ve makrofajlar tarafından fagosit edilir. Apoptozis sırasında inflamasyon oluşmaz <sup>32</sup>.

### **2.5.1. Testiste apoptozis'in rolü**

Testisteki germ hücre dejenerasyonu gelişimde ve erişkinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Sıçanlarda doğum zamanına kadar testisteki hücrelerin yarısının öldüğü bilinmektedir. Bu dejenerasyon sırasında apoptozis yoluyla ölüm en sık görülen mekanizmadır. Bu mekanizmanın içerisinde Bcl - 2 ailesi, caspazlar, ölüm reseptörleri ve protein 53 (p53) gibi faktörler yer alır. Doku canlılığında ve devamında, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testis dokusunda da görülen bir durumdur <sup>33</sup>.

Spermatogenezde genellikle spermatositler ile spermatogonyumlar fizyolojik hücre ölümüne uğrarlar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlaka gereklidir <sup>34,35</sup>. Kerr tarafından yapılan bir araştırmada testiste sürekli olarak fizyolojik apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir <sup>36</sup>. Testiste, germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik olarak erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır. Doğal bir süreç olarak apoptozisin normal spermatogenez sırasında sperm üretimini % 25 ile % 75 arasında değişen oranda azalttığı bilinmektedir <sup>34,37</sup>.

Erken gelişimsel dönemde başlayan apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır. Azoospermik ya da oligospermik vakalarda androjen eksikliğinde, deneysel kriptorşidizm oluşturulan deney hayvanlarında, ısı artışının olduğu vakalarda, testislerde programlı hücre ölümlerinde artış görülebilir. Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin, hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir <sup>38,39</sup>.

## 2.6. Timokinon

Tıbbi ve ıtri bitkiler yüzyıllar boyunca birçok hastalığın tedavisinin yanı sıra lezzet ve aroma amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Günümüzde de antioksidan etkileri ile birlikte çok geniş spektrumdaki tedavi edici özelliklerinden dolayı eczacılık, gıda endüstrisi ve kozmetik gibi birçok alanda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır <sup>40</sup> .

*Nigella sativa* L., Ranunculacea (Düğün çiçeğigiller) familyasında yer alır, Güney Batı Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'da yetişir. Ülkemizde *Nigella sativa* L. genellikle Afyon, Burdur, Isparta ve Konya yörelerinde yetiştirilen çörek otu olarak bilinen çiçekli yıllık bir bitkidir <sup>41,42</sup>. Dik gövdeli, mızrak şeklinde yapraklara sahip olan çörek otunun hassas çiçekleri genellikle 8 yapraktan oluşur. Siyah meyveleri bol tohumludur ve 3 - 7 adet birleşik folikülden oluşan, her biri birden çok tohum içeren kapsül formundadır. Siyah renkleriyle karakterize bu tohumlar yassı, üç yüzeyli ve huni biçiminde olup 0.2 cm uzunlukta, 0.1 cm genişliktedirler <sup>40,41</sup> (Şekil 7.).



Şekil 8. *Nigella sativa* L. bitkisi ve tohumu <sup>42</sup> .

Tohumları hem baharat olarak hem de geleneksel tıpta farklı şekillerde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır <sup>43</sup>. Orta Doğu ve Uzak Doğu ülkelerinde geleneksel tıpta; astım, öksürük, bronşit ve inflamatuvar hastalıklar gibi ateş, ağrı, baş dönmesi, böbrek ve karaciğer işlev bozukluklarında, sinir sistemi hastalıkları, diyabet, egzema ve mide-bağırsak sistemi problemlerinde, hipertansiyon, kanser de dahil çeşitli semptomların ve hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır <sup>44</sup>. Timokinonun kanser hastalarında kemoterapiyle birlikte tamamlayıcı ve alternatif olarak da kullanılabileceği bildirilmektedir <sup>43</sup> .

Çörek otu tohumunun besin değeri yüksek olup çeşitli aktif kimyasal bileşenler içerir. Çörek otu tohumları, uçucu yağ (% 0.38 - 0.49), sabit yağ (% 30 - 40), protein (% 20 - 30), karbonhidratlar gibi kül, lif ile nem ve saponin içerir <sup>45</sup> (Tablo 1.) . Çörek otu tohumunun kimyasal içeriği, ürünün hasat zamanına, çeşidine ve yetiştirildiği bölgenin iklim özelliklerine göre farklılık gösterir. Mısır yakınlarında yetiştirilen çörek otu tohumu analizinde elde edilen uçucu yağın, 67 bileşik ihtiva ettiği belirlenmiştir. Bu bileşenlerin ise miktarca en önemlilerinin timokinon, p-simen, a-pinen olduğu belirtilmiştir <sup>45</sup>. Çörek otu tohumunun yapısında başlıca doymuş ve doymamış sabit yağlar (% 31 - 35.5), uçucu yağlar (% 0.4 - 0.45), karbonhidratlar (% 33 - 34), proteinler (% 16 - 19.9), amino asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler, mineraller (kalsiyum, çinko, fosfat), ve vitaminler (askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit) bulunmaktadır <sup>46</sup>.

**Tablo 1.** *Nigella sativa* L. tohumunun genel içeriği <sup>45</sup>.

| İÇERİK       | % Bulunan oran (a / a) |
|--------------|------------------------|
| Yağ          | 31-35.5                |
| Protein      | 16-19.9                |
| Karbonhidrat | 33-35                  |
| Lif          | 4.5-6.5                |
| Saponin      | 0.013                  |
| Nem          | 5-7                    |
| Kül          | 3.7-7                  |

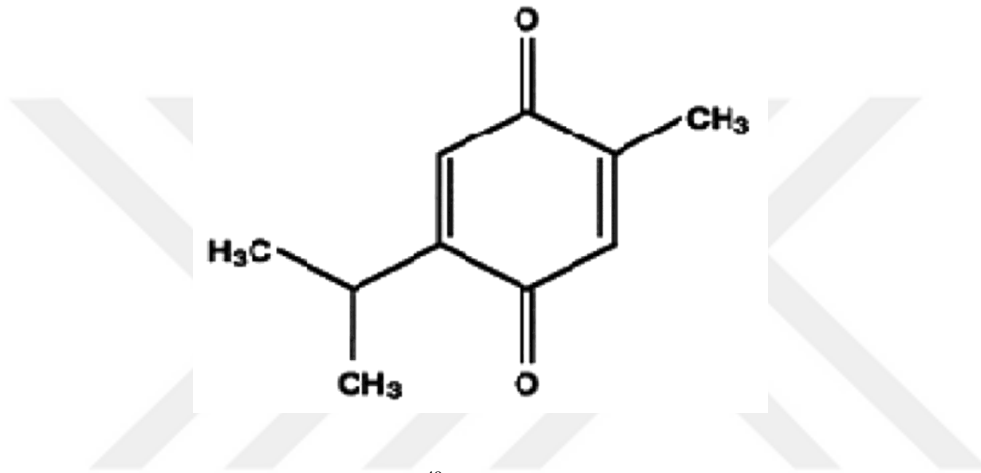
Doymamış yağ asitleri (~% 85); linolenik asit (omega – 6), oleik asit, araşidonik asit, palmitoleik asit ve eikozadienoik asittir. Doymuş yağ asitleri (~% 18); palmitik asit, stearik asit ve miristik asittir <sup>46,47</sup>. Çörek otu tohumundaki uçucu yağların çeşitli farmakolojik aktif kimyasal bileşenleri başlıca timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timoldür, ayrıca p-simen, d-limonen,  $\alpha$  ve  $\beta$ -pinen, trans-anetol, karvakrol ve nigellon da içerir <sup>42,43</sup> ( Tablo 2.).

**Tablo 2.** *Nigella sativa* L. tohumu uçucu yağının kimyasal bileşenleri <sup>48</sup>.

| Uçucu sekonder metabolit                           | % Alan       |
|----------------------------------------------------|--------------|
| $\alpha$ -Tuyen                                    | 5.09         |
| $\alpha$ - Pinen                                   | 1.00         |
| Sabinen                                            | 0.44         |
| $\beta$ -Pinen                                     | 1.31         |
| Terpinolen                                         | 0.56         |
| p-Simen                                            | 27.80        |
| $\alpha$ -Terpinen                                 | 5.23         |
| cis-4-Metoksituyan                                 | 0.44         |
| trans-4-Metoksituyan                               | 3.62         |
| 2E,4Z-Dekadienal                                   | 0.14         |
| Terpinen-4-ol                                      | 0.21         |
| (+)-Dihidrokarvon                                  | 0.58         |
| <b>Timokinon</b>                                   | <b>28.70</b> |
| Karvakrol                                          | 2.44         |
| Asetamid, N-(2-hidroksi-3-pentenil)                | 0.61         |
| Longifolen                                         | 3.24         |
| Timohidrokinon                                     | 2.40         |
| Nonil allil okzalat                                | 0.24         |
| Sulforuz asit, 2-etilhekzil izohekzil ester        | 0.32         |
| 1. 2,3-epoksi-gerianial                            | 0.45         |
| 2-metil hekzanoik asit                             | 0.16         |
| 4-Tridesen                                         | 0.92         |
| Sitronellil n-bütirat                              | 0.88         |
| cis-11,14-Eikosaienoik sit metil ester             | 0.81         |
| 9-Undekenal, 2,10-dimetil                          | 11.54        |
| 2,6,11,15-Tetrametil-hekzadeka-2,8,8,10,14-pentaen | 0.47         |
| 2,4-Oktadienal, (E,E),                             | 0.15         |

### 2.6.1. Timokinonun fizikokimyasal özellikleri

Çörek otu tohumunun farmakolojik etkilerinin birçoğundan, içerdiği kinin bileşenleri, özellikle de timokinon sorumludur <sup>42,43</sup>. Timokinon ilk olarak *Nigella sativa* L.'den 1963 yılında El-Dakhakhany tarafından ekstre edilen monoterpen bir bileşiktir. Molekül formülü  $C_{10}H_{12}O_2$  ve molar ağırlığı 164. 20 g / mol olan timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon), tohumun uçucu yağının en biyoaktif öncü bileşenidir . Enol, keto ve karışık formlardan oluşur (Şekil 8.). Hidrofobik özelliği; biyoyararlanımını ve ilaç formülasyonlarında kullanımını kısıtlamaktadır <sup>49,50</sup>.



Şekil 9. Timokinonun kimyasal yapısı <sup>49</sup>.

Enol ve keto form dahil tautomerik formlarda bulunur. Keto formu büyük kısmını oluşturur (yaklaşık % 90) ve bileşiğin farmakolojik özelliklerinden sorumludur. Timokinon ışığa karşı yüksek duyarlılığa sahiptir ve ışığa maruziyette yıkıma uğrar. Timokinonun artan pH'larda kararlılığı azalır, asidik pH'da ise minimum olsada parçalanma görülür <sup>44</sup>.

### 2.6.2. Timokinonun moleküler etki mekanizmaları

Timokinonun etki mekanizması karmaşıktır. Timokinonun patofizyolojik durumlarda birden çok faktörü hedef aldığı yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda ortaya çıkan moleküler etki mekanizmaları; inflamasyon aracılığı ve oksidatif parametreler, peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler (PPARs), apoptoz, transkripsiyon faktörleri üzerine etkileri şeklinde ortaya çıkmaktadır <sup>50</sup>.

### **2.6.2.1. İnflamasyon araçları üzerine etkisi**

COX-1 ve COX-2, prostanoid yapımında rol alan sikloosigenaz (COX) enzim tipidir. Akciğer, mide, meme ve pankreas gibi birçok kanser çeşitinde COX-2'nin fazla ekspresyonu görülen bir durumdur <sup>51</sup>. Bu durum prostaglandinin (PG) anjiyogenezisi up-regüle etmesi ve apoptoza olan direnci arttıracığından yüksek bir öneme sahiptir. COX-2 inhibisyonu sağlıklı diğer dokular üzerinde bazı yan etkilere neden olduğundan; son yıllarda COX-2 inhibisyon mekanizmasıyla kanser koruyuculuğu üzerindeki etkisi ile doğal ürünlere ilgi artmıştır <sup>52,53</sup>. İnflamasyon, siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LO) olmak üzere başlıca iki enzim tarafından düzenlenmektedir. COX yolunda prostaglandinler (PG) sentezlenirken, LO yolunda ise lökotrienler (LT) sentezlenmektedir. Timokinon, hem COX hem de LO yollarını inhibe etmektedir; tromboksan B2 ve LT-B4 olarak adlandırılan eikosanoid üretimi güçlü bir şekilde inhibe edilir <sup>44</sup>. COX - 2, interlökin ( IL ) - 1 beta, TNF –  $\alpha$  sentezini azalttığı ve NF- $\kappa$ B (nükleer faktör kappa beta) inhibisyonuna paralel olarak aktiviteye sahiptir <sup>54</sup>.

### **2.6.2.2. Peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler üzerine etkisi**

Timokinon; PPARs (Peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptör) ligandları, PPARs'lerin aktivasyonu ve reseptör sayısındaki artış sebebi ile çeşitli genetik yolları düzenleyerek potansiyel kanser koruyucu etki göstermiştir. Yapılan son çalışmalarda, Timokinon tedavisi uygulanan meme karsinoma hücrelerinde Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinde azalma, Bax protein ekspresyon düzeyinde artma meydana gelmiştir <sup>55,56,57</sup>. Ayrıca Peroksizom proliferator aktif reseptör  $\gamma$  aktivitesinde artış sağlamasıyla meme kanser hücrelerinde apoptozu tetikler <sup>55</sup>.

### **2.6.2.3. Apoptoz üzerindeki etkisi**

Apoptozis morfolojik olarak özel bir hücre ölüm şekli olup, ekstrensenk ve intrinsenk olmak üzere moleküler mekanizmalarca denetlenirler. Apoptozis ökaryot canlılarda genetik olarak kontrol edilen, gelişim ve doku dengesinde önemli rol sahibi olan normal bir süreçtir. Apoptozis mekanizmalarındaki düzensizlikler aralarında kanserin de bulunduğu çeşitli hastalıklara yol açarlar <sup>57</sup>.

Timokinon, p53 (protein 53), p21 (protein 21) ve p27 (protein 27) gibi tümör supresör genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar <sup>56,58</sup>. Timokinonun p53 kaynaklı yolak aracılığı ile insan kolon kanser hücreleri ve hayvan modellerinde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir <sup>59</sup>. Timokinon tedavisi aynı zamanda DNA'nın parçalanması, caspazın uyarılması ve PARP klevajı (süpürülme) ile apoptozu düzenlemektedir <sup>58</sup>.

#### **2.6.2.4. Transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisi**

Transkripsiyon faktörü Nrf - 2 (nükleer faktör eritroid 2) , glutatyon - S- transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi hücre koruyucu antioksidan enzimlerin işleyişini düzenleyen bir hücre sinyal transkript faktörüdür <sup>60</sup>.

Timokinonun, katalaz (CAT) aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir ve timokinon tedavisinin iskemi-reperfüzyon (I / R) yaralanmasına karşı karaciğer dokusunu koruyabileceği ileri sürülmüştür <sup>61</sup>. Timokinon uygulanan ratlarda bleomisin tetiklediği pulmoner fibroz ilerleyişini azalttığı, alveollerde amfizemi, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, bronş çevresindeki lenfoid hücre sayısındaki artışın hücre aktivasyonunu, akciğer dokusunda NF- $\kappa$ B nin aktivasyonunu önlediği, glutatyon-S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) antioksidan enzim aktivitesini normal değerlere çevirdiği bildirilmiştir <sup>62</sup>.

Streptozotosin (STZ) uygulayarak diyabet modeli oluşturulan ratlarda kalp ve beyindeki oksidatif stres araştırılmış ve diyabetlilerde glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT)'daki belirgin azalma ile oksidatif stresin olduğu, bu düşük seviyelerin çörek otu yağı ile beraber timokinon (TQ) uygulanması ile iyileştirildiği belirtilmektedir <sup>63</sup>.

Bir araştırmada lipopolisakkarit ile indüklenen rat bazofil hücresinde timokinonun TNF $\alpha$  (tümör nekrozu faktörü alfa ) mRNA ekspresyonunu ve protein üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği ve NF- $\kappa$ B (nükleer faktör kappa beta)'nın nükleer transaktivasyonunu modüle ederek proinflamatuvar yanıtları azalttığı belirtilmektedir <sup>64</sup>.

### 2.6.3. Timokinonun farmakolojik etkileri

Yapılan çeşitli araştırmalarda timokinonun farmakolojik olarak birçok farklı aktiviteye sahip olduğu gösterilmektedir.

