

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

**TESTİS DOKUSU VE SPERM ÜZERİNDE KEMOTERAPİNİN (BEP REJİMİ)  
OLUMSUZ ETKİSİNE KARŞI MELATONİN'İN KORUYUCULUĞUNUN  
FARKLI YÖNTEMLER UYGULANARAK ARAŞTIRILMASI**

**Sema KURNAZ ÖZBEK**

**Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin  
Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**KOCAELİ  
2017**



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

**TESTİS DOKUSU VE SPERM ÜZERİNDE KEMOTERAPİNİN (BEP REJİMİ)  
OLUMSUZ ETKİSİNE KARŞI MELATONİN'İN KORUYUCULUĞUNUN  
FARKLI YÖNTEMLER UYGULANARAK ARAŞTIRILMASI**

**Sema KURNAZ ÖZBEK**

**Kocaeli Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin**  
**Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü**  
**DOKTORA TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**Danışman: Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN**

**Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve  
TÜBİTAK (1002-Hızlı Destek Programı) Tarafından Desteklenmiştir**

**KOÜ BAP Proje Numarası: 2016/ 080**

**TÜBİTAK Proje Numarası: 116S690**

**Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ HADYEK 8/ 1-2015**

**KOCAELİ**

**2017**

**KABUL ve ONAY**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

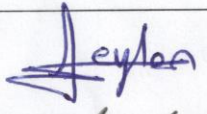
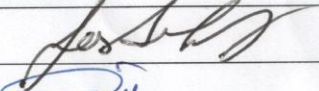
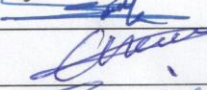
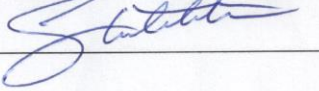
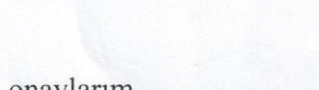
**Tez Adı:** Testis Dokusu ve Sperm Üzerinde Kemoterapinin (BEP Rejimi) Olumsuz Etkisine Karşı Melatonin'in Koruyuculuğunun Farklı Yöntemler Uygulanarak Araştırılması

**Tez yazarı:** Sema KURNAZ ÖZBEK

**Tez savunma tarihi:** 29. 06. 2017

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURUL ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN (DANIŞMAN)	Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN	
ÜYE	Prof. Dr. Serdar FİLİZ	
ÜYE	Prof. Dr. Murat KASAP	
ÜYE	Prof. Dr. Meryem ÇAM	
ÜYE	Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK	

**Onay**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../ 2017

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# ETİK KURUL



T.C.  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**



<b>PROJE NO:</b> 2015 /35 <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>ARAŞTIRMANIN ADI</b>	Testis Dokusu ve Sperm Üzerinde Kemoterapinin (BEP Rejimi) Olumsuz Etkisine Karşı, Melatonin'in Koruyuculuğunun Farklı Yöntemler Uygulanarak Araştırılması
	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI KURUMU</b>	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN /KOU Tıp Fak Histoloji AD
	<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR</b>	Arş. Gör. Sema KURNAZ, Prof. Dr. Serdar FİLİZ, Doç. Dr. Murat KASAP, Doç. Dr. Emine Elif GÜZEL, Doç. Dr. Fatma Ceyla ERALDEMİR, Arş. Gör. Selenay Hümeysra FURAT RENÇBER, Arş. Gör. Özgür Doğa ÖZSOY, Uzm. Dr. Salime Pelin ERTÜRKÜNER
<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGE</b>	<b>ARAŞTIRMA PROTOKOLU ve EKLERİ</b>	x
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan <b>uygun</b> olduğu kararla verilmiştir. <b>KARAR NO: KOU HADYEK 8/ 1-2015 KARAR TARİHİ: 13.07. 2015</b>	

<b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>			
<b>UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ</b>	<b>BİRİMİ</b>	<b>TOPLANTIYA KATILMA</b>	<b>KARARA KATILMA İMZA</b>
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Cerrah Cerrahi AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Halkları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	