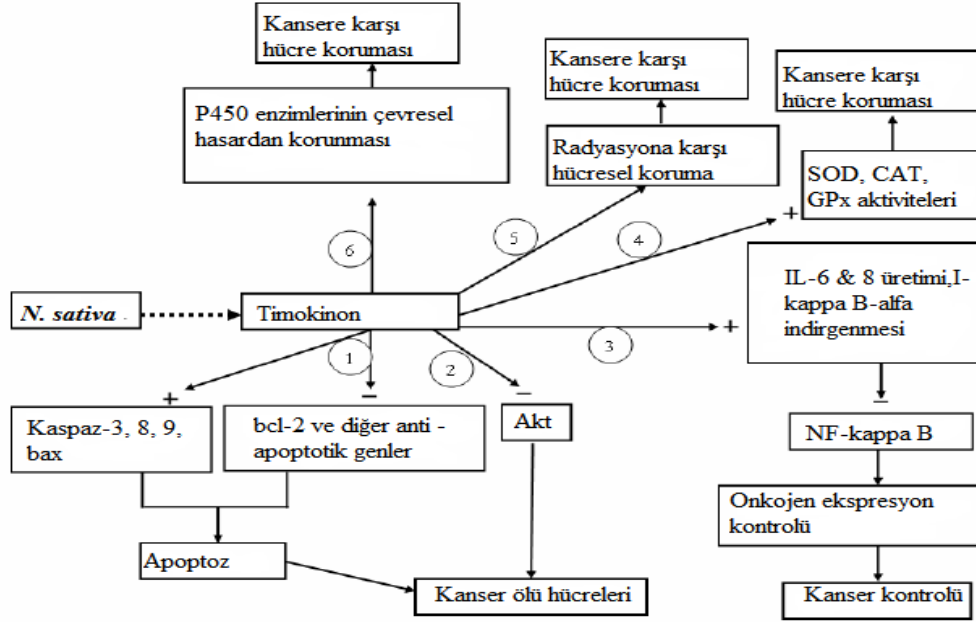
#### 2.6.3.1. Anti-kanserojen etkisi

Timokinon farklı kanser hücrelerinde çeşitli moleküler hedefleri düzenlemektedir. Antikanser tedavisinde çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir. Kanserde oksidatif stres, nitrosatif stres ve inflamasyon başlıca sorumlu olaylardır <sup>65,66,67</sup>. Timokinon hem antioksidan ve antiinflamatuvar etki ile oksidatif stresi azaltarak ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin artırarak ve koruyarak hem de apoptozu indükleyerek kanserleşmeden korur <sup>65,66,67</sup>. Timokinonun NF-κB (Nüklear faktör kappa beta)'yi, Akt (Protein kinaz B) aktivasyonunu ve hücre dışı kinaz sinyal yollarını baskılayarak tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Timokinonun anjiyogenez, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere diğer tümörojenik süreçlerle de bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur <sup>68</sup>. Timokinonun antikanser mekanizmaları:

1. Kanserli dokulardaki apoptotik hücre ölümünü, apoptotik gen ekspresyonunu artırarak ve anti-apoptotik gen ekspresyonunu azaltarak,
2. Kanserli hücrenin sağkalımını engellemek için akt (Protein kinaz B) aktivasyonunu baskılayarak,
3. Onkogenik ekspresyonu kontrol etmek için Nf-Kappa B yolağını deaktive ederek,
4. Antioksidan enzimlerin etkinliğini arttırarak,
5. Kanser tedavisinde sağlıklı hücreleri koruyarak,
6. Timokinon cyp450 enzimlerini tahribattan koruyarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir <sup>69</sup> (Şekil 9.).

Pek çok invivo ve invitro araştırmalar ile çörek otu tohumlarının ve aktif elementlerinin antitümöral etkileri gösterilmiştir. Araştırmalar TQ'nun meme ve yumurtalık adenokarsinomu <sup>70</sup>, kolorektal kanser, osteosarkoma <sup>71</sup>, fibrosarkoma, akciğer karsinomu, prostat kanseri <sup>72</sup> gibi pek çok kanser çeşidinde hücrelerin proliferasyonu üzerine durdurucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Timokinon ve ditimokinon, sitotoksik etkiyi hücre G1 fazında iken apoptozisi tetikleyerek durdurmaktadır. Hücre büyümesinin durdurulması ise p53'ün gen ekspresyonu ile protein ekspresyonunun artırılması ve anti-apoptotik Bcl - 2 proteininin inhibe edilmesi ile sağlanmaktadır.



Şekil 10. Timokinonun kansere karşı mekanizmaları <sup>69</sup>.

Farelerde TQ'nun benzopirenin neden olduğu mide karsinomunu ve kemik iliği hücrelerindeki kromozomal bozuklukları, dejenere hücreleri ve kromozom bozukluklarının frekansını belirgin olarak azalttığı bildirilmiştir <sup>73</sup>. Ek olarak TQ'nun hepatoselüler karsinoma hücrelerini, yoğunluğuna bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı ve hepatoselüler karsinom tedavisinde ümit verici bir antikanser bileşik olduğu belirtilmiştir <sup>74,75</sup>.

### 2.6.3.2. Antiinflamatuvar etkisi

Timokinonun antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu yapılan çeşitli araştırmalarda raporlanmıştır. Siklooksijenazı ve lipooksijenazı engellemesi, ROS oluşumunu ve sitokin üretimini azaltması başlıca antiinflamatuvar etkisine neden olan mekanizmalardır. COX 'da prostaglandinler (PG) sentezlenirken, lipooksigenazda (LO) ise lökotrienler (LT) sentezlenmektedir.

İnflamasyona aracılık eden COX ve LO enzimlerinin arakidonat yollarını inhibe ederek; proinflamatuvar sitokinlerin serbest bırakılmasını, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretilmesini engelleyerek etki gösterdiği bildirilmiştir <sup>76,77</sup> .

Timokinon, deneysel olarak oluşturulan hayvan modellerinde alerjik ensefalomiyelit, kolit ve artriti içeren çeşitli inflamatuvar hastalıklarda antiinflamatuvar etki göstermiştir. Timokinonun koruyucu etkisinin IL-1 $\beta$  ve tümör nekroz faktörü (TNF -  $\alpha$ ) azaltarak, NF- $\kappa$ B 'yi baskılayarak gösterdiği bildirilmiştir <sup>78,79</sup>.

### **2.6.3.3. Antioksidan etkisi**

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronları nedeni ile oldukça kararsız bir yapıya sahiptir. Serbest radikallerin biyolojik yapılarda meydana getirdiği oksitleyici hasarlar, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarla ilişki göstermektedir. Serbest radikaller elektriksel olarak yüklü olup, hücre membranı içinden geçerek hücre bileşikleri olan nükleik asitler, proteinler ve enzimler ile reaksiyona girer ve yıkım oluştururlar <sup>80</sup>. Çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özellik gösteren timokinonun süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren farklı reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olduğu ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini engellediği bildirilmektedir <sup>81</sup>. Timokinonun antioksidan etki potansiyelinin, molekül yapısındaki kinonun redoks özellikleriyle ve fizyolojik bariyerlerden subelüler bölüme kolay geçmesi ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir. Timokinon ile serbest radikallerin azaltılmasının, bu radikallerin DNA'ya hasar verme olasılığı nedeni ile bazı kanserlerin oluşmasını azaltabileceği belirtilmiştir <sup>82</sup>.

### **2.6.4. Timokinonun toksisitesinin ve güvenliliğinin değerlendirilmesi**

Timokinonun antitümör, antiinflamatuvar, analjezik, hipoglisemik, bağışıklık sistemini güçlendirici gibi çeşitli yararlı etkileri ileri sürülmektedir ve güvenli olduğu bildirilmektedir. Timokinon toksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda, toksik etkileri ancak 2 g / kg dozda görülmüştür. Timokinon yüksek dozlarında seçici sitotoksik etki gösterir. Timokinonun insan akciğer fibroblastları, osteoblast, fare böbrek hücreleri ve Vero (Maymun hücrelerinden hazırlanan ve viroloji çalışmalarında kullanılan böbrek hücre hattı) hücreleri gibi sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermeden tümör

hücrelerini etkili bir şekilde yok ettiği bildirilmiştir <sup>45</sup>. Çörek otu tohumu ve yağı az toksik özelliğe sahiptir. Uygulama yolu timokinonun toksisite sonuçlarını etkiler. Timokinonun fazla dozlarının in vivo olarak yapılan araştırmalarda karaciğere zarar verdiği belirtilmektedir <sup>83</sup>. Oral ve dermal yolla maruziyetinde güvenliliğine dair bilgi olmadığından hamilelikte ve emzirme döneminde kullanımı güvenli değildir. Uterus düz kas kasılmasını rat ve kobaylarda konsantrasyona bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür <sup>84</sup>. Timokinonun anti-anjiojenik etkisi sebebi ile hamilelikte kullanımının zararlı olduğu ileri sürülmüştür <sup>85</sup>.

## 2.7. Cisplatin

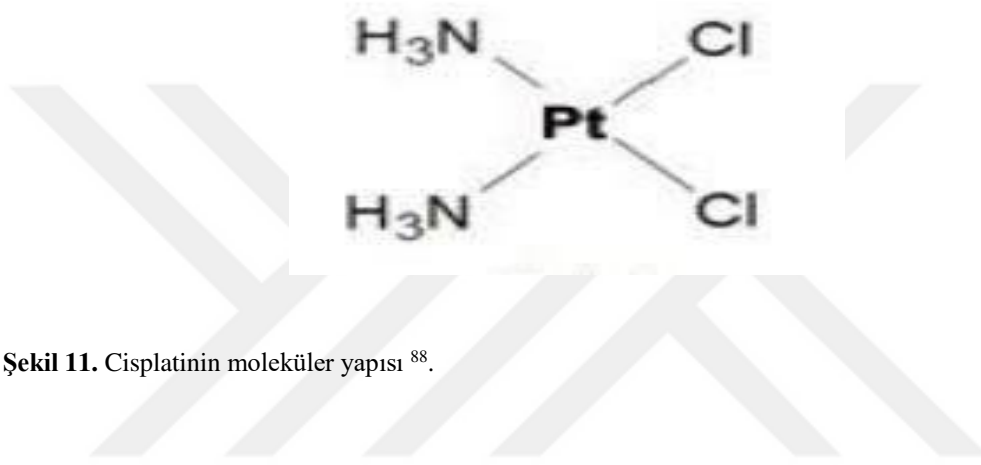
Cisplatin, cis-[ Pt (II)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [ PtCl<sub>2</sub> (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CDDP ], 1845 yılında sentezlenmiş ve 1893 yılında Alfred Werner tarafından ilk olarak CDDP yapısına indirgenmiştir. Cisplatinin diğer adı CDDP olarak da kullanılmaktadır <sup>86</sup>.

Cisplatin bir anti-kanser (antineoplastik veya sitotoksik) kemoterapi ilacıdır. Cisplatin, metastatik, non-seminomatöz germ hücreli karsinom, primer veya ileri evredeki tedaviye cevap vermeyen over kanserleri, ileri evredeki yanıtız mesane kanserleri ve baş-boyunun skuamöz hücreli kanserlerinde endikedir. Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma, nöroblastoma ve sarkoma, mide, akciğer, ösofagus, serviks ve prostat kanserlerinde, miyeloma, melanoma, küçük hücreli akciğer kanserleri ve osteosarkomanın tedavisinde kullanılmaktadır <sup>87,88</sup>.

1971 yılında ilk kez kanser hastalarının tedavisinde uygulanmış ve 1978'de önce Kanada, kısa bir zaman sonra Birleşik Devletler'de ardından ise tüm dünyada klinik kullanımına başlanmıştır. 1978 yılında FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından platinyum grubu taşıyan kemoterapötiklerin kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. Cisplatin (CP) ağır bir metal olan platinyum (kapboplatin ve oksaplatin) Pt içeren güçlü bir antineoplastik ilaçtır. Platinyumda içinde bulunduğu VIII. grup metallerin nötral kompleksleri antitümör etki gücüne sahiptir. Aralarında en etkili olan platinyum (Pt) kompleksleridir ve cisplatin de (CP) bunlardan bir tanesidir. Bu bileşikler seçici ve spesifik olarak hücre çoğalmasını durdururlar. Ayrıca antibakteriyel özellikleri de bulunmaktadır <sup>89,90</sup>.

Kanser tedavisinde geniş bir kullanım alanı olan en güçlü kemoterapi ilaçlarından biri olarak cisplatinin keşfedilmesi, platinyum (II) ve diğer metal içerikli bileşiklerin varlığı antikanser ilaç olarak kullanılmalarına olan ilginin artmasına neden olmuştur <sup>89,90</sup>.

Cisplatin, beyaz ya da sarı kristal bir toz olup suda az çözülürken, dimetilpirimidin ve N, N-dimetilformidte ise tam olarak çözünür. Molekül ağırlığı 301.1 g / mol, yoğunluğu 3.74 g / cm<sup>3</sup> ve kaynama noktası 270 °C dir ve kare oluşturacak biçimde platin iyonuna bağlıdır. İki amin grubu ve iki klor grubundan oluşan nötr bir organik moleküldür <sup>88,89</sup> (Şekil 10.).



Şekil 11. Cisplatinin moleküler yapısı <sup>88</sup>.

### 2.7.1. Cisplatinin farmakokinetik özellikleri

Cisplatin suda çözünebilen ve nükleofilik bir ajandır. Yapısındaki kovalent bağlar sayesinde kolaylıkla su dahil olmak üzere başka moleküllere bağlanabilir. Cisplatinin gastrointestinal kanaldan emilimi çok zayıftır ve bu nedenle sadece paranteral olarak intravenöz veya intraperitonel (i.v. veya i.p.) olarak uygulanır <sup>91</sup>. Cisplatin, plazma proteinine yüksek bağlanma özelliğine sahiptir ve intravenöz infüzyon sonrasında ortalama % 90 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır <sup>92,93</sup>.

Suda çözünmesi kolay olduğundan vücut içinde dağılımı oldukça iyidir; en çok böbrek, karaciğer ve prostatta biriktiği tespit edilmiştir. Anne sütünde bulunabilir ve plasentayı geçebilir. Asit sıvısı ve plevral sıvı gibi boşluklara dağılır. Kan beyin bariyerinden geçişi yavaş, beyin omurilik sıvısında ise çok düşük yoğunluklarda bulunur. Primer atılım yeri böbreklerdir (% 90). Cisplatin böbreklerde, glomerular filtrasyon ve tübüler sekresyon ile temizlenir. Böbreklerdeki cisplatin yoğunluğu, kana göre fazladır, bu da renal parankimal hücrelerde ilacın aktif olarak birikimini göstermektedir.

Platin dokularda 180 güne kadar tespit edilebilir. Cisplatinin yarılanma zamanı 30 dakika iken, kanda oluşan komplekslerinin ömrü 5 günden uzundur <sup>92,94</sup>. Cisplatinin intraselüler transportu açık olmamakla beraber hücreden hücreye değişiklik gösterebilir. Yakın zamanda, kanserli hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda cisplatinin yarısının plazma membranları aracılığı ile pasif difüzyonla, diğer yarısının bilinmeyen taşıyıcılarla alındığı bildirilmiştir <sup>95</sup>.

### **2.7.2. Cisplatinin etki mekanizmaları**

Cisplatinin (CP) antikanser aktivitesi; DNA çift sarmalında, sarmal içi çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini engelleyen bir komplekse dönüşmesinden <sup>96</sup>, yani DNA çift-zincirinde çapraz bağlanma yapmasından ileri gelir. Böylece cisplatin tümör hücresinde DNA biyosentezini baskılar <sup>97</sup>. Cisplatinin etkilediği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar, hücre tarafından tolere edilemezse hücre ölümüne neden olur <sup>98</sup>.

#### **2.7.2.1. Cisplatinin sitotoksik etki mekanizması**

Sitotoksik etki mekanizması; Nükleer DNA'ya bağlanması ve transkripsiyonu ya da DNA replikasyon mekanizmasına etki etmesi ile açıklanmaktadır. Cisplatin, farklı mekanizmalar ile mitokondriyal geçirgenliği artırarak kalsiyum ve O<sub>2</sub> çıkışını artırır. Bununla birlikte ATPaz aktivitesini engeller. Tüm bu olaylar hücre ölümü ile sonuçlanır. Makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunda artış gözlenir ve fibrojenize neden olarak apoptozu tetikler. Aynı apoptotik etki cisplatinin toksisitesinde de rol oynamaktadır <sup>99</sup>.

Cisplatin ilk olarak apoptoz ile hücre ölümüne neden olur ve apoptoz sinyali cisplatin direncinin oluşmasına neden olur. Ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere apoptotik hücre ölüm yolağı bulunur. Ekstrinsik yolak, indüklemiş sinyal kompleksi oluşturmak üzere ligandların TNF- $\alpha$  reseptörüne bağlanması, bunu takiben adaptör molekül aracılığı ile prokaspaz-8'in oligomerizasyonu ile başlar. İntrinsik yolak ise, DNA hasarı gibi nedenlerle hücresel stres ile başlar ve prokaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanan mitokondriden sitokrom-c salınması ile sonuçlanır. Apoptozun, cisplatinin tetiklemeinden mi kaynaklandığı sorusuna halen cevap verilememiştir.

Cisplatin ile tetiklenmiş apoptoz için iki yolak önerilmiştir. Bunlardan birincisi tümör baskılayıcı protein 53 (p53)'ü içerir; diğeri ise protein 73 (p73) proteindir. p53, cisplatin ile indüklenmiş hücre ölümündeki en büyük aracı olarak belirtilmiştir. Protein 53 tümör baskılayıcısı, hücre döngüsünü durdurarak veya DNA hasarı ile onkogen aktivasyonunu aktive ederek hipoksi ile apoptozise neden olur <sup>100</sup>.