## ÖZET

### **Testis Dokusu ve Sperm Üzerinde Kemoterapinin (BEP Rejimi) Olumsuz Etkisine Karşı Melatonin'in Koruyuculuğunun Farklı Yöntemler Uygulanarak Araştırılması**

**Amaç;** Bu çalışmanın amacı; kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan BEP (Bleomisin, Etoposid, sisPlatin) rejiminin testis dokusu ve sperm parametreleri üzerinde oluşturduğu yan etkileri değerlendirmek ve bu etkilerin azaltılması ya da önlenmesine yönelik koruyucu bir faktör olarak antioksidan özellikte olan Melatonin uygulanmasının erkek fertilitesi üzerine etkilerini incelemektir.

**Yöntem;** Toplam 72 adet 13-15 haftalık Wistar albino ırkı erkek sıçanlar çalışmaya dahil edildi. Deney grupları, 6 gruba ayrıldı ve her grup 12 hayvandan oluşmaktadır. Sıçanların dahil edildikleri deney grupları (G); kontrol grubu (G1), Melatonin'in kontrol grubu (etanol+salin) (G2), BEP uygulanan grup (G3), BEP uygulanan+9 haftalık iyileşme süreci içeren grup (G4), BEP+Melatonin uygulanan grup (G5), BEP+Melatonin uygulanan+9 haftalık iyileşme süreci içeren grup (G6) şeklindedir. Deney sürelerinin sonunda hayvanlardan intrakardiak infüzyonla kan örnekleri alındı ve dekapitasyondan sonra hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri ve epididimisi çıkarılarak ağırlıkları ölçülüp kaydedildi. Sol testislerin bir kısmı Bouin çözeltilisine alınarak fikse edildi ve histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi. Diğer kısmı ise glüteraldehit solüsyonuna alınarak fikse edildi ve elektron mikroskopik yöntemle incelendi. Sağ testisler ise biyokimyasal ölçümler ve western blot çalışması için ayrıldı. Epididimin kauda bölgesinden alınan sperm örnekleri faz-kontrast mikroskop altında incelendi. Sperm sayımı yapıldı ve spermler motilite açısından değerlendirildi. Ayrıca toluidin blue boyaması yapılarak spermin DNA bütünlüğü incelendi ve morfolojik yapısı değerlendirildi.

**Bulgular;** Salin ve Etanol+Salin grubu sıçanların testis yapısı ve biyokimyasal parametreleri normal olarak izlendi ( $p<0,05$ ). BEP grubuna ait seminifer tübüllerde vakuolizasyona, lümene dökülen immatür germ hücrelerine, dev hücrelere ve bazal lamina kalınlaşmasına rastlandı. Aynı zamanda apoptotik hücreler diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha fazla görüldü. Biyokimyasal olarak doku ve kan örneklerine bakıldığında antioksidan seviyeleri ve testosteron seviyeleri düşük; oksidan seviyeleri, FSH (Folikül uyarıcı hormon) ve LH (Luteinize edici hormon) seviyeleri yüksekti. BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının tüm değerleri kontrol grubuyla neredeyse aynıydı ( $p<0,05$ ).

**Sonuç:** BEP rejimi, testiste oksidatif stres oluřturarak yapısal bozukluklar oluřturmaktadır ve Melatonin ise antioksidan etkisiyle BEP rejiminin testiste oluřturduėu bu oksidatif hasarı dűzeltmektedir.

**Anahtar Sűzcűkler:** BEP rejimi, Bleomisin, Etoposid, Sisplatin, Kemoterapi, Melatonin, Testis, Sperm, Oksidatif Stres



## ABSTRACT

Investigation of Melatonin Protectiveness Against Adverse Effect of Chemotherapy (BEP regimen) on Testicular Tissue and Sperm by Applying Various Methods

**Objective;** The purpose of this study is to evaluate side effects of BEP regimen on testicular tissue, sperm structure and sperm parameters which is commonly used in cancer therapy and to investigate the protective effects on male fertility in the implementation of the antioxidant properties of melatonin as a factor for the reduction or prevention of these effects.

**Method;** A total of 72 male Wistar albino rats, aged 13-15 weeks, were included in the study. Each experimental animal group were divided into six groups and composed of twelve rats. Rats are assigned to the following experimental groups (G): (G1) control group, (G2) control group of melatonin (ethanol+saline), (G3) BEP treated group, (G4) BEP treated group (containing a 9-week recovery period), (G5) BEP+Melatonin treated group, (G6) BEP+Melatonin treated group (containing a 9-week recovery period). At the end of the experimental period, blood samples were taken from the animals by intracardiac infusion and after decapitation, testes and epididymides were removed by opening the abdomen of the animals and their weights will be measured and stored. Left testes were fixed in Bouin solution and examined by histochemical, immunocytochemical and electron microscopy methods. Right testes were allocated for biochemical measurements and western blotting studies. Sperm samples taken from the caudal region of the epididymis were examined under a phase-contrast microscope. Sperm counts were performed and sperm were evaluated for motility. In addition, the integrity of the sperm DNA was examined and morphological structure of sperm was evaluated by performing toluidine blue staining.

**Results;** Testicular structure and biochemical parameters were normally observed in rats of Saline and Ethanol + Saline group ( $p < 0,05$ ). Vacuolysis, immature germ cells, giant cells and basal lamina thickening was found in the seminiferous tubules of the BEP group. At the same time, apoptotic cells were seen more when compared to other groups. Biochemically, antioxidant levels and testosterone levels were low and oxidant levels, FSH (Follicle Stimulating Hormone) and LH (Luteinizing hormone) levels were higher in



testicular tissue and blood samples. All values of BEP + Melatonin and BEP + Melatonin + Recovery groups were almost the same as the control group ( $p < 0,05$ ).

**Conclusions;** The BEP regimen causes oxidative stress in the testis, resulting in structural defects, and melatonin improves the oxidative damage of the BEP regimen in the testis by the action of antioxidants.

**Keywords:** BEP regimen, Bleomycin, Etoposide, Cisplatin, Chemotherapy, Melatonin, Testis, Sperm, Oxidative Stress



## TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, Prof. Dr. Serdar FİLİZ, Prof. Dr. Süheyla GONCA ve Doç. Dr. Yusufhan YAZIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin elektron mikroskopisi çalışmalarında büyük emeği olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. E. Elif GÜZEL MEYDANLI ve Uzm. Bio. Zehra SEZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin Western blot ile ilgili deney ve değerlendirmelerinde her türlü yardım ve desteği sağlayan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Murat KASAP'a ve araştırma görevlisi Mehmet SARIHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin Biyokimyasal çalışmalarında her türlü yardım ve desteği sağlayan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. F. Ceyla ERALDEMİR'e ve araştırma görevlisi Özgür Doğa ÖZSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde fikir, öneri ve ilgileriyle bana destek olan araştırma görevlisi Selenay Hümeysra FURAT RENÇBER, Uzm. Bio. Kübra KAVRAM, Dr. Liridona ADİLİ OSMANİ, araştırma görevlisi Sabriye KARADENİZLİ ve araştırma görevlisi Fazilet DEDE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu süreçte de yanımda olarak bana destek veren sevgili aileme ve eşime çok teşekkür ederim.