Cisplatin, tümörlerin pek çok çeşidinde kullanılabilen, etkin bir kemoterapötik olmasına karşın, başta nefrotoksisite olmak üzere, hepatotoksisite, miyelosupresyon, nörotoksisite, geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doz bağımlı belirgin yan etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır <sup>101</sup>. Cisplatin ile kanser tedavisinde klinik bakımdan önemli olan, yan etkilere karşı korunmanın sağlanmasıdır. Cisplatin, tümör nekroz alfa'nın (TNF -  $\alpha$ ) ekspresyonunu artırır ve TNF-  $\alpha$  hücrede inflamasyona neden olarak apoptozisi tetikler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS ) üretimine katkıda bulunur <sup>102</sup>.

#### **2.7.2.2. Cisplatinin üreme sistemine etkisi**

Alkilleyici ajan olan Cisplatin, DNA'da iç ve dış zincirlere çapraz bağlanır. Normal yapısı bozularak bükülmüş DNA zinciri anlamına gelen 'adduct' formları oluşturur. Bu mekanizma boyunca spermiler etkilenir ve testis yapısı zarar görür. Cisplatin, spermin kromatin bütünlüğünü de bozmaktadır <sup>103,104</sup>. Daha önceki çalışmalarda yetişkin kemirgenlerde, CP tarafından üreme organında spermatogenezde ve steroidogenezde hasar oluşturduğu rapor edilmiştir <sup>105</sup>. Cisplatin germ hücrelerinde nükleik asit sentezini inhibe etmekte ve farklı aşamalarındaki spermatogenik hücrelerin ölümüne neden olmakta, sertoli hücre morfolojisini etkileyerek, leydig hücre fonksiyonlarına ve sperm üretimine zarar verebilmektedir. Bu yüzden intratestiküler testosteron ve serum seviyesi azalmaktadır. Spermatogonyumların kendilerini yenileme özelliği bulunur. Bu yüzden yetişkin hastaların %50 - 80'i özellikle cisplatin tedavisinden sonra iki ile beş yıl içerisinde tekrar fertil hale gelebilmektedir. Spermatogenezisin düzelmesi, sertoli hücresi ve tip A spermatogonyumlardan kaynaklanan hasar derecesine göre değişebilir <sup>106</sup>.

Cisplatin, hücreler üzerinde oldukça etkili bir ilaçtır. Cisplatine maruz kalan 15 - 35 yaşlarındaki erkeklerin testislerinde spermatogenezini durdurma, infertilite gibi geri dönüşü olmayan ciddi hasarlara sebep olmaktadır.

Cisplatin uygulaması üreme organlarının ağırlıklarının azalmasına, sperm kalitesinde ve testosteron salgılanmasının inhibisyonuna yol açmaktadır. Ayrıca Cisplatin testiste sperm konsantrasyonu ve sperm hareketliliğinin azalmasına, toplam anormal sperm sayısı ve anormal başlı sperm yüzdesinin artmasına neden olmaktadır <sup>107,108</sup>. Cisplatin testiste dejenerasyona, nekroza ve intersitiyal ödeme de neden olmaktadır <sup>109</sup>.Yapılan bir araştırmada CP'in sertoli hücrelerinin arasında bulunan zonula okludens tipi bağlantı komplekslerini etkilediği belirlenmiştir <sup>110</sup>.



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmamız, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2018 / 5 / 4 nolu karar ile onay alınarak (Bkz: Ek - 1) Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülmüştür. Ayrıca Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019 . 04. 01. 904 proje numarası ile desteklenmiştir.

#### **3.1. Deney Hayvanları**

Deney hayvanları Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni alındıktan sonra, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Laboratuarda 22 - 25 °C oda ısısında, 60 ± 5 % nem ve 12:12 saatlik aydınlık / karanlık döngüsünde optimal değerlerde tutulan, havalandırma ve iyi hijyen şartlarında, gıda ve suya serbest erişime sahip olan, 2 - 3 aylık ve 350 - 400 gr ağırlığında 29 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar rastgele 5 gruba ayrıldı. Kullanılan ratlar Kontrol ve Sham Kontrol gruplarına 4'er, Cisplatin , Cisplatin + Timokinon ve Timokinon gruplarına ise 7'şerli olarak dağıtıldı.

#### **3.2. Maddeler ve Dozlar**

Çalışmada, Cisplatin 1.5 mg / kg intraperitoneal ( i.p.) olarak uygulandı. Mısır yağı + Timokinon 50 mg / kg / gün dozunda gavajla 10 gün boyunca uygulandı. Anestezik olarak ketamin 90 mg / kg / xylazine 10 mg / kg intraperitoneal ( i.p.) olarak uygulandı. (Timokinon lot numarası: 8-SYQ-135-1. Cisplatin 10 mg / 20 ml Koçak Farma. Antikor Cleaved Caspase - 3 lot numarası: 2344628).

#### **3.3. Cerrahi Prosedür**

Tüm gruplarda, her bir hayvan anestezide alındıktan sonra testislere ve epididimise, skrotum katman katman kesilerek ulaşıldı. Daha sonra testis ve epididimi dikkatlice çıkarıldı.

### 3.4. Deney Grupları, Maddeler ve Veriliş Yolları

29 adet Wistar albino rat rastgele 5 gruba ayrıldı. Gruplar,

- **1.grup** Kontrol grubu (n = 4) , olarak belirlendi.
- **2.grup** Kontrol Sham grubu olarak belirlendi (n = 4), 10 gün boyunca gavajla mısır yağı (500 µl) verildi.
- **3.grup** Cisplatin olarak belirlendi. Cisplatin (1.5 mg / kg / gün) intraperitoneal yolla 3, 5 ve 7. günlerde birer doz olarak uygulandı ( n = 7, cisplatin: 1.5 mg / kg / gün ).
- **4.grup** Timokinon + Cisplatin olarak belirlendi. Gavaj yolu ile mısır yağı (500 µl ) + timokinon (50 mg / kg / gün) ve cisplatin (1.5 mg / kg / gün) intraperitoneal olarak uygulandı (n = 7, timokinon: 50 mg / kg / gün; cisplatin: 1.5 mg / kg / gün). Timokinon + Cisplatin grubuna 3, 5 ve 7. günlerde birer doz uygulandı.
- **5.grup** Timokinon grubu olarak belirlendi (n = 7), timokinon mısır yağı ile 10 gün boyunca gavajla (timokinon (50 mg / kg/ gün) + mısır yağı (500 µl)) verildi ( Tablo 3.).

**Tablo 3.** Deney grupları, maddeler ve veriliş yolları.

| GRUP NO | GRUP ADI                 | VERİLİN MADDE                                                                  | VERİLEN MİKTAR                                      | HAYVAN SAYISI |
|---------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|
| 1       | Kontrol                  | Salin (10 gün)                                                                 | 1 ml / kg                                           | 4             |
| 2       | Sham                     | Mısır yağı (10gün)                                                             | 500 µl                                              | 4             |
| 3       | Cisplatin                | Cisplatin ( 1.5 mg/ kg/gün)<br>(3,5 ve 7 günler)                               | 1.5 mg / kg/ gün                                    | 7             |
| 4       | Cisplatin +<br>Timokinon | Cisplatin (1.5 mg /kg/gün)+<br>Timokinon (50 mg /kg /gün)<br>(3,5 ve 7 günler) | 1.5 mg / kg/ gün<br>Ve<br>500 µl + 50<br>mg/kg /gün | 7             |
| 5       | Timokinon                | Mısır yağı ( 500 µl ) +<br>Timokinon (50 mg / kg/gün)<br>(10 gün )             | 500 µl + 50<br>mg/kg / gün                          | 7             |

Gruplara ayrılan hayvanlara 10 gün boyunca 08.00 - 12.00 saatleri arasında Tablo 3’de belirtilen maddeler uygulandı. 10 gün sonunda ratlar 90 mg / kg ketamin / 10 mg / kg

xylazine enjeksiyonu ile anesteziye alındı. Enjeksiyondan sonra testisler ve epididimis dokuları dikkatli bir şekilde çıkarıldı, tartıldı, boyutları, rengi, dokusu gözlemlendi ve önceden 37°C'ye ısıtılmış 1 ml'lik % 0.9 izotonik çözeltisine daldırıldı. Kauda epididim, 1 ml % 0.9 izotonik içinde tiftiklenerek parçalandı. Böylece kauda epididimdeki spermier açığa çıkarıldı ve homojen hale getirildi. Lam üzerine 10 µl'lik bir sperm süspansiyon örneğı eklendi ve Makler Sayım Kamarası altında sperm sayısı analiz edildi. Sperm yayması hazırlandı. Testisler fiksasyon için bouin solüsyonuna konuldu.

### 3.5. Işık Mikroskopik İnceleme

Uygulama prosedürü aşağıda belirtilen sırayla yapıldı.

- a. Dokular bouin içinde yaklaşık 24 saat fikse edildi.
- b. Kasetleme işlemi yapıldı. Her bir doku kendi grubuna özgü şekilde kasetlendi.

Bu işlemlerden sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

1. % 70'lik etil alkolde 15 dakika
2. % 80'lik etil alkolde 15 dakika
3. % 90'lik etil alkolde 30 dakika
4. % 90'lık etil alkolde 30 dakika
5. % 96'lık etil alkolde 30 dakika
6. % 96'lık etil alkolde 30 dakika
7. % 96'lık etil alkolde 45 dakika bekletildi.
8. Asetonda 45 dakika bekletildi.
9. Ksilende 30 dakika bekletildi. Böylece dealkolizasyon ve dokuların şeffaflaştırılması sağlanmış oldu. Bu aşamadan sonra dokular etüvdeki sıvı parafin içine alındı.
10. Parafin aşaması: Dokular 75 °C sıcaklıktaki etüv içerisindeki sıvı parafin içinde 60 dakika bekletildi.
11. Döküm aşaması: Dokular etüv içerisindeki parafinde bekletildikten sonra içinde parafin bulunan metal gömme kaplarının içine yerleştirildi ve sertleşmesi için soğumaya bırakıldı. Böylece dokularımız parafin blok haline getirildi.

Parafine gömülü doku blokları mikrotom ile kesit almak için hazırlandı. Bloklar Leica RM mikrotom cihazına yerleştirildi ve 4 - 5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Bu kesitler ilk önce sıcak su havuzuna alınarak düzleştirildi, daha sonra lam üzerine alınarak boyamaya hazır hale getirildi. Lam üzerine alınan bu dokuların bir kısmı genel histolojik değerlendirme için Hematoksilen - Eozin (HE), bir kısmı da Gomori -Trikrom ve Periyodik asit schiff (PAS) boyası ile boyandı. Ayrıca Cleaved Caspase - 3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama yapıldı.

### **3.5.1. Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü**

Normal lamlara alınan kesitler rutin inceleme için Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile boyandı. Boyama öncesi kesitler etüv içerisinde 75°C'de 45 dakika bekletildi. Lamlar ilk olarak ksilende 15 dakika 2. ksilende ise 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre bitiminde lamlar sırayla % 96'lık etil alkol, % 80'lik etil alkol ve % 70'lik etil alkollerden 10'ar dip geçirildikten sonra çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra Harris hematoksilende lamlar 2 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda çeşme suyu olan kapta 10 defa daldırılarak yıkandı. Bu aşamadan sonra asit alkole 2 defa daldırılıp daha sonra tekrar çeşme suyunda yıkandı. Yıkanan lamlar amonyaklı suya 2 defa daldırılıp tekrar çeşme suyunda yıkandı. Yıkanan lamlar daha sonra % 70'lik alkole 10 defa daldırıldı ve daha sonra alkolik eozin boyasına alınıp burada 30 saniye bekletildi. Eozin boyasında bekleyen lamlar daha sonra çeşme suyunda yıkandı. Yıkanan lamlar sırayla % 70'lik etil alkol, % 80'lik etil alkol ve % 96'lık etil alkollere 10'ar defa daldırıldıktan sonra 75°C sıcaklıktaki etüvde 2 dakika bekletilip kurumaları sağlandı ve daha sonra ksilende 10 dakika bekletildikten sonra lamların üzerleri entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **3.5.2. Gomori-Trikrom boyama prosedürü**

Boyama öncesi kesitler etüv içerisinde 45 dakika 75°C'lik etüvde bekletildi. Lamlar ilk olarak 30 dakika ksilende bekletildi. Daha sonra lamlar sıra ile sırayla % 96'lık etil alkol, % 80'lik etil alkol ve % 70'lik etil alkollere 10'ar defa daldırılarak hidrate edildi. Sonra çeşme suyunda yıkandı. Lamlar Boin solüsyonunda etüvde 75°C'de 30 dakika bekletildi. Üç ayrı kapta bol çeşme suyunda 10'ar defa daldırılarak yıkandı. Daha sonra lamlar Haris Hemoksilende 1 dk tutuldu. 3 ayrı kapta bol çeşme suyunda 10'ar defa daldırılarak yıkandı.

Daha sonra trikrom solüsyonunda alınıp burada 45 dakika bekletildi. % 0.5'lik asetik asitle diferansiyel edildi. Lamlar bol çeşme suyunda 10'ar defa daldırılarak yıkandı. Yıkanan lamlar % 70'lik etil alkol , % 80'lik etil alkol ve % 96'lık etil alkollerden 10'ar defa daldırılarak dehidrate edildi. Lamlar 75°C'lik etüvde 2 dakika bekletilerek kurutuldu. Kurutulan lamlar 10 dakika ksilenle bekletildi. Daha sonra pastör pipeti ile entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **3.5.3. Periyodik Asit Schiff boyama prosedürü ( PAS )**

İlk olarak lamlar 75°C'lik etüvde 40 dakika bekletildi. Daha sonra lamlar 2 farklı kaptaki ksilenlerde 15'er dakika bekletildi. Sırayla % 96'lık etil alkol, % 80'lik etil alkol ve % 70'lik etil alkollerden 10'ar defa daldırılarak hidrate edildi. Sonra 3 ayrı kapta çeşme suyunda yıkandı. Yıkanan lamlar tekrar distile su ile yıkandı. Yıkanan lamlar schiff bazında 10 dakika bekletildi. Lamlar akan çeşme suyunda 10 dakika yıkandı. Makroskopik görüntüsü pembeye dönen kesitler Harris hematoksilende 5 dakika bekletildi. Lamlar bol çeşme suyunda 10'ar defa daldırılarak yıkandı. Yıkanan lamlar % 70'lik etil alkol, % 80'lik etil alkol ve % 96'lık etil alkollerden 10'ar defa daldırılarak dehidrate edildi. Lamlar 75°C'lik etüvde 2 dakika bekletilerek kurutuldu. Kurutulan lamlar 10 dakika ksilenle bekletildi. Daha sonra pastör pipeti ile entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

## **3.6. İmmünohistokimya Protokolü**

### **3.6.1. İmmünohistokimyasal boyama aşamaları**

1. Bir gece önceden 56°C'lik etüvde bekletilen kesitler ertesi sabah deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildi. Her birinde 5 dakika olmak şartı ile % 100, % 90, % 80 ve % 70'lik etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.
2. Lamlar 7 dakika ile distile suda çalkalandı.
3. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna (pH: 6.0) konularak mikrodalga fırında 4 ve 3'er dakika 750 Watt'ta kaynatıldıktan sonra 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı.

- Ardından fosfat tamponlu tuz tamponunda (PBS; pH: 7.2 - 7.4) 2 x 5 dakika yıkandı.
4. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi sebebi ile kesitler % 3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi.
  5. 3 x 5 dakika PBS ile yıkandı.
  6. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle (Pap-pen) çizildi.
  7. Kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi.
  8. Serumun fazlası alınarak kesitler, Cleaved Caspase - 3 antikoruna ile 1:100 dilüsyonda + 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun izotip kontrol uygulandı.
  9. Ertesi gün kesitler PBS ile 3 x 5'er dakika yıkandı. Daha sonra sırasıyla, 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor ve 20 dakika HRP - konjuge streptavidin kompleksi ile oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 x 5'er dakika yıkama yapıldı.
  10. Sinyalleri geliştirmek için dokular 5 dakika Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni ile muamele edildi ve musluk suyunda yıkandı.
  11. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
  12. Akan suda yıkanan kesitler her birinde 10 dip olmak kaydıyla % 70, % 80, % 90'lık etil alkol serilerinden geçirildi.
  13. % 100'lük etil alkolde 4 dakika tutularak dehidrate edildi.
  14. Her iki ksilolde 10'ar dakika bekletildi.
  15. Lamlar entellan kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

#### **3.6.1.1. PBS hazırlanışı**

2.85 gr di sodyum hidrojen fosfat.

16 gr sodyum klorür.

0.8 gr potasyum dihidrofosfat .

2 litre dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. (PH: 7.2 - 7.4)

#### **3.6.1.2. 0.1 M Sitrat tamponu hazırlanışı**

2.10 gr Sitrik Asit ve 900 ml dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. NaOH (sodyum hidroksit) ile ph: 6' ya ayarlandı.

#### **3.6.1.3.1. molar NaOH (sodyum hidroksit ) hazırlanışı**

8 gr sodyum hidroksit ve 100 ml dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı.

#### **3.6.1.4. % 3 Hidrojen Peroksit hazırlanışı**

6 ml hidrojen peroksit ve 64 ml metanol ile hazırlandı.

### **3.7. Spermiyogram**

Ratlar anesteziye alındıktan sonra testis ve epididimis dokuları dikkatli bir şekilde çıkarıldı, tartıldı, boyutları, rengi, dokusu gözlemlendi ve önceden 37°C'ye ısıtılmış 1 ml'lik normal tuzlu su çözeltisine daldırıldı. Epididim, spermin çözelti içerisine bırakılması için parçalar halinde kesildi. 1 cc izotonik ile küçük doku parçaları sperm solüsyonu elde edildikten sonra toplandı. Homojen hale getirildi. Lam üzerine 10 µl'lik bir sperm süspansiyon örneği eklenerek ve Makler Sayım Kamarası altında sperm sayımı yapıldı. Sperm hareketlerine göre;

- a) İleri hareketli
- b) Yavaş hareketli
- c) Yerde hareketli
- d) Hareketsiz olmak üzere sınıflandırıldı.

### **3.8. Sperm Boyaması**

Hazırlanan sperm yaymaları daha sonra metanol ile fiske edilip hematoksilin - eozin ile boyandı. Daha sonra lamaların üzerleri entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Daha sonra bu lameller mikroskop altında 100 lük objektifte incelenerek grupların sperm morfolojileri değerlendirildi.

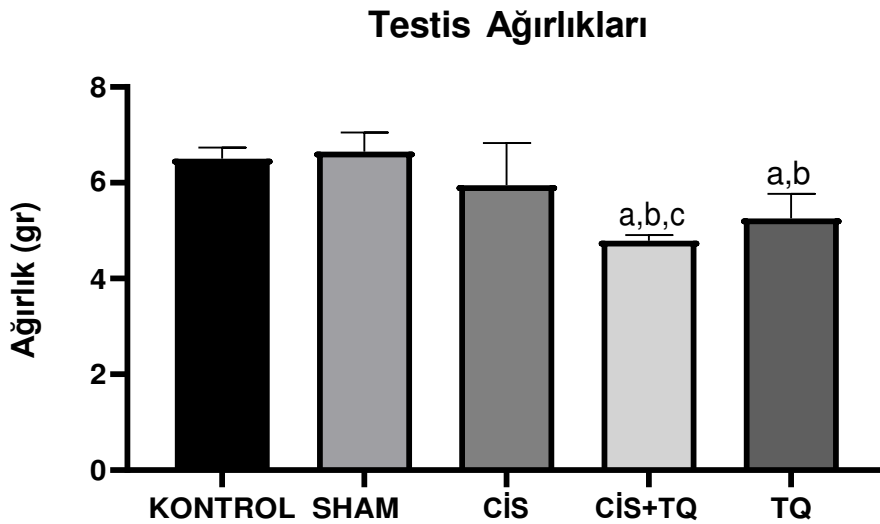
## 4. BULGULAR

### 4.1. İstatistiksel Bulgular

Apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla Cleaved Caspase - 3 immün işaretleme yapılan testis dokularında, apoptotik hücreler koyu kahverengi olarak gözlemlendi ve her grup için istatistiksel analiz yapıldı. Tüm gruplardaki hayvanların, sperm sayısı indeksi, testis ağırlık indeksi, immünreaksiyonunun istatistiksel olarak değerlendirmesinde GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden değerlerin karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA ve gruplar arası farklılıkta mixed-effect analysis testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi ise  $p < 0.05$  olarak seçildi.

#### 4.1.1. Testis ağırlığına ait bulgular

Sakrifiye işlemi sonrası tüm gruplarda bulunan deneklere ait testis dokularının ağırlıkları hasas terazide ölçüldü ve kayıt edildi. Testis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Timokinon ve Timokinon + Cisplatin gruplarında diğer gruplara göre anlamlı fark bulundu. Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı.



**Şekil 11.** Kontrol ve deney gruplarına ait testis ağırlık değerlerinin grafiği. a kontrol grubuna göre, b sham grubuna göre, c cisplatin grubuna göre, timokinon ve timokinon + cisplatin gruplarının istatistiksel anlamlılığı görülmektedir. Diğer gruplar arasında bir anlamlı fark bulunamadı ( $p < 0.05$ ).

## 4.2.Histolojik Değerlendirme

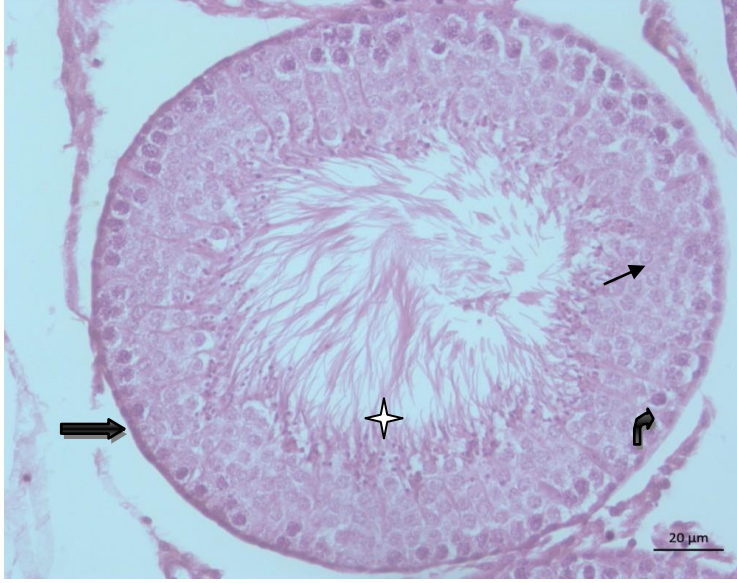
Tüm gruplardaki ratların testis kesitleri hematoxilen-eozin, gomori trikrom ve periyodik acıd schiff ile boyandı. Cisplatine maruziyet sonucunda, testiste meydana gelen histopatolojik değişikliklere karşı, timokinonun etkilerini göstermek için rat testisleri aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi;

- Dökülme (germ hücrelerinin seminifer epitelden ayrılması),
- Ayrılma (spermatosit hücre kümesinin seminifer epitelden kopması),
- Vakuolizasyon (seminifer tübüller içinde boşluklar oluşması) <sup>111</sup>.

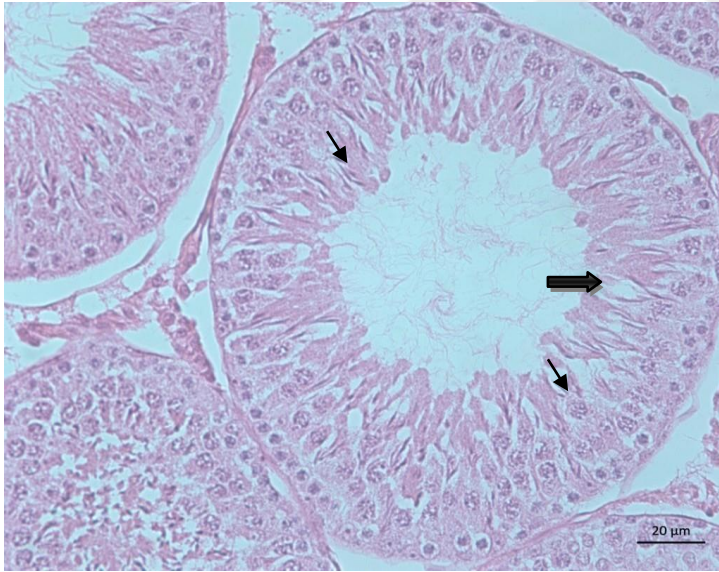
**Kontol grubu bulguları:** Seminifer tübüllerin epitelinde, aktif spermatogenezin bir göstergesi olarak düzenli dizilim sağlayan germinal hücreler tanımlandı. Seminifer tübüller spermatogenezin farklı aşamasına göre sırasıyla bazale yakın yerleşimli spermatogonyumları, mitozu ile çoğalan spermatidleri ve lümene atılmış spermleri içermekteydi.

**Cisplatin grubu bulguları:** İntraperitoneal olarak 3, 5 ve 7. Günlerde 1.5 mg / kg / gün cisplatin uygulandıktan sonra 10. günde sakrifiye edilen ratların testis kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde, ince tunika albuginea ile çevrili testislerin farklı çap ve şekillerde hasarlı tübüllerinin varlığı gözlemlendi. Hasarlanmış tübüllerin duvarında, germinal hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları sonucu meydana gelen hücre kayıpları nedeni ile yer yer vakuolizasyon olduğu görüldü.

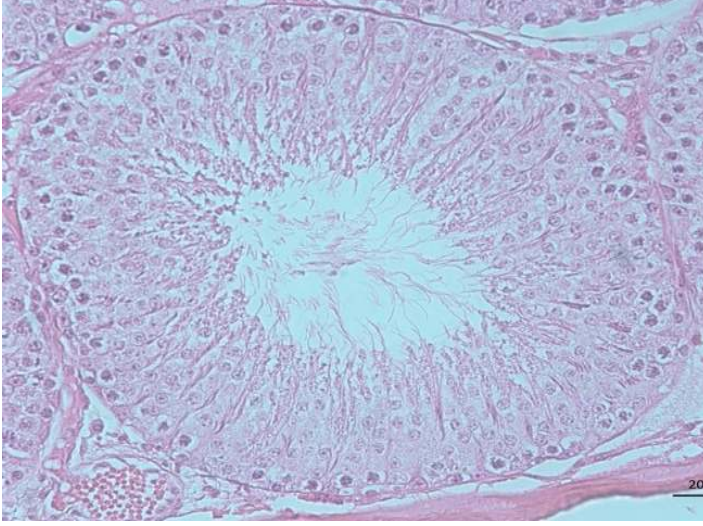
**Timokinon + Cisplatin grubu bulguları:** Alınan testis kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde, seminifer tübüllerde cisplatin grubuna kıyasla ayrılma ve dökülmelerin neden olduğu germinal hücre kayıplarına bağlı olarak görülen seminifer epiteldeki boşluk ve ayrılmalar ile lümende gözlenen hücresel döküntülerin azaldığı gözlemlendi.



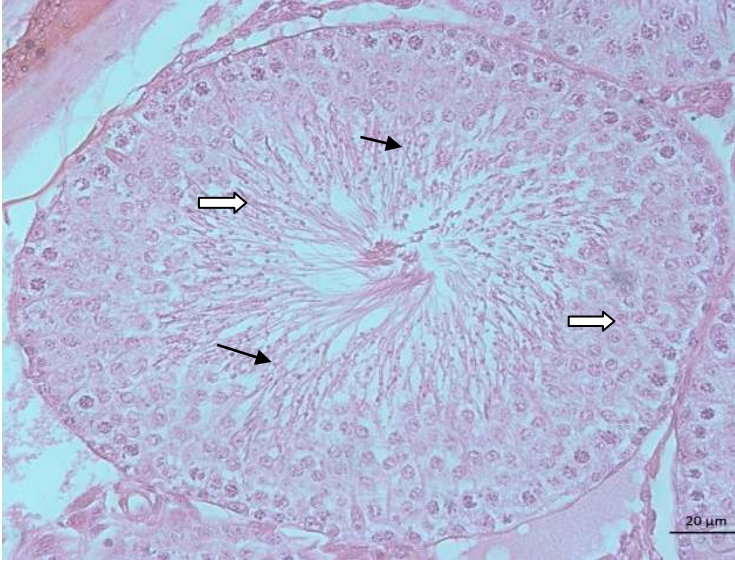
**Şekil 12.** Kontrol grubuna ait testis dokusu normal histolojik görüntüsü. Düzenli spermatogenezin izlendiği düzenli spermatogenezin gözlemlendiği ince bazal lamina (→) ile çevrili seminifer tübüllerde spermatidler (↘) çengel şeklinde baş kısımları ile fark edilen spermiler (☆) dikkati çekmektedir. (↗) sertoli hücresi ( HE X 400 ).



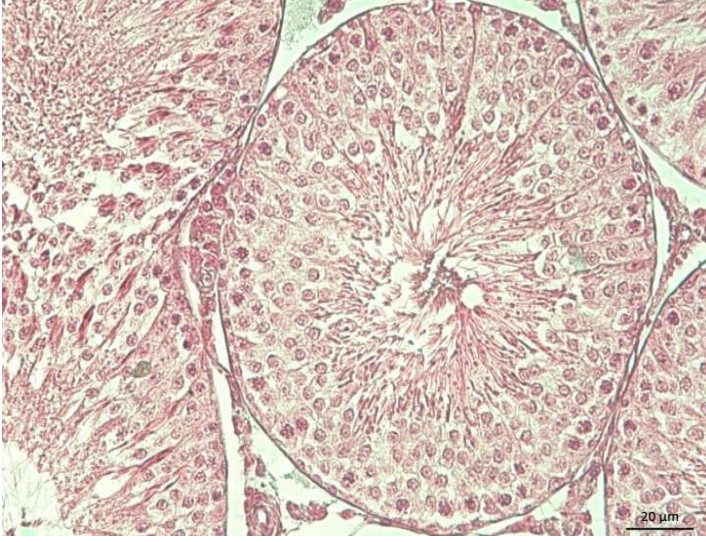
**Şekil 13.** Cisplatin grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Dejerene bazal lamina ile çevrili hasarlı seminifer tübüllerde spermatidler (↘) vakuolizasyonlar (→) görülmekte ( HE X 400 ).



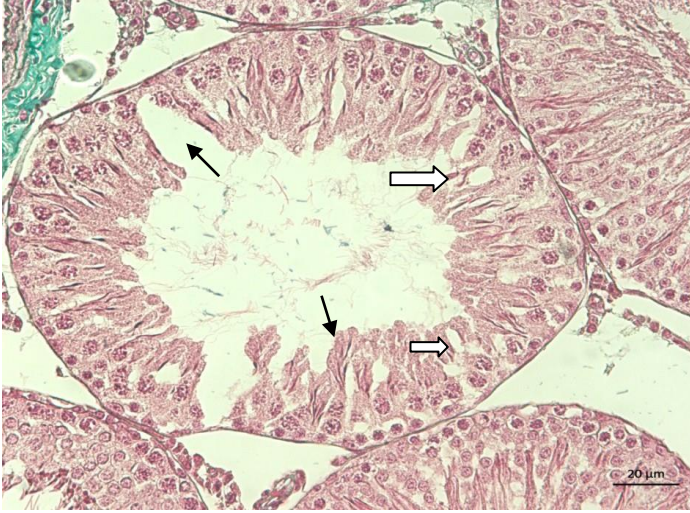
**Şekil 14.** Timokinon + Cisplatin grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Deney grubunda etkin spermatogenezin gözlemlenen seminifer tübüllerinde, ayrılma ile dökülmelerin azaldığı görülmekte ( HE X 400 ).



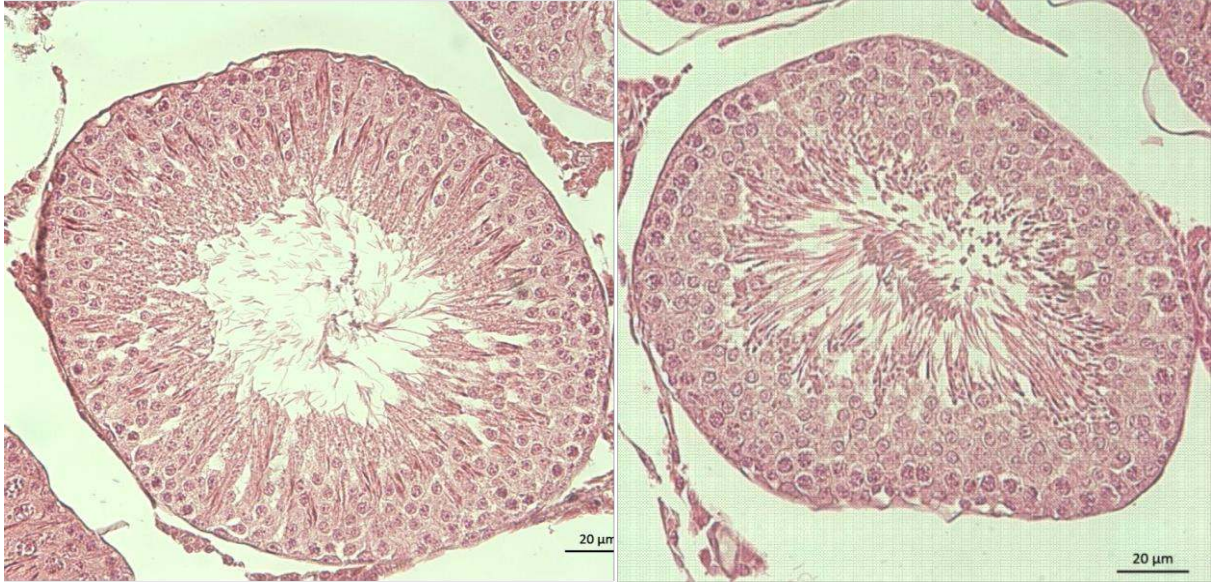
**Şekil 15.** Timokinon grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Testiste, düzenli spermatogenezin izlendiği seminifer tübüllerde spermatidler (⇔) ve baş kısımları ile fark edilen sperm (▲) gözlenmektedir ( HE X 400 ).



**Şekil 16.** Sham grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Düzenli spermatogenezin izlendiği düzenli seminifer tübüller ( Gomori-Trikrom X 400).