**Sema KURNAZ ÖZBEK**  
**KOCAELİ, Haziran 2017**

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

26/ 05/ 2017

Sema KURNAZ ÖZBEK

İmza



## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY .....	iii
ETİK KURUL .....	iii
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜR .....	ix
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xxii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxvi
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Testis.....	1
1.1.1.Testisin Embriyolojisi.....	1
1.1.1.1. Testislerin İnışı .....	5
1.1.2. Testisin Anatomisi.....	8
1.1.2.1. Testis'in Kan Damarları, Lenf Dolaşımı ve Sinirleri .....	11
1.1.3. Testisin Histolojisi.....	13
1.1.3.1. Tubuli Seminiferi Contorti (Tubulus seminifer convolutus = Seminifer tübül).....	14
1.1.3.1.1. Sertoli Hücreleri (Epitheliocytus sustentans, Sustentacular cells, Destek hücreleri).....	17
1.1.3.1.2. Spermatogenik Hücreler .....	20
1.1.3.1.2.1. Spermatogonyumlar.....	20
1.1.3.1.2.2. Primer ve Sekonder Spermatisitler .....	22
1.1.3.1.2.3. Erken ve Geç Dönem Spermatisitler .....	22
1.1.3.1.2.4. Spermatozoonlar (Spermiumlar) .....	23
1.1.3.2. İnterstisyel Bağ Dokusu ve Leydig hücreleri .....	24

1.1.3.3. Spermatogenezis.....	26
1.1.3.3.1. Spermatozitojeniz .....	27
1.1.3.3.2. Mayoz Bölünme .....	27
1.1.3.3.3. Spermiyogenezis.....	29
1.1.4. Testisin Histofizyolojisi.....	31
1.2.Kanserin Genel Tanımı ve Testis Kanseri.....	33
1.2.1. Kanserin Genel Tanımı.....	33
1.2.2. Hücre Döngüsü ve Kanser.....	34
1.2.3. Testis Kanseri .....	37
1.2.3.1. Testis Kanseri Epidemiyolojisi.....	39
1.2.3.2. Testis Kanseri Etiyolojik Risk Faktörleri .....	40
1.2.3.3. Testis Kanseri Tanısı .....	41
1.2.3.4. Testis Kanserinde Evreleme ve Sınıflama.....	42
1.2.3.5. Testis Kanseri Tedavisi .....	45
1.3. Kemoterapi .....	46
1.3.1. BEP Rejimi (Bleomisin, Etoposid, ve sisPlatin) .....	47
1.3.1.1. Bleomisin.....	48
1.3.1.1.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı .....	48
1.3.1.1.2. Bleomisin'in Etki Mekanizması .....	50
1.3.1.1.3. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı .....	51
1.3.1.1.4. Bleomisin'in Yan Etkileri.....	52
1.3.1.2. Sisplatin .....	53
1.3.1.2.1. Sisplatin'in Kimyasal Yapısı .....	53
1.3.1.2.2. Sisplatin'in Etki Mekanizması .....	54
1.3.1.2.3. Sisplatin'in Tedavide Kullanımı.....	56
1.3.1.2.4. Sisplatin'in Yan Etkileri .....	56
1.3.1.3. Etoposid.....	58

1.3.1.3.1.Etoposid'in Kimyasal Yapısı.....	58
1.3.1.3.2.Etoposid'in Etki Mekanizması .....	59
1.3.1.3.3.Etoposid'in Tedavide Kullanımı .....	60
1.3.1.3.4.Etoposid'in Yan Etkileri.....	60
1.4. Antioksidanlar .....	61
1.4.1. Melatonin.....	61
2.AMAÇ .....	63
3.YÖNTEM .....	65
3.1.Deney Hayvanları.....	65
3.1.1.Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar .....	65
3.1.2.Sakrifikasyon.....	66
3.1.3.Vücut Ağırlıklarının Ölçümü.....	67
3.1.4.Testis ve Epididimis Ağırlıklarının Ölçümü .....	67
3.1.5.Sperm Sayımı ve Morfolojik İnceleme .....	67
3.2.Histolojik Boyama Yöntemleri İle Testis Dokusunun İncelenmesi .....	68
3.2.1.Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme.....	68
3.2.2.PAS (Periyodik Asit Schiff) Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme.....	68
3.2.3.Seminifer Tübül Çapı Ölçümü .....	69
3.2.4.İmmünohistokimyasal Uygulamalar.....	69
3.2.4.1.Anti-PCNA İmmünohistokimyası .....	69
3.2.4.2.Anti-Dmc1/ Lim15 İmmünohistokimyası .....	71
3.2.4.3.Anti-CD71/ Transferrin Reseptör İmmünohistokimyası.....	72
3.2.5.TUNEL Boyaması .....	73
3.3.Ultrastrüktürel Yöntemler.....	73
3.4.Western Blot Tekniği İle İnceleme.....	74
3.4.1. Dokulardan proteinlerin izole edilmesi ve protein konsantrasyonunun hesaplanması .....	75