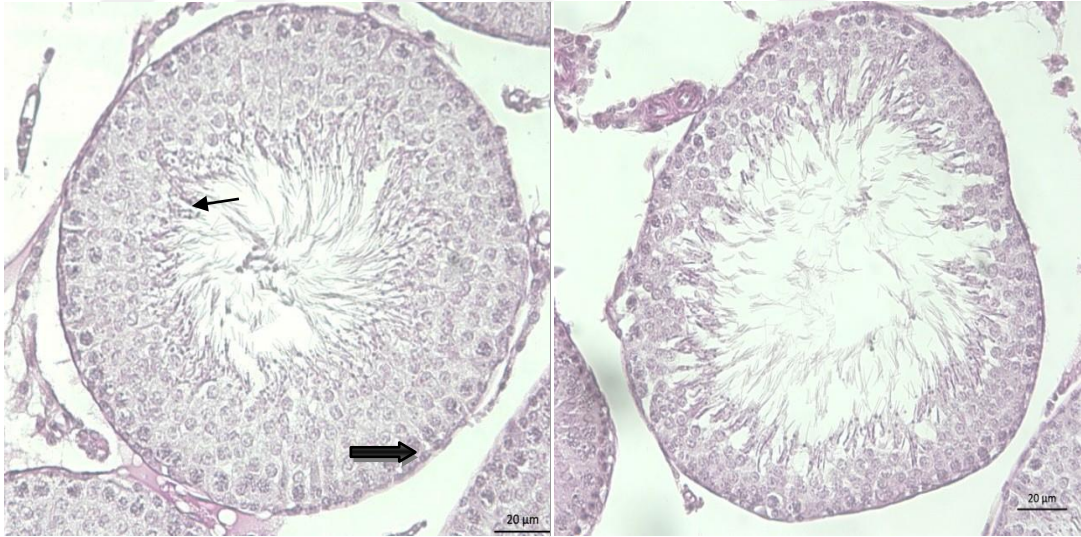
**Şekil 17.** Cisplatin grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Hasara uğramış tübüllerde germ hücrelerinin birbirleri ile bazal membrandan ayrılmalarından dolayı seminifer epitelde boşlukların meydana geldiği ( → ) vakuolizasyon ( ⇨ ) görülmektedir ( Gomori-Trikrom X 400 ).



TİMOKİNON + CİSPLATİN GRUBU

TİMOKİNON GRUBU

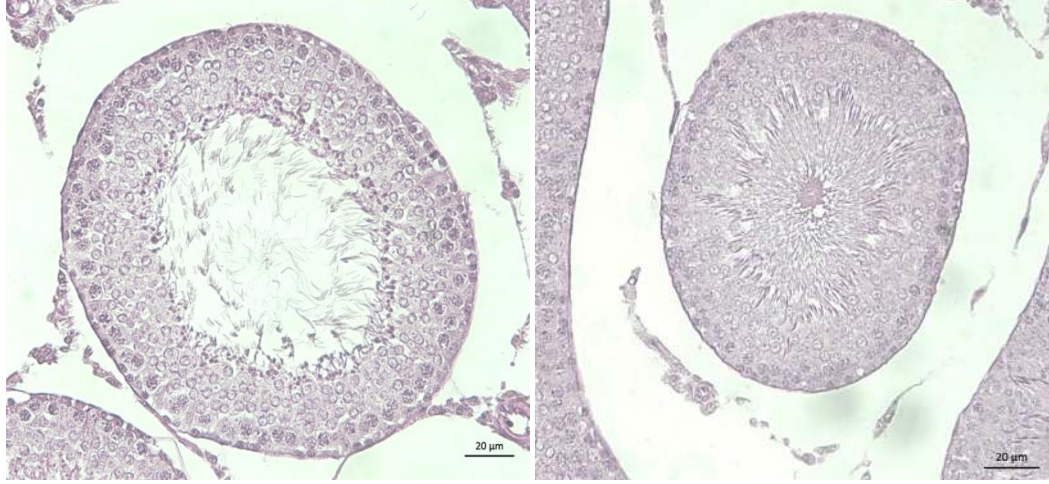
**Şekil 18.** Timokininon + Cisplatin ve Timokininon gruplarına ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Timokininon grubu seminifer tübül duvarında, düzenli dağılım gösteren germinal hücreler ile ayrılma ve dökülmelerin azaldığı gözlenmekte ( Gomori-Trikrom X 400 ).



KONTROL GRUBU

CİSPLATİN GRUBU

**Şekil 19.** Kontrol ve Cisplatin gruplarına ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Lümeni olgun spermilerin (→) bulunduğu düzenli germinal epitele sahip seminifer tübül ile spermatogonlular (⇨), görülmekte ( PAS X 400 ).



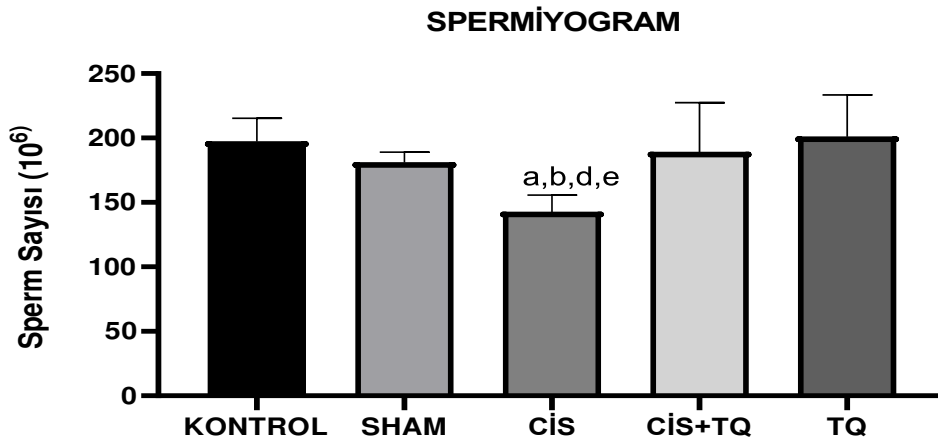
TİMOKİNÖN + CİSPLATİN GRUBU

TİMOKİNÖN GRUBU

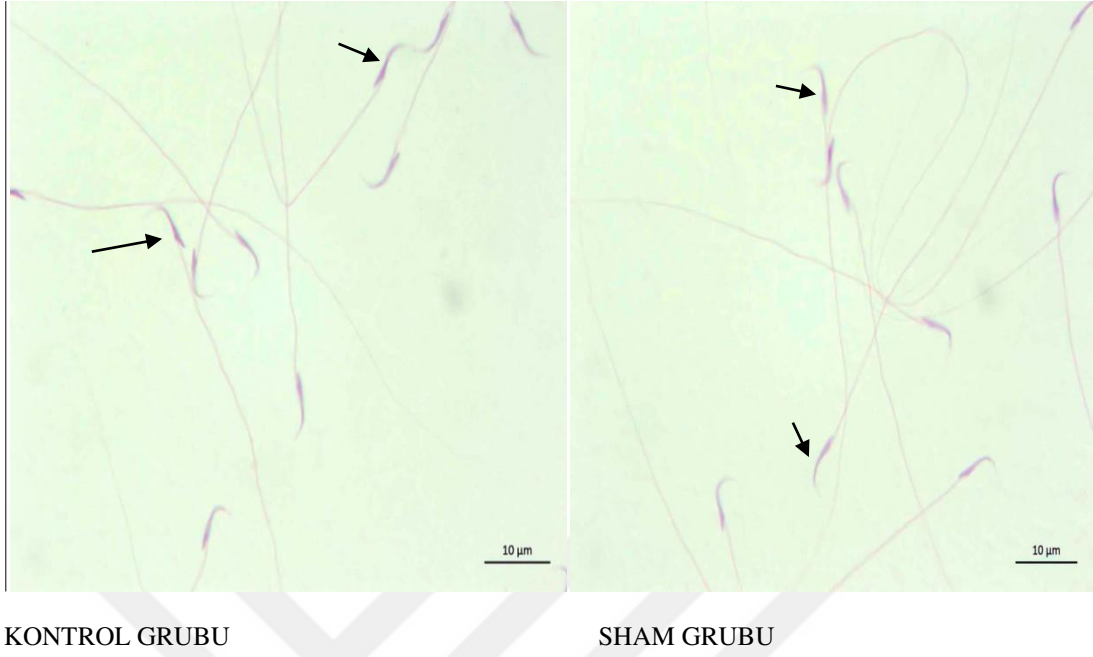
**Şekil 20.** Timokinin + Cisplatin ve Timokinin gruplarına ait testis dokusu histolojik görüntüsü. Timokinin + Cisplatin grubu seminifer tübül duvarında, düzenli dağılım gösteren germinal hücreler ile ayrılma ve dökülmelerin azaldığı gözlenmekte ( PAS X 400).

#### 4.2.1. Sperm sayısı ( Spermiyogram ) ait bulgular

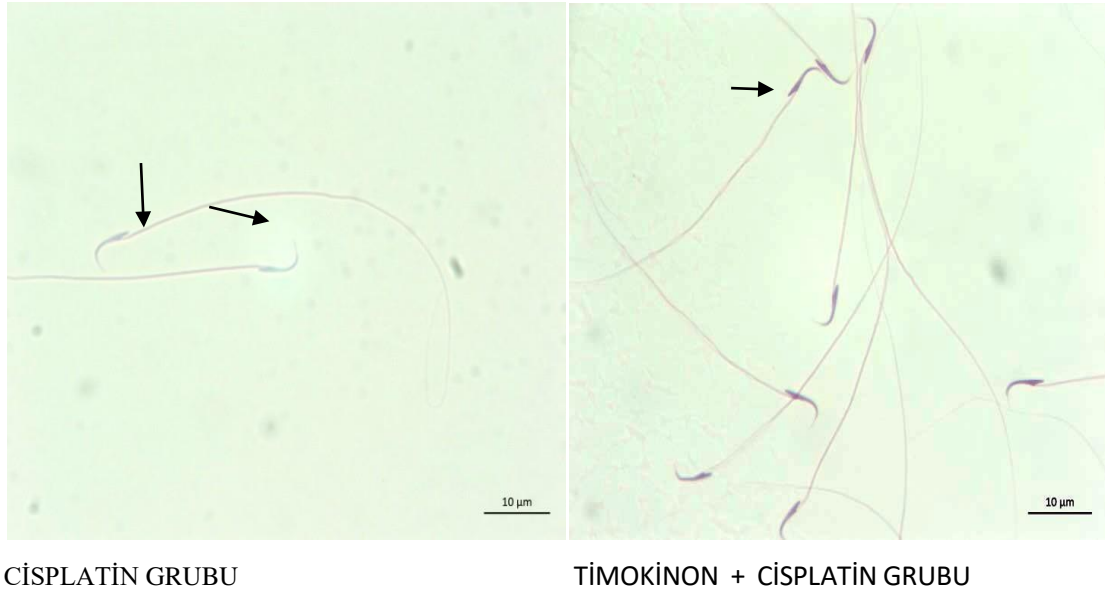
Plazma içerisindeki sperm yoğunluğunu bulabilmek için Manuel yöntemle Makler Sayım Kamarası ile semen incelemesi yapıldı. Kayıt altına alınıp sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Cisplatin grubuna ait ratların sperm sayıları diğer gruplara göre anlamlı derecede daha düşüktü.



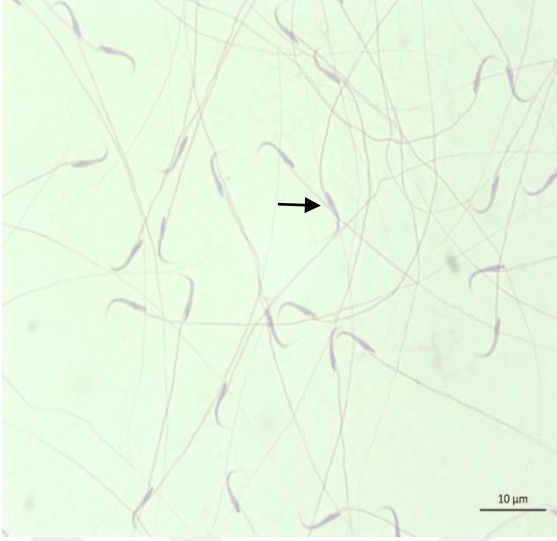
**Şekil 21.** Kontrol ve deney gruplarına ait spermiyogram değerlerinin grafiği. a kontrol grubuna göre, b sham grubuna göre, d timokinin + cisplatin grubuna göre, e timokinin grubuna göre c cisplatin grubu, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (  $p < 0.05$  ).



**Şekil 22.** Kontrol ve Sham grubuna ait sperm histolojik görüntüsü. Spermilerin normal morfolojide olduğu görülmektedir ( HE X 1000 ).



**Şekil 23.** Cisplatin ve Timokinin + Cisplatin gruplarına ait sperm histolojik görüntüsü. Cisplatin grubuna ait deneklerin normal görünümüne sahip spermilerin ( → ) yoğunluğu daha az olarak dikkati çekmektedir. Timokinin + Cisplatin grubunda ise alanda yoğun normal morfolojiye sahip spermier gözlenmekte ( HE X 1000 ) .



TİMOKİNÖN GRUBU

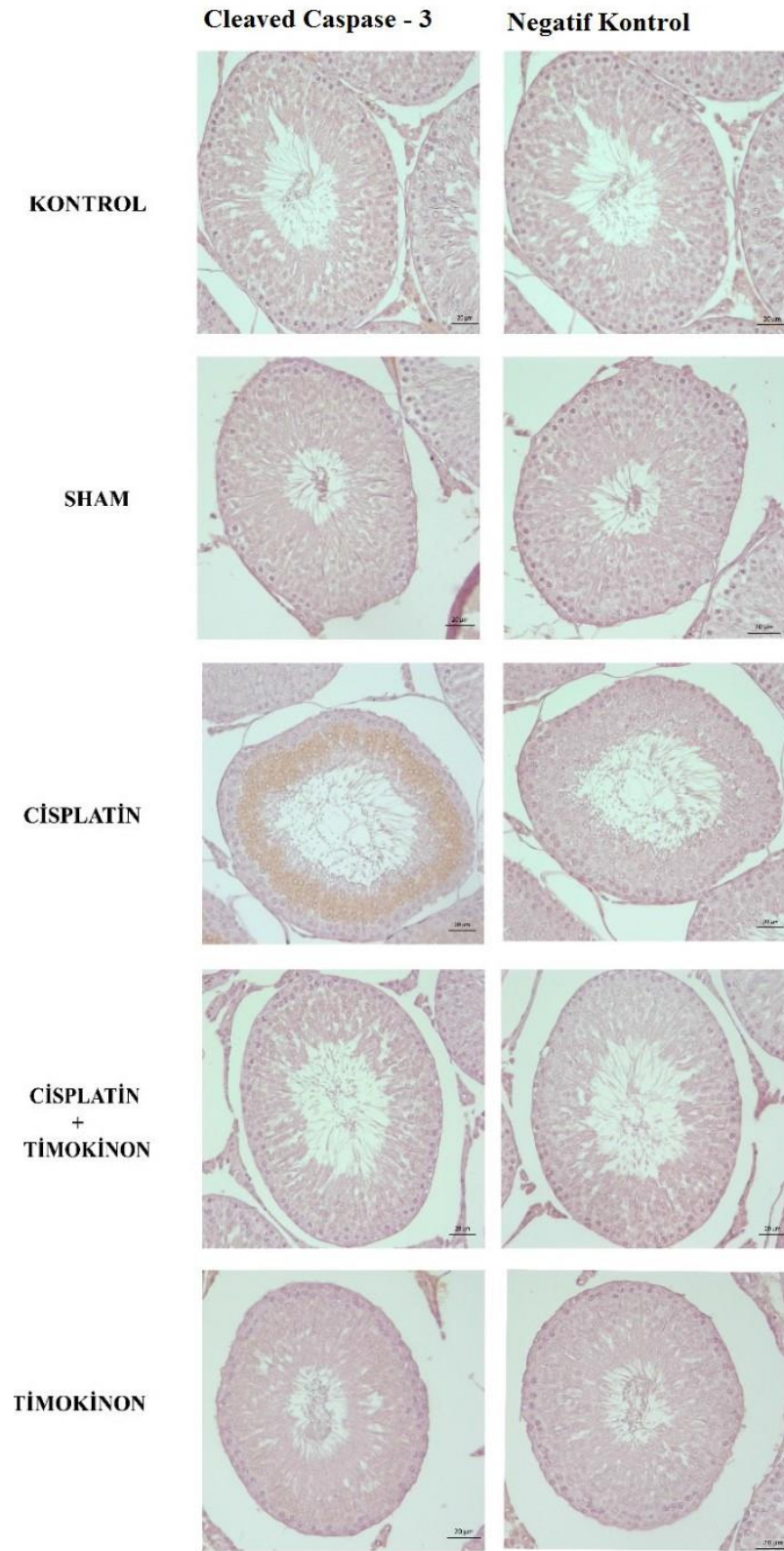
**Şekil 24.** Timokinin grubuna ait sperm histolojik görüntüsü. Spermilerin yoğun ve normal morfolojide olduğu görülmektedir ( HE X 1000).

#### 4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

##### 4.3.1. Cleaved Caspase - 3 immün işaretleme

Cleaved Caspase - 3 ile pozitif boyanan hücre sayıları değerlerine göre Timokinin, Cisplatin, Timokinin + Cisplatin grupları arasında anlamlı bir fark vardı. Cisplatin grubunda spermatidler de apoptoz görüldü. Timokinin + Cisplatin grubunda Cleaved Caspase - 3 ile boyanan hücre sayısının Cisplatin grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalması, Cisplatin hasarı sırasında timokininin apoptozu engellediğini gösterdi.