3.4.2. Protein Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) .....	75
3.4.3. Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi .....	76
3.4.4. Proteinlerin özel antikorlar ile membran üzerinde gözlenmesi .....	76
3.5. Biyokimyasal İnceleme .....	77
3.5.1. Doku homojenizasyonu .....	78
3.5.2. Doku protein tayini .....	78
3.5.3. Dokuda MDA, GSH, SOD, TAS ve TOS Tayini .....	78
3.5.3.1. Doku MDA düzeylerinin tayini .....	78
3.5.3.2. Doku GSH düzeylerinin tayini .....	78
3.5.3.3. Doku SOD aktivite tayini .....	78
3.5.3.4. Doku TAS Ölçümü .....	79
3.5.3.5. Doku TOS Ölçümü .....	79
3.5.4. Plazmada Testosteron, FSH ve LH Tayini .....	79
3.5.5. Serumda MDA, SOD, GSH, TAS ve TOS Tayini .....	80
3.5.5.1. Serum MDA düzeylerinin tayini .....	80
3.5.5.2. Serum GSH düzeylerinin tayini .....	80
3.5.5.3. Serum SOD aktivite tayini .....	81
3.5.5.4. Serum TAS Ölçümü .....	82
3.5.5.5. Serum TOS Ölçümü .....	82
3.6. İstatistiksel Analiz .....	82
3.7. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar .....	83
3.7.1. Kimyasal Malzemeler .....	83
3.7.2. Cihazlar .....	84
4. BULGULAR .....	85
4.1. Vücut ve Organ Ağırlıkları .....	85
4.1.1. Deney Başlangıcı Vücut Ağırlıkları .....	85
4.1.2. Deney Sonu Vücut Ağırlıkları .....	86

4.1.3. Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması .....	87
4.1.4. Testis Ağırlıkları.....	89
4.1.4.1. Testis ağırlık indeksi (TAİ) .....	90
4.1.5. Epididimis Ağırlıkları.....	91
4.2. Epididimal Sperm Sayımı ve Morfolojik İnceleme Bulguları.....	93
4.2.1. Epididimal Sperm Sayımı.....	93
4.2.2. Sperm Motilitesi .....	94
4.2.3. Sperm Morfolojisi .....	95
4.3. Işık Mikroskopi Bulguları .....	98
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Bulguları .....	98
4.3.2. PAS Boyaması Bulguları.....	106
4.3.3. Morfometrik İnceleme .....	110
4.3.3.1. Seminifer Tübül Çapı Ölçümü .....	110
4.3.4. İmmünohistokimyasal Uygulama Bulguları.....	111
4.3.4.1. Anti-PCNA antikoru ile yapılan immünohistokimyasal uygulama bulguları .....	111
4.3.4.2. Anti-Dmc1/ Lim15 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal uygulama bulguları .....	116
4.3.4.3. Anti-CD71/ Transferrin Reseptör antikoru ile yapılan immünohistokimyasal uygulama bulguları.....	118
4.3.5. TUNEL İşaretleme ile Apoptotik Hücre Tayini .....	121
4.4. TEM ile Ultrastrüktürel İnceleme Bulguları .....	128
4.5. Western Blot Bulguları.....	131
4.5.1. Anti-PCNA Western Blot Bulguları.....	137
4.5.2. Anti-DMC1/ Lim15 Western Blot Bulguları.....	139
4.5.3. Anti-CD71/ Transferrin Reseptör Western Blot Bulguları.....	141
4.6. Biyokimya Bulguları .....	143
4.6.1. Testis dokusu MDA, GSH, SOD, TAS ve TOS düzey tayini bulguları.....	143
4.6.1.1. Testis dokusu MDA düzey tayini bulguları.....	143



4.6.1.2. Testis dokusu GSH düzey tayini bulguları .....	144
4.6.1.3. Testis dokusu SOD düzey tayini bulguları .....	146
4.6.1.4. Testis dokusu TAS düzey tayini bulguları .....	147
4.6.1.5. Testis dokusu TOS düzey tayini bulguları .....	149
4.6.2. Plazmada Testosteron, FSH ve LH düzey tayini bulguları .....	150
4.6.2.1. Plazmada Testosteron düzey tayini bulguları .....	150
4.6.2.2. Plazmada FSH düzey tayini bulguları .....	151
4.6.2.3. Plazmada LH düzey tayini bulguları .....	153
4.6.3. Serumda MDA, GSH, SOD, TAS ve TOS düzey tayini bulguları.....	154
4.6.3.1. Serumda MDA düzey tayini bulguları .....	154
4.6.3.2. Serumda GSH düzey tayini bulguları.....	156
4.6.3.3. Serumda SOD düzey tayini bulguları.....	157
4.6.3.4. Serumda TAS düzey tayini bulguları .....	159
4.6.3.5. Serumda TOS düzey tayini bulguları .....	160
5. TARTIŞMA.....	162
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	186
KAYNAKLAR.....	188
ÖZGEÇMİŞ.....	204

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP: Androjen-bağlayıcı protein

ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)

Ad: dark type A=koyu tip A

AFP: Alfa-feto-protein

Aİ: Apoptotik indeks

AKAP3: Kinaz-A bağlayıcı protein 3

AKAP4: Kinaz-A bağlayıcı protein 4

ALP: alkalen fosfataz

AMH: Antimullerian hormon

Ap: pale type A=açık tip A

ATPaz: Adenozin trifosfataz

$\beta$ -Hcg:  $\beta$ - insan korionik gonadotropin

$\beta$ -aktin: Beta aktin

BEP: Bleomisin, Etoposid, Sisplatin

BMP-4: Kemik morfogenetik protein 4

$^{\circ}$ C: Selsius

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate= döngüsel adenozin monofosfat

CaO<sub>2</sub>: Kalsiyum peroksit

CDKs: Siklin-bağımlı kinazlar

CGRP: Kalsitonin gen-bağımlı peptid

CHES: Countercurrent Heat Exchange System= Ters Akım Isı Değişim Sistemi

CIS: Karsinoma in situ

Cl: Klor

CSL: Kranial asıcı ligaman

CTR1: Copper transporter 1

dk: dakika

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

Dmc1: DNA meiotic recombinase 1

DMEM/ F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/ nutrient mixture F-12

DNA: Deoksiribonükleikasit

DTNB: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EMA1: Equi merozoite antigen gene

ETS: Elektron transport sistemi

F9: faktör IX

FBS: Fetal bovine serum

FDA: Amerika Gıda ve İlaç Kurumu

FGF9: Fibroblast growth factor 9

FSH: Follicle Stimulating Hormone= Folikül uyarıcı hormon

g: gram

G6PD: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

GER: Granüllü endoplazmik retikulum

GFN: Genitofemoral sinir

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone = Gonadotropin salgılatıcı hormon

GSH: Glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

H+E: Hematoksilen-eozin

INSL3: Insulin-like 3

INT: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride

IP: İntraperitoneal

IV: İntravenöz

KAT: Katalaz

l: Litre

LDH: Laktat dehidrogenaz

LDL: Low-density lipoprotein

LGR8: leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8

LH: Luteinizing hormone= Luteinize edici hormon

LPO: Lipit peroksidasyonu

MDA: Malondialdehid

MIS: Mullerian Inhibiting Substance

μ: Mikrolitre

m: Metre

mg: Miligram

ml: Mililitre

mmol: Milimol

mM: Milimolar

NADPH oksidaz: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz

nm: Nanometre

NSGHT: Non Seminamatöz Germ Hücreli Tümör

OCT: Organik katyon transporter

Oct4: Octamer-binding transcription factor 4

OsO<sub>4</sub>: Osmiyum tetraoksit

p53: Tümör baskılayıcı protein 53

P-Mod-S: Peritubular-modifies-Sertoli

PAS: Periyodik Asit Schiff

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

Pt: Platin

PV: Processus vaginalis

RNA: Ribonükleikasit

ROS: Reaktif oksijen türleri

sd-LDL: Small dense-low-density lipoprotein=düşük molekül ağırlıklı lipoproteinler