## İmmünohistokimyasal Boyama

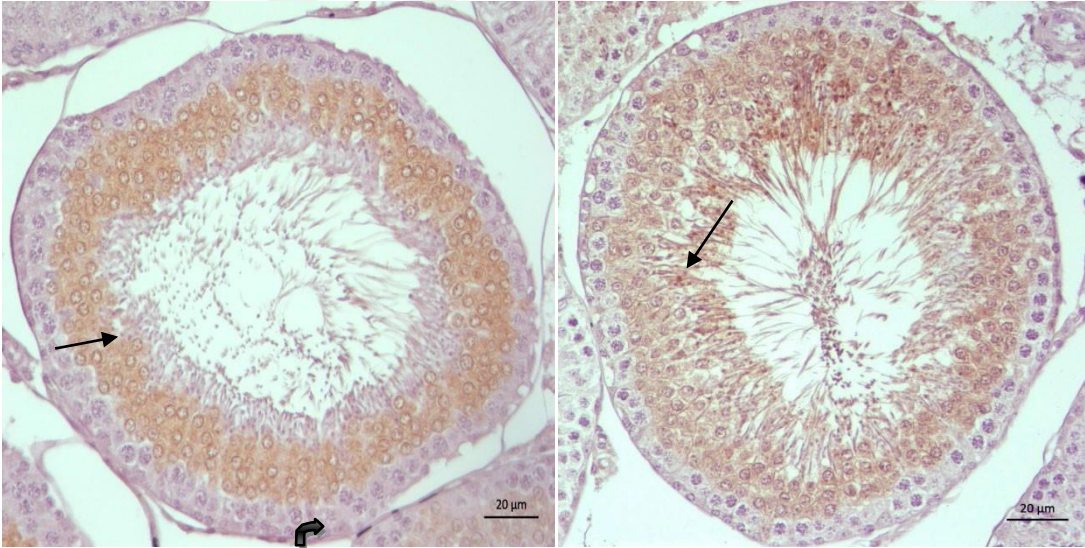


Şekil 25. İmmünohistokimyasal boyama ve deney gruplarının negatif ve pozitifleri ( Cleaved-Caspase -3 x 400).



KONTROL GRUBU

**Şekil 26.** Kontrol gruplarına ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama. Lümeni olgun spermilerin (☆) doldurduğu görüldü. Düzenli epitele sahip seminifer tübül (↘) ve spermatidler (⇨) gösterilmekte ( Cleaved-Caspase- 3 x 400 ).



CİSPLATİN GRUBU

CİSPLATİN GRUBU

**Şekil 27.** Cisplatin grubuna ait testisin seminifer tübül epitelinde Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama. Spermatidlerin (↘) oluşturduğu çok sayıda apoptotik hücre dizilimi görülmekte. Sertoli hücresi (♂) ( Cleaved-Caspase -3 x 400 ).

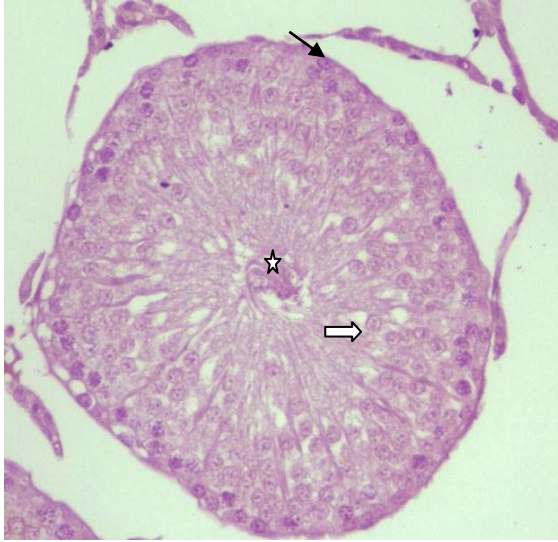


TİMOKİNON + CİSPLATİN GRUBU ( A )



TİMOKİNON + CİSPLATİN GRUBU ( B )

**Şekil 28.** Timokinin + Cisplatin grubuna ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama. Spermatidlerin ( ➞ ) oluşturduğu çok sayıda apoptotik hücre dizilimi görülmekte. A resminde ise erken spermatidler de hafif boyanmalar izlenmekte ( Cleaved- Caspase - 3 x 400 ).

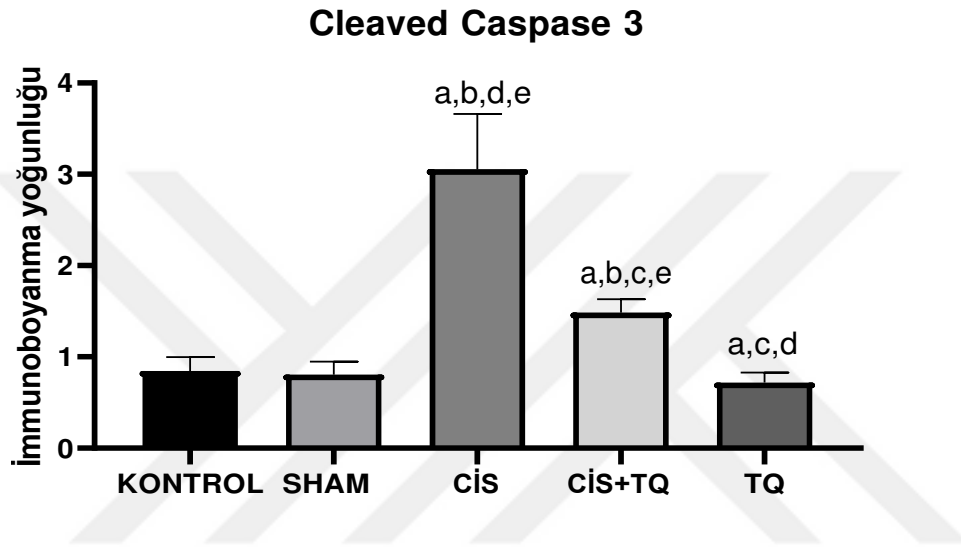


TİMOKİNON GRUBU

**Şekil 29.** Timokinin gruplarına ait testis dokusu Cleaved Caspase - 3 ile immunohistokimyasal boyama. Lümeni olgun spermilerin ( ☆ ) doldurduğu görüldü. Düzenli epitele sahip seminifer tübül ( ➞ ) ve spermatidler ( ⇔ ) gösterilmekte ( Cleaved-Caspase- 3 x 400 ).

#### 4.4.İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda, apoptozisin varlığını ortaya koymak için Cleaved Caspase - 3 ile pozitif boyanan bölgeler imageJ programında otomatik olarak sayıldı. Elde edilen veriler GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıkta mixed-effect analysis testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi  $p < 0.05$  olarak seçildi.



**Şekil 120.** Kontrol ve deney gruplarına ait Cleaved Caspase - 3 e ait apoptotik değerlerinin grafiği. a kontrol grubuna göre, b sham grubuna göre, c cisplatin grubuna göre, d timokinon + cisplatin grubuna göre, e timokinon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çörek otu ranunculacea (Düğün çiçeğigiller) ailesinde yer alır. Ülkemizde çörek otu tohumu olarak bilinen *Nigella sativa* tohumları besinlere ilave edilerek kullanıldığı gibi geleneksel olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde de yıllardır kullanıldığı bilinmektedir. Çörek otu tohumu uçucu yağının yapısında bulunan etkin başlıca temel bileşik timokinondur. Yapılan araştırmalarda timokinonun oksidatif hasara karşı böbrek, karaciğer, kalp, akciğer ve mide üzerinde koruyucu etkilere neden olduğu ve çörek otu tohumunun antikarsinojenik, analjezik ve hipoglisemik etkisi ile bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olduğu raporlanmıştır<sup>43</sup>. Yapılan çalışmalarda timokinonun çok geniş bir koruyucu ya da tedavi edici özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Timokinonun geniş etkilerine rağmen, söz konusu etkilerin mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar yeterli değildir.

Erkek üreme sisteminde spermatozoonların yapımından sorumlu olan testis yapı ve fonksiyonlarının bilinmeyen yönlerinin açıklığa kavuşturulmasına yönelik çalışmalar yıllar öncesinde başlamış ve günümüzde de devam etmektedir. Spermatogenik seri hücreleri toksik ajanlara karşı duyarlıdırlar. Bu hücrelerde genetik değişikliklerin meydana gelme olasılığı yüksektir. Erişkinlerde çoğalmayan Leydig ve Sertoli hücreleri ise en dirençli hücreler olup, çoğu sitotoksik ilaç sonrasında bile varlıklarını sürdürürler. Ancak bu hücreler fonksiyonel zarara uğrayabilir<sup>103,112</sup>.

Apoptozis, bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle ayırt edilen ökaryotik hücre ölümü biçimidir. Hayvan modelleri üzerindeki çalışmalar, apoptozisin normal spermatogenez esnasında germ hücre ölümüne neden olan bir mekanizma olduğunu göstermiştir<sup>113,114</sup>.

Cisplatin uzun yıllardır başarılı şekilde kanser tedavisinde kullanılmasına rağmen etki mekanizması üzerinde çalışmalar devam etmektedir. İlacın toksik etkilerinin; nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonuna zarar vererek ve çeşitli sinyal

yolaklarını aktiveleştirerek oluştuğu düşünölmektedir. Cisplatin hücre mitokondrisine zarar vererek, hücre döngüsünü yavaşlatır ve ardından ATPaz aktivitesini engeller, hücrenel transport sistemlerini değıştirir. Sonuç olarak apoptoz, inflamasyon, nekroz ve son olarak da hücre öölümüne sebep olur <sup>113</sup>. Cisplatin, hücreye girdiğinde aktive olur. Sitoplazmada cisplatin üzerindeki klorür atomları su molekülleri ile yer değıştirir. Hidrolize edilmiş ürün, proteinler üzerindeki sülfhidril grupları ve nükleik asitler dahil olmak üzere herhangi bir nükleofil ile reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofildir. Cisplatin, pürin kalıntıları üzerindeki N7 reaktif merkezine bağlanır ve bu nedenle kanser hücrelerinde DNA hasarına neden olabilir, hücre bölünmesini bloke eder ve apoptotik hücre öölümüne neden olabilir. Pürin bazlarının cisplatin ile 1,2-intrastrand çapraz bağlantıları, DNA'daki değışiklikler arasında en kritik olanlardır. Bunlar arasında 1,2-intrastrandd(GpG) eklentileri 1,2-intrastrandd(ApG) eklentilerin sırasıyla yaklaşık % 90 ve % 10'unu temsil eden eklentiler. 1,3-intrastrandd(GpXpG) eklentileri ve iplikçikler arası çapraz bağlar ve fonksiyonel olmayan eklentiler gibi diğer eklentilerin cisplatin toksisitesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, birçok araştırma DNA'yı cisplatin sitotoksitesisi için kritik bir hedef olarak tanımlamıştır <sup>115</sup>.

Oksidatif stres, cisplatin toksisitesinde yer alan en önemli mekanizmalardan biridir. Normal fizyolojik koşullar altında, hücreler, reaktif oksijen türlerinin üretimini, (glutasyon (GSH ), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)) eliminasyonları ile dengeleyerek reaktif oksijen türleri düzeylerini kontrol eder. Ancak, oksidatif stres koşulları altında, artan reaktif oksijen radikalleri hücrenel proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir, bu da kansere neden olan öölümcül lezyonlara yol açabilir. Kanser hücreleri, kısmen onkojenik stimölasyon, artan metabolik aktivite ve mitokondriyal nedenle normal hücrelere göre daha fazla oksidatif strese neden olurlar. Mitokondri, cisplatin kaynaklı oksidatif stres için birincil hedef olup, mitokondriyal protein sülfhidril grubunun kaybıyla sonuçlanır <sup>116</sup>.

Oksidatif strese maruz kalmak düzenli biyolojik fonksiyonları bozabilir. Cisplatin ayrıca DNA hasarının yanı sıra hücre öölümünü tetikleyen reaktif oksijen türlerini de indükler. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, cis-diamminedikloro platin (II) konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlıdır <sup>117</sup>.

Hücre içi redoks homeostazı, tiyol grubu (- SH) içeren moleküller tarafından korunur. Belirli koşullar altında bir tiyol grubu, moleküler oksijen ile etkileşime girebilen ve böylece reaktif oksijen türleri üreten tiyil radikallerinin oluşumuna yol açabilir <sup>118</sup>.

Cisplatinin diğer organlar üzerindeki zararlı etkisine karşı timokinonun koruyuculuğuna ait çalışmalar mevcutken, cisplatinin testis üzerindeki toksisitesi üzerine timokinonun etkisini gösteren pek çalışma yoktur.

Awadalla ve arkadaşları 2012 de yapmış oldukları çalışmada ratlarda *Nigella sativa* yağının (çörekotu yağı) cisplatin kaynaklı testis hasarına karşı koruyucu aktivitesini biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelemişlerdir. Bu deneyde üç hayvan grubu kullanılmıştır (kontrol, CP ve CP + NS (*Nigella sativa*) yağı). Erkek yetişkin sıçanlara 21 gün boyunca CP grubuna: 1 mg / kg / gün CP, CP + NS grubuna: 1 mg / kg / gün CP + 0.5 ml / kg çörek otu yağı verilmiştir. CP uygulamasının, malondialdehit (MDA) konsantrasyonunun yanı sıra testislerin kontrol sıçanlarına kıyasla histolojik yapısını olumsuz etkilediği ve NS (*Nigella sativa*) yağının uygulanmasının, MDA'nın değişimini ve ayrıca testislerin histopatolojik değişikliklerini neredeyse kontrol grubundakilere yakın şekilde koruduğu görülmüştür. Bize göre bu çalışmada Cisplatinin toksik etkisine karşı bu koruyuculuk çörekotu yağındaki timokinona bağlıdır ve bizim çalışmamızdaki bulguları desteklemektedir <sup>119</sup>.

Cisplatinin testis dokusuna verdiği hasarın başka antioksidanlar ile azaltılabilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur.

Kaya ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada tek doz 7 mg / kg intrapeitoneal (i.p) cisplatin uygulanmasının ardından 14 gün boyunca 50 mg / kg gavaj ile hesperidin uygulanmış. Cisplatinin neden olduğu düşük sperm motilitesi epididimal sperm konsantrasyonu, artmış sperm anomalilerini ve oluşan spermatogenik hücrelerde ayrılma ve dökülmeler gibi histopatolojik hasarlar gözlenmiş. Histopatolojik hasarın hesperidin ile önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Caspase -3 antikoru ile boyanan apoptotik hücre sayılarında ise Cisplatin + Hesperidin grubunda Cisplatin grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir <sup>120</sup>.

Carver ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; Cisplatin, günde 1 defa, 1, 3 ve 5. günlerde 3 mg / kg intraperitoneal olarak uygulanmış. 45 gün boyunca 10 µmol / kg CAPE (Kafeik Asit Fenetil Ester) intraperitoneal olarak verilmiş.

Yapılan incelemede cisplatin grubuna ait testis dokularında intertübüler alanlarda konjesyon, ödem, seminifer tübül yapılarında bozulma, vakuolizasyon ve germinal epitel de düzensizlik lümenlerinde ise hücre döküntüleri mevcut iken Cisplatin + CAPE (Kafeik Asit Fenetil Ester) grubundaki yapısal bozukluklar, cisplatin grubuna göre daha az seviyelerde gözlenmiş. Cleaved Caspase - 3 antikoru ile boyanan apoptotik hücre sayılarında ise Cisplatin + CAPE grubunda cisplatin grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir <sup>121</sup>.

Türk ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tek doz 7 mg / kg intrapeitoneal (i.p) cisplatin uygulamasının ardından 10 gün boyunca gavaj ile günde 10 mg / kg ellajik asit uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda cisplatinin testis ağırlığını, epididimal sperm konsantrasyonunu ve motiliteyi azalttığı, sperm morfolojisinde anomalileri artırdığı ve bu değişikliklerin ellajik asit uygulanmasının ardından düzeldiği gözlenmiştir. Cisplatinin testis dokusunda ödem, nekroz ve dejenerasyon oluşturduğu, germinal hücre epitelinde incelleme ve bazı seminifer tübüllerde spermatogenik aktivitede düşüş meydana getirdiği ve bu histopatolojik hasarın ellajik asit ile önemli ölçüde azaltıldığı belirlenmiştir <sup>122</sup>.

Bizim çalışmamızda da Cisplatin grubunun testis dokusunda, seminifer tübülde vakuolizasyon, seminifer epitelde bozulma ve hücre döküntüleri gözlemlendi. Cleaved Caspase - 3 antikoru ile boyanan apoptotik hücre sayısının cisplatin grubuna göre cisplatin + timokinon grubunda azaldığı tespit edildi.

Coşkun ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada; cisplatin (13 mg / kg, i.p) uygulanarak testis hasarı oluşturulmuş, aynı dozda cisplatin uygulanmadan 30 dakika önce 200 mg / kg asetil-L-karnitin intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Deney hayvanları cisplatin uygulandıktan 72 saat sonra kurban edilmişlerdir. Cisplatin grubunda testis ağırlığında ve seminifer tübül çapında düşüş, seminifer tübüllerde dejeneratif görünüm, spermatogenik hücre serilerinde ayrılma, lümende hücre döküntüsü, sperm morfolojisinde anomali ve interstisyel ödem görülmüştür <sup>123</sup>.

Gültekin ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada; 30 günlük deneyde cisplatin grubuna (CP); ilk 20 gün izotonik salin solüsyonu, diğer 5 gün ise cisplatin 2 mg / kg / gün, son 5 günde ise izotonik salin solüsyonu intraperitoneal yolla uygulanmış. Çinko grubuna (Zn); çinko sülfat (3 mg / kg) intraperitoneal olarak, cisplatin+çinko grubuna (CP + Zn) ise; 20 gün boyunca çinko sülfat (3 mg / kg ) sonraki 5 gün de cisplatin (2 mg / kg) ve çinko sülfat (3 mg / kg) intraperitoneal olarak verilmiş. Çalışmanın sonunda; cisplatinin testis üzerindeki zararlı etkilerine karşı çinkonun koruyucu etkisi gösterilmiştir. Cisplatin uygulanan grupta; germ hücrelerinde sıralama bozukluğu, sertoli ve spermatogonyumların bazal membrandan ayrılma, tüm epitel duvarı boyunca hücreler arası mesafede artış, lümene yakın spermatidlerde kromatin yoğunlaşması ve parçalanması görüldü <sup>124</sup>.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda uygulanan cisplatin gruplarının testis ağırlıklarının azalmasını bu çalışmalarda uygulanan cisplatin dozunun yüksek olmasına, bizim çalışmamızda testis ağırlıklarındaki artış sebebinin ise cisplatinin testis dokusunda meydana getirdiği ödeme bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Yaman ve arkadaşları da benzer şekilde cisplatin grubunda testis ağırlıklarında artış tespit etmişlerdir <sup>111</sup>.

Cisplatinin doza bağlı etkisi ile ilgili Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ratlara tek doz 1. gün 1 mg / kg, 3. gün 5 mg / kg ve 7. gün 10 mg / kg intraperitoneal cisplatin uygulanması sonunda 1, 3 ve 7. günün sonunda tüm ratlar kurban edilmiştir. Deney sonunda gruptaki testislerde spermatidlerin ve spermatozoanın sayılarını not etmişlerdir. Zaman ve doza bağlı apoptotik hücre sayılarını not etmişler. Doza bağlı cisplatin ile uyarılmış apoptotik germ hücresinin artması sadece 7. günde gözlemlenmiştir. Ayrıca; zamanın ilerlemesine bağlı olarak cisplatin indüklü apoptotik germ hücrelerinde artması sadece 10 mg / kg cisplatin uygulanan grupta izlenmiştir. Ayrıca seminifer tübüldeki spermatidler, spermatositler ve spermatogonyumda apoptotik hücreler olduğunu görmüşler. Sonuç olarak, cisplatin indüklenmesiyle oluşan germ hücre apoptozisinde dejerenerasyon oranının doz ve zamana bağımlı olarak değişebileceğini göstermişlerdir <sup>125</sup>.

Bizim çalışmamızda apoptozis spermatidler üzerinde görüldü. Cisplatinin oluşturduğu testiküler morfolojik hasar ve sperm yapımındaki azalma, germ hücrelerinde apoptoziste artışa neden olduğu gösterilmiştir. Fakat yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda uygulanan cisplatinin 1.5 mg / kg uygulanan dozun az olması ve deney süresinin daha kısa olması nedeni ile spermatogonyum ve primer spermatositlerde boyanma olmaması, Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki apoptozun doz ve zamana bağımlı olarak değişiklik göstermesini desteklemektedir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da cisplatin uygulanan grupta normal görünüme sahip spermelerin yoğunluğu azdı. Bizim çalışmamızda sperm hücrelerinin morfolojisi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulamadık. Bunun nedeninin de yine uygulanan doz ve deney süresinin daha az olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

45 günlük bir deneyde ise Favareto ve arkadaşları prepubertal dönemde, üç hafta boyunca haftada 5 gün olmak kaydı ile günde 1 mg / kg cisplatin uygulanan deneklerin, erişkin sperm parametrelerinde kontrol grubu ile karşılaştığında farklılığın olmadığını, geçen zaman içerisinde testis dokusunun yenilenerek sperm parametreleri açısından bir iyileşmenin olduğunu görmüşlerdir <sup>126</sup>. Bunun nedeni prepubertal dönemde bu dozda uygulanan cisplatinin spermatogonyum, sertoli ve leydig hücrelerini olumsuz olarak fazla etkilememesi olabilir.

Timokinonun testise toksik etkisi olabilecek maddelere karşı koruyucu etkisini gösteren çalışmalar da mevcuttur.

Hassan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; 56 günlük deneyde Pb (Kurşun) 20 mg / kg, içme suyunda oral olarak, TQ (mısır yağı + oral olarak 5 mg / kg) ve Pb ve TQ gruplarına ayrılmıştır. Pb (Kurşun) uygulanan grupta, testis ve epididim ağırlıklarında azalma, sperm sayısında azalma ve sperm anormallikleri görülmüş, seminifer tübüllerde dejeneratif görünüm izlenmiştir. TQ'nun Pb (Kurşun) ile uygulanmasıyla sperm sayısı, testis histolojisindeki histopatolojik değişikliklerde azalma olduğu görülmüştür.

Pb (Kurşun) ile TQ nun birlikte uygulandığı grupta, boyama yoğunluğunda ve Bax ve Caspase - 3 immüno-ekspresyon alanında önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir <sup>127</sup>.

Tüfek ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada; Obezite modeli oluşturulacak obez kontrol (OK), obez timokinon (OT) ve obez indol (Oİ) grupları % 40 yağ içeren özel bir diyetle, non-obez kontrol (NK), non-obez timokinon (NT) ve non-obez indol (Nİ) grupları ise standart yem ile 9 hafta boyunca beslenmiştir. Non – Obez - Timokinon grubu (NT) ve Obez - Timokinon grubu (OT) günde bir kez 10 mg / kg intraperitoneal olarak timokinon uygulanmıştır. Non-Obez-İndol grubu (Nİ) ve Obez-İndol grubu (Oİ), haftada üç kez olmak üzere 5 mg / kg intraperitoneal olarak indol-3-karbinol enjeksiyonu yapılmıştır. NT ve Nİ gruplarında ise spermatosit ve spermatid sayısında önemli artışlar gözlenmiştir. OT ve Oİ gruplarında seminifer tübül duvarında hasarların önemli ölçüde azaldığı, germ hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. TUNEL değerlendirmesinde Obez kontrol grubunda spermatogonyumlardaki apoptoz gözlenmiştir. OT grubu ve Oİ grubunda ise apoptotik hücre sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Timokinon ve indol – 3 - karbinol tedavisiyle sperm sayısının arttığı ve anomalilerin azaldığı görülmüştür. Timokinon uygulaması ile obez sıçanlardaki sperm anomalilerinin yüksek oranlarda azaldığı, indol gruplarına kıyasla timokinonun sperm kalitesi üzerindeki olumlu etkilerinin daha fazla olduğu gözlenmiştir <sup>128</sup>. Bundan dolayı Timokinonun, radikal süpürücü aktivite gösterdiğini antioksidan özelliklerinin oksidatif hasar üzerindeki etkilerini süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri de dahil olmak üzere çeşitli oksijen türleri üzerinde radikal süpürücü etkisi olduğundan kaynaklı olduğunu düşünüyoruz.

Karakaya ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da Pentilentetrazol ün testis üzerindeki toksik etkisine karşı timokinonun koruyucu etkisi gösterilmiştir <sup>129</sup>.

Timokinonun testis dokusuna zararlı olan maddelere karşı koruyucu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma olmasına rağmen timokinonun koruyucu olmadığına yönelik az da olsa deneysel çalışmalar da mevcuttur.

Bunlardan birisi Altındağ ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışmadır. Bu çalışmada Diklofenak sodyum ve timokinon ile maternal tedavinin sıçan yavrularında testiküler parametreler üzerine etkisine bakılmıştır. Çalışmada; Anne gebe sıçanlar beş gruba ayrılmış: kontrol, salin, DS (Diklofenak sodyum) TQ ve DS (Diklofenak sodyum) + TQ ve her grupta dört sıçan vardı. Daha sonra gestasyonun 5. ve 15. günleri arasında aşağıdaki gibi tedavi edildi. Salin grubuna: 1 mg / kg / gün (i. p) salin, DS ( Diklofenak sodyum) grubuna: 6.1 mg / kg / gün DS intramüsküler, TQ grubuna: 5 mg / kg / gün TQ ve DS + TQ grubuna: 6.1 mg / kg / gün DS ve 5 mg / kg / gün TQ verildi. Kontrol grubuna herhangi bir tedavi verilmedi. Doğumdan dört hafta sonra yavru erkek sıçanların testis dokuları alındı. Sonuçlara göre DS (Diklofenak sodyum) grubundaki 4 haftalık sıçanlarda toplam Sertoli ve Leydig hücre sayısında önemli bir düşüş olduğu görülmüş ( $p < 0.05$ ) ve TQ, DS'nin bu olumsuz etkisine karşı bir koruma sağlamamıştır. Bize göre bunun nedeni uygulanan timokinon dozunun düşük olmasından olabilir. Bu deneyde oral yolla günlük verilen timokinon miktarı 5 mg / kg iken, bizim çalışmamızda oral yolla verdiğimiz günlük timokinon miktarı 50 mg / kg dır<sup>130</sup>.

Başka çalışmalarda cisplatinin testis dışındaki diğer organlarda yapmış olduğu olumsuz etkilere karşı timokinonun koruyuculuğu gösterilmiştir<sup>131,132,133,134,135</sup>.

Çalışmamızda cisplatin uygulaması sonrası testis dokusunun ışık mikroskopik olarak incelenmesinde; cisplatin grubunda seminifer epitel kalınlığında azalma, tübül epitelinde dejenerasyon, spermatogenik hücrelerde dökülme, lümende azalmış spermatozoonlar, seminifer epitel bazal membranında yer yer ayrılmalar, interstisyel alanda bozulma meydana geldi. Apoptozisi göstermek için Cleaved Caspase - 3 antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamada cisplatin grubunda diğer gruplardan daha fazla immün pozitif hücre tespit edildi. Cisplatin + Timokinon uygulanan tedavi grubunda ise histolojik hasarın ve apoptotik hücre ölümünün hem ışık mikroskopik hem de immünohistokimyasal düzeyde azaldığı görüldü. Testis cisplatin hasarında Cleaved Caspase - 3 aktivasyonunda anlamlı bir artış, timokinon+cisplatin grubunda ise anlamlı bir azalma tespit edildi.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİ

Bu çalışma cisplatin hasarına karşı timokinonun koruyucu etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. İnfertiliteye neden olabileceğini düşündüğümüz cisplatin kaynaklı testis hasarında timokinonun koruyucu olduğunu ve tedavide kullanılabileceğini, bunun için de daha fazla deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



## 7. KAYNAKLAR

1. Gevrek F, Erdemir F. Investigation of the effects of curcumin, vit-e and their combination in cisplatin-induced testicular apoptosis using immunohistochemical technique. Turk J urol. 2018; 44 (1):16 -23.
2. Mercantepe T, Ünal D, Tümkaya L, Yazıcı ZA . Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin induced testis tissue damage in rats. Experimental And Therapeutic Medicine. 2018; 15: 3404 - 3412.
3. Aggarwal BB, Kunnumakkara A, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. Planta Medica. 2008; 74 (13): 1560-1569.
4. Gali - Muhtasib H, Roessner A, Schneider - Stock R. Thymoquinone : a promising anti-cancer drug from natural sources. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2006; 38: 1249 - 1253.
5. El - Far Ah. Thymoquinone anticancer discovery : possible mechanisms. Current Drug Discovery Technologies. 2015; 12: 80 - 89.
6. Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel Anatomi. 5. Baskı. Odtü Yayıncılık, Ankara, 2010; s. 286 - 287.
7. Aktümsek A. Anatomi Ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi. 3. Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006; s. 90.
8. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt. 4. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara, 2006; s. 6.
9. Netter FH. İnsan Anatomi Atlası. 5. Baskı. Cumhuri M. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 2008 ; s . 360 - 367.
10. Sarsılmaz M. İnsan Anatomi. 1. Baskı. Akademi Basım ve Yayıncılık, İstanbul, 2014; s. 589 - 591.
11. Moore KL, Dalley AF. Kliniğe Yönelik Anatomi. 4. Baskı. Şahinoğlu K . Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2007; s. 378 - 411.
12. Yıldırım M . İnsan Anatomisi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2012; s. 247 - 258.

13. Moor KL. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 10. Baskı. Dalçık H, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2016; s. 260 - 268.
14. Sadler TW, Langman Medikal Embriyoloji. 13. Baskı. Başaklar CA. Palme Yayıncılık , Ankara, 2017; s. 261 - 267.
15. James AO, Marc IR, Arnold C, Eric Fonkalsrud. Pediatric Surgery Vol. 2 Mosby; 5 Edition Nashville, 1998; p. 1073 - 1106
16. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook Of Histology. 3. Baskı. WB Saunders Company, Philadelphia, 2007.
17. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. 10. Baskı. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, Güneş Tıp Yayınevi, İstanbul, 2009; s. 486.
18. Junquera LC. Temel Histoloji.2. Baskı. Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul , 2003 : s. 431 - 446.
19. Victor PE. DiFiore'nin Histoloji Atlası. 12. Baskı. Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 2016: s.477 - 493.
20. Ross Mh, Pawlina W. Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology. 7nd Ed. Baltimore, Wolters Kluwer Health, 2016.
21. Kierszenbaum AL, Tres L. Histology And Cell Biology: An Introduction To Pathology. 6nd Ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012.
22. Henrikson R, Kaye G, Mazurkiewicz J. Histology National Medical Series For Independent Study . Williams & Wilkins , Baltimore , 1997 : s . 399.
23. Widmaier E RH. Vander İnsan Fiziyojisi . Güven Kitabevi, İstanbul, 2010; s. 657 - 678.
24. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fiziyojisi. 9. Baskı. Çavuşoğlu H, Çağlayan - Yeğen B. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul , 2007 ; s. 996 - 1010.
25. Köylü H. Tıbbi Fiziyojisi. 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2014; s.496 - 506.
26. Akşit H, Bildik A. Derleme Apoptosis, Yyü Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008; 19 (1) : 55 - 63.
27. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews. 1993; 14 (2) : 133 - 144.

28. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9 (2): 143 -148.
29. Ergin M. Apoptosis. Arşiv. 2002; 11: 495 - 504.
30. Bassett EA, Wang W, Rastinejad F, El - Deiry WS. Structural and functional basis for therapeutic modulation of p53 signaling. Clinical Cancer Res. 2008; 14 (20) : 6376 - 6386.
31. Lawen A, Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death . Curr Opin Struct Biol. 2000; 10: 649 - 55.
32. Accorsi A, Zibae A, Malagoli D. The Multifaceted activity of insect caspases. Journal Of Insect Physiology. 2015; 76 : 17 – 23.
33. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. J Clin Endo And Metab. 1998 ; 83.152 .
34. Simon B, Lee SJ, Partridge AH, Runowicz CD. Preserving fertility after cancer. Cancer J Clin . 2005; 55: 211 - 28.
35. Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. J Reprod Fertil.1992; 95: 825 - 830.
36. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal cell apoptosis. Recent Prog Horm Res. 1996; 51: 433 - 55.
37. Ayaşoğlu E. Apoptoz. T Clin J Med Sci. 2001; 21: 57 - 62.
38. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J. Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. Biol Repro. 1999; 61: 393 - 399.
39. Gün M. Holly Seed: Nigella Sativa; some knowledge corresponding Nigella Sativa therapy ailment. Lokman Hekim Journal. 2012; 2 (1): 43 - 46.
40. Al - Jassir MS. Chemical composition and microflora of black cumin (Nigella sativa L.) seeds growing in Saudi Arabia . Food Chem . 1992; 45 (4) : 239 – 242.
41. Ragaa HMS. Clinical and therapeutic trials of Nigella Sativa. Taf Prevmed Bull. 2010; 9 (5): 513 - 22.

42. Forouzanfar F, Bazzaz BS, Hosseinzadeh H. Black Cumin (*Nigella Sativa*) and its constituent (Thymoquinone) : a review on antimicrobial effects. *Iran J Basic Med Sci.* 2014; 17 (12) : 92938.
43. Khader M, Eckl PM. Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci.* 2014; 17 (12): 950 - 7.
44. Darakhshan S, Bidmeshki PA, Hosseinzadeh CA, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharm Res.* 2015; 95 – 96: 138 - 158.
45. Dattner AM . From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to future. *Dermatol Ther.* 2003; 16: 106 - 13.
46. Galli - Mustasib H, El - Najjar N, Schneider - Stocks R. The medicinal potential of black seed (*Nigella Sativa*) and its component. *Advances In Phytomedicine.* 2006;2: 133 - 153.
47. Shafiq H, Ahmad A, Masud T, Kalem M. Cardio - Protective and anti - cancer therapeutic potential of *Nigella Sativa*. *Iran Journal Of Basic Medical Science.* 2014; 17 (12) : 967 - 79.
48. Kalidasu G, Reddy GS, Kumari SS, Kumari AL, Sivasankar A. Secondary volatiles and metabolites from *Nigella Sativa* L. seed. *I J N P Res.* 2017; 8 (2) : 151 - 158.
49. Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of *Nigella Sativa* and Saffron (*Crocus Sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer.* 1991; 16 (1) : 67 - 72.
50. Salmani JM, Asghar SLVH, Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer Thymoquinone; probing the effects of solvents, Ph and light. *Molecules.* 2014; 19 (5) : 5925 - 39.
51. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage 1 non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7 (4) : 861 - 867.
52. Costa C, Soares R, Reis - Filho J, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt Fc . Cyclooxygenase - 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55 (6) : 429 - 434.

53. Santos CI, Costa - Pereira AP. Signal transducers and activators of transcription- from cytokine signalling to cancer biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1816 (1) : 38 - 49.
54. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford )*. 2009; 1 (5) : 373 - 81.
55. Woo CC. Anticancer activity of Thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of ppar -  $\gamma$  pathway. *Biochemical Pharmacology.* 2011; 82 (5) : 464 – 475.
56. Lei X , Lv X , Liu M , Yang Z , Ji M , Guo X . Thymoquinone inhibits growth and Augments 5 – Fluorouracil - induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 417 (2): 864 - 868.
57. Akgül A. Baharat bilimi ve teknolojisi. Gıda teknolojisi derneği yayınları no: 15, Ankara. 1993 ; s: 72 - 74.
58. Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, Maitichoudhury S. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and disogenin insquamous Cell Carcinoma. 2012; 7 (10) : e 46641.
59. Galli - Mustasib H, El-Najjar N, Schneider - Stocks R. The medicinal potential of black seed (*Nigella Sativa*) and its component. *Advances In Phytomedicine.* 2006 ; 2 : 133 - 153.
60. Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2 - Are signaling pathway: A promising strategy in cancer prevention. *Bioessays.* 2006 ; 28 : 169 - 181.
61. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H. *Nigella Sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World j Gastroenterol.* 2008; 14 (33) : 5204 - 9.
62. El - Khouly D, El - Bakly WM , Awad AS, El - Mesallamy HO, El - Demerdash E . Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating Bleomycin-induced oxidative stress and activation of Nuclear Factor Kappa - B in rats. *Toxicology.* 2012 ; 302 (23) : 106 - 13.

63. Hamdy NM, Taha R. Effects of Nigella Sativa Oil and Thymoquinone on oxidative stress and neuropathy in Streptozotocin induced Diabetic rats. *Parmacology*. 2009 ; 8: 127 - 134.
64. El Gazzar MA, El Mezayen R, Nicolls MR, Dreskin SC. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in Lipopolysaccharide - Activated mast cells by modulating NF - Kappab Nuclear Transactivation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2007; 177: 556 - 564.
65. Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A. Redox cycling of endogenous copper by Thymoquinone leads to ros - mediated dna breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell Death Dis*. 2013 ; 4 : e 660.
66. Hayat K, Asim MB, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N. Ameliorative effect of Thymoquinone on Ovalbumin - induced allergic conjunctivitis in balb / c mice. *Curr Eye Res*. 2011; 36 (7) : 591 - 8.
67. Kou B, Liu W, Zhao W, Duan P, Yang Y, Yi Q. Thymoquinone inhibits epithelial - mesenchymal transition in prostate cancer cells by negatively regulating the Tgf - B / Smad 2 / 3 signaling pathway. *Oncol Rep*. 2017; 38 (6) : 3592 - 8.
68. Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying X Z. Antitumor and anti-angiogenesis effects of Thymoquinone on osteosarcoma through the NF - KB pathway. *Oncology Reports*. 2013; 29 (2) : 571 - 578.
69. Khan A, Chen H, Tania M, Zhang D. Anticancer activities of Nigella Sativa ( Black Cumin ). *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011; 8 : 226 - 232.
70. Shorib AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by Thymoquinone. *Int J Oncol*. 2003; 22: 107 - 13.
71. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneiderstock R, Galı - Muhtasib H. Lack of P<sup>53</sup> Augments Thymoquinone - Induced Apoptosis and Caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2007 ; 6 (2) : 160 - 9.

72. Kaseb AO, Chinnakannu K , Chen D , Sivanandam A , Tejwani S , Menon M , Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2f - 1 targeted Thymoquinone therapy for hormone - refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 ; 67: 7782 - 8.
73. Galı - Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for Thymoquinone - induced cell - cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs.* 2004; 15: 389 - 99.
74. Badary OA, Abd-Ellah, MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM. Anticlastogenic activity of Thymoquinone against Benzo(a)pyrene in mice. *Food And Chemical Toxicology.* 2007; 45 : 88 - 92.
75. Ahmed WA, Hassan SA, Galeb FM, El - Taweel MA, Abu - Bedair FA. The in vitro promising therapeutic activity of Thymoquinone on hepatocellular carcinoma ( HEPG2) cell line. *Global Veterinaria .* 2008; 2 (5) : 233 - 241.
76. Williams CS, Mann M, Dubois RN. The role of Cyclooxygenase in inflammation, cancer and development. *Oncogene.* 1999; 18 (55) : 7908 - 7916.
77. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiya H. Effect of Thymoquinone on Cyclooxygenase expression and Prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol. Lett.* 2006; 106 (1) : 72 - 81.
78. Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F. Improvement of experimental allergic Encephalomyelitis (Eae) by Thymoquinone; an oxidative stres inhibitor. *Biomed Sci Instrum.* 2003 ; 39: 440 - 445.
79. Tekeoglu I, Dogan A, Ediz I, Budancamanak M, Demirel A. Effects of Thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytother Res.* 2007; 21 : 895 - 897.
80. El - Dakhakhny M, Madi NJ, Lember N, Ammon HPT. Nigella Sativa oil, nigellone and derived Thymoquinone inhibit synthesis of 5 - lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal Of Ethnopharmacology.* 2002 ; 81: 161 - 164.
81. Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the Nigella sativa l. Seed. *International immunopharmacology.* 2005; 5 (13 - 14) : 1749 - 1770.

82. Jrah - Harzallah H, Ben - Hadj - Khalifa S, Almawi WY, Maaloul A, Houas Z, Mahjoub T. Effect of Thymoquinone on 1,2 – Dimethyl- Hydrazineinduced oxidative stress during initiation and promotion of colon carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2013; 49 (5) : 1127 - 35.
83. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella Sativa*. *Phytother. Res*. 2003; 17: 299 - 305.
84. Aqel M , Shaheen R . Effects of the volatile oil of *Nigella Sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig . *Journal Of Ethnopharmacology*. 1996; 52 (1) : 23 - 6.
85. Yi T, Cho S - G, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal Bb, Liu M. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing Akt and Erk signaling pathways. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7 (7) : 1789 - 1796.
86. Rosenberg B. In *Nucleic Acid - Metal Ion Interactions*. Editor . Vol. 1. John Wiley & Sons, Inc. New York , Ny, Usa. 1980 ; 1 - 29.
87. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and Platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep*. 2003; 10 (6) : 1663 - 82.
88. Petrovic M, Todorovic D. Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. *Medicine And Biology*. 2016; 18 (1) : 12 - 18.
89. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy : Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014; 740: 364 - 378.
90. Chirina YI, Pedraza - Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in Cisplatin - induced nephrotoxicity. *Exp Tox Path*. 2009; 61: 223 - 242.
91. Crom WR, Barnhart Amg, Rodman JH, Teresi ME, Kavanagh RE, Christensen ML. Pharmacokinetics of anticancer drugs in children. *Clinical Pharmacokinetics*. 1987; 12: 168 - 213.
92. O'dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*. 2000; 29 (4) : 19 – 27.

93. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*. 2013; 24 (10) : 1007 - 19.
94. Ishida S, Lee J , Thiele DJ , Herskowitz I . Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter ctr1 in yeast and mammals. *Proc Nat . Aca. Sci U.S.A.* 2002; 99 (22): 14298 - 14302.
95. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent Cisplatin: a review. *Br J Cancer*. 1993; 67 (6) : 1171 - 1176.
96. Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H. Protection by a radical scavenger edaravone against Cisplatin - induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002; 451: 203 – 8.
97. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Change Of Lipid Peroxide Levels In Rat Tissues After Cisplatin Administration. *Tox Lett*. 1991; 57. 159 - 166.
98. Jordan P, Carmo - Fonseca M. Molecular mechanisms involved in Cisplatin cytotoxicity. *CMLS* . 2000; 57: 1229 - 1235.
99. Florea AM, Büsselberg D. Anti - Cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology*. 2009; 30: 803 – 810.
100. Strasser A, O'connor, Divit L, Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*. 2000; 69: 217 - 245.
101. Liu J, Liu Y, Habeebu SSM, Klaassen CD. Metallothionein (M t) - Null Mice are sensitive to Cisplatin induced Hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 ; 149 : 24 - 31.
102. Klaassen CD, Goodman and Gilman 'S. The Pharmacological basis of therapeutics, 10<sup>nd</sup>. Ed. McGraw - Hill Companies Inc. Medical Publishing Division, Usa , 2000.
103. Miessler GL, Tarr DA, İnorganik Kimya, 3. Baskı. Karacan N, Gürkan P, Palme Yayıncılık, Ankara, 2009: s. 618 - 621
104. Narayana K, Al - Bader M, Mousa A, Khan KM. Molecular effects of chemotherapeutic drugs and their modulation by antioxidants in the testis. *Eur j Pharmacol*. 2012; 674: 207 - 216.

105. Adler ID, El Tarras A. Clastogenic effects of cis - diamminedichloroplatinum II. induction of chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cells of mice. *Mutat Res.* 1990; 243 (3) : 173 - 178.
106. Favareto APA, Fernandez CDB, Da Silva DAF. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with Cisplatin at prepubertal. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 109 (2): 85 - 96.
107. Marcon L, Zhang X, Hales BF. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem / progenitor cells. *Jandrol.* 2011; 32 (4): 432 - 443.
108. Saral S, Özcelik E, Cetin A. Protective role of diospyros lotus on Cisplatin induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Andrologia.* 2015; 20: 1 - 10.
109. Hamza AA , Elwy HM , Badawi AM . Fenugreek seed extract attenuates Cisplatin - induced testicular damage in Wistar rats. *Andrologia.* 2016; 48 (2) : 211 - 221.
110. Erdemli E, Ergeneci D, Atahan Ş, Işıkay L. Cisplatinin sıçan böbrek ve testisleri üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası.* 1999; 52. 3.
111. Yaman Ö. Prepubertal Sıçan Testislerinde Cisplatin Maruziyetinin Neden Olduğu Seminifer Tübül Hasarı Ve Erişkin Sperm Parametreleri Üzerine L - Karnitinin Koruyucu Etkisi. 2015, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 82 sayfa, Edirne , (Doç. Dr. Yeter Topçu Tarladaçalışır).
112. Guitton N, Brovazin - Jousseau V, Dupaix A, Jegou B, Chenal C. Radiation effect on rat sertoli cell function in vitro and in vivo. *Int J Radiat Biol.* 1999; 75: 327 - 33.
113. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim Dergisi.* 2009, 22: 20-25.
114. Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis hakkında bilinenler. *Düzce Tıp Dergisi.* 2012; 14: 87 - 101.
115. Fraval HN, Rawlings CJ, Roberts JJ. 1978.Increased sensitivity of UV - repairdeficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. 1978, 51: 121 – 132.

116. Dasari S, Tchounwou PB. Splatın incancertherapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014; 740: 364 – 378.
117. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compound used at present in cancer treatment. *Crit . Rev . Oncol. Hematol .* 2002; 42: 317 – 325.
118. Brozovic A, Ambriovic - Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin - induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL - 2 and cisplatin - induced apoptosis. *Crit. Rev. Toxicol.* 2010; 40: 347 – 359.
119. Awadalla EA. Ameliorative effect of the crude oil of the *nigella sativa* on oxidative stress induced in rat testes by cisplatin treatment. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2012; 2: 265 – 268.
120. Kaya K, Ciftci O, Cetin A, Doğan H, Başak N. Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats. *Andrologia*. 2014; 13: 1011.
121. Carver H . Ratlarda Cisplatin İle Oluşturulan Testis Hasarında, Kafeik Asit Fenetil Ester'in (KAFE) Antioksidan Ve Antiapoptotik Etkilerinin Biyokimyasal Ve Histolojik Olarak İncelenmesi. 2019, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 86 sayfa, Bolu, (Dr. Öğr. Üyesi Tülin Fırat).
122. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Ceribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin - induced injuries to sperm quality, the oxidant - antioxidant system, and the histological structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril*. 2008; 89 (5) : 1474 - 81.
123. Coşkun N, Hatipoğlu MT, Özoğul C, Korkmaz C, Akyol SN, Mıcılı SC, Arık GS, Erdoğan D. The protective effects of acetyl L - carnitine on testis gonadotoxicity induced by Cisplatin in rats. *Balkan Med J*. 2013; 30 (2): 235 - 4.
124. Gültekin B. Cisplatin Toksisitesinin Sıçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere Çinkonun Etkisinin Araştırılması. 2013, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Doktora tezi, 114 sayfa , Konya , (Prof . Dr . Aydan Canbilen).
125. Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S. Cisplatin - induced germ cell apoptosis in mouse testes. *Arch Androl*. 2001; 46 : 43 - 49.
126. Favareto AP, Fernandez CD, Da Silva DA, Anselmo - Franci JA, Kempinas Wde G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats

- treated with cisplatin at peri - puberty. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011; 109 (2) : 85 - 96.
127. Hassan E, El-Neweshy M, Hassan M. Timokinon, erkek sıçanlarda subkronik kurşun maruziyetinden sonra testis ve spermatoksisiteyi hafifletir. Life Sci.2019; 230: 132 - 14.
128. Tüfek H N. Sıçanda Yüksek Yağlı Diyetle Oluşturulan Obezite Modelinde İndol-3-Karbinol Ve Timokinon'un Testis Üzerindeki Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. 2013, Samsun, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 162 sayfa, Samsun, (Doç. Dr. Muhammed Eyüp Altunkaynak).
129. Karakaya F. B. Pentilentetrazol İle Oluşturulan Temporal Lob Epilepsi Modelinde Timokinonun Testis Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Histolojik Açıdan İncelenmesi. 2019, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 86 sayfa , İstanbul , (Prof. Dr . Serap Şirvancı ) .
130. Altındağ F , Rağbetli MC . The effect of maternal treatment with diclofenac sodium and thymoquinone on testicular parameters in rat offspring. J.androl. 2019.07.001.
131. Nagi MN , Mansour MA . Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. Pharmacol Res. 2000; 41: 283 - 289.
132. Daba MH, Abdel - Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. Toxicol Lett. 1998 ; 95 : 23 - 29.
133. Asam H, Shahzad M, Shabbir A, Irshad S. Immunomodulatory effect of thymoquinone on atopic dermatitis. Molecular Immunology. 2018. 07. 013.
134. Jakaria MD, Duk - Yeon Cho , Ezazul Haque MD , Govindarajan Karthivashan, In - Su Kim, Palanivel Ganesan, Dong - Kug Choi. Neuropharmacological potential and delivery prospects of thymoquinone for neurological disorders. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018 ; 1209801.
135. Ahmed MA, El Morsy EM, Ahmed AA. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. Life Sciences. 2014; 110 (2): 61 – 69.

**EK-1**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI**  
**ETİK KURUL BAŞVURU KARARI**

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR tarafından kurulumuza sunulan “Testis Üzerine Cisplatinin Apoptotik Etkisine Karşı Timokinonun Korucu Etkisi” isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından “UYGUN OLDUĞUNA” oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

|                                                   |                    |      |
|---------------------------------------------------|--------------------|------|
| Toplantı Tarihi: 07/11/2018                       | Karar No: 2018/5/4 |      |
| UNVAN, ADI, SOYADI, GÖREVİ                        | KARAR              | İMZA |
| Doç. Dr. Ertuğrul KAYA<br>Başkan                  | UYGUNDUR           |      |
| Dr. Öğr. Üyesi Murat KABAKLIOĞLU<br>Başkan Vekili |                    |      |
| Ali GÖK<br>Veteriner                              | UYGUNDUR           |      |
| Prof. Dr. Şerif DEMİR<br>Üye                      | UYGUNDUR           |      |
| Doç. Dr. Şengül CANGÜR<br>Üye                     | UYGUNDUR           |      |
| Dr. Öğr. Üyesi Akif KETEN<br>Üye                  |                    |      |
| Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU<br>Üye             | UYGUNDUR           |      |
| Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE<br>Üye           | UYGUNDUR           |      |
| Dr. Öğr. Üyesi Emel ÇALIŞKAN<br>Üye               |                    |      |
| İzzet GÜÇLÜ<br>Üye                                | UYGUNDUR           |      |
| Merve UĞUR<br>Üye                                 | UYGUNDUR           |      |

Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu  
Düzce Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi,  
Konuralp Yerleşkesi, Merkez, 81620, Düzce.  
0380 5421416 – Dahili: 4171 Faks: 0380 5421302

## 9.ÖZGEÇMİŞ

AMASYA/MERZİFON doğumluğum. İlköğretimimi Bolu İzzet Baysal İlköğretim Okullu Liseyi ise Bolu Atatürk Lisesin' de tamamladım. Lisans' im ise Kafkas Üniversitesi Sağlık Yüksekokullu Sağlık Memurluğu 2009 yıllı mezunuyum. İlk görev yerim ise 2011 yıllında Sağlık Bakanlığı Mardi /Nusaybin Devlet Hastanesine atandım. Daha sonra 2013 yılında Bolu /Gerede Devlet Hastanesine tayin oldum. 2015 yıllında ise stajerliğimi yaptığım Sağlık Bakanlığı Bolu İzzet Baysal Devlet Hastanesine tayin oldum. İzzet Baysal Devlet Hastanesi Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Ünitesinde Pediatri / NRP hemşiresi olarak görev yapmaktayım.