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SER: Granülsüz endoplazmik retikulum

SF1: Steroidogenic factor 1

SGHT: Seminamatöz Germ Hücreli Tümör

sn: saniye

SOD: Süperoksit dismütaz

SOX9: SRY-box 9

SRY: Sex-determining Region Y= cinsiyet belirleyici bölge Y

SSEA1: Stage-specific embryonic antigen 1

TAKAP: Testis spesifik kinaz-A bağlayıcı protein

TAS: Total Antioksidant Status

TBA: Tiyobarbitürik asit

TBF: Testis Belirleyici Faktör

TBS-T: Tween 20 içeren Tris buffer saline

TCA: Trikloroasetik asit

TEM: Transmission Electron Microscope= Geçirimli elektron mikroskobu

TEP: Tetra etoksipropan

TGHT: Testiküler germ hücre tümörleri

TOS: Total Oksidant Status

TNF- $\alpha$ : tümör nekroz faktör alfa

TPER: Tissue Protein Extraction Reagent

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt] mediated deoxyuridine triphosphate [dUTP]-biotin nick end-labeling)

USG: Ultrasonografi

UV: Ultraviyole

v: vena

VCI: Vena cava inferior

WNT4: *Wingless-type MMTV integration site family, member 4*

XOD: Ksantin-ksantin oksidaz

## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Testis ve ovaryum farklılaşmasından sorumlu olan genlerin şematik olarak gösterilmesi.....	2
Çizim 1.2. A. Vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında ortaya çıkan primordial germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo. B. Primordial germ hücrelerinin, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle göç ederek genital kabartılara ulaşmasını gösteren embriyo kesiti. ....	3
Çizim 1.3. Primitif (ilkel) cinsiyet kordonlarını gösteren altı haftalık bir embriyonun enine kesiti. ....	3
Çizim 1.4. A. Gelişimin sekizinci haftasında testisten geçen ve tunika albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren enine kesit. B. Testis ve genital kanalların dördüncü aydaki görünümü . ....	4
Çizim 1.5. INSL3-bağımlı transabdominal migrasyon evresi.....	7
Çizim 1.6. Androjen-bağımlı inguinoskrotal iniş evresi. ....	7
Çizim 1.7. Testise ait tabakalar .....	9
Çizim 1.8. Testislerin etrafını saran üç kılıf (capsula testis) yapısı.....	10
Çizim 1.9. Testisin kan damarları olan a. testicularis, v. testicularis ve plexus pampiniformis'in gösterimi.....	12
Çizim 1.10. Tubuli seminiferi contorti'lerin histolojik görüntüsü .....	15
Çizim 1.11. Tubuli seminiferi contorti epiteli .....	16
Çizim 1.12. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bazal ve adluminal kompartman .....	19
Çizim 1.13. Seminifer (germinal) epitelde yer alan spermatogonyumlar .....	21
Çizim 1.14. Olgun spermatozoon yapısı .....	23
Çizim 1.15. İnterstisyel Bağ Dokusu ve Leydig hücreler .....	25
Çizim 1.16. Spermatogenezis sürecinin evreleri .....	26
Çizim 1.17. Spermiyogenezisin aşamaları .....	29
Çizim 1.18. Hücre döngüsünün evreleri.....	35
Çizim 1.19. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları.....	36
Çizim 1.20. Germ hücreli tümörlerin histogenezisi .....	37
Çizim 1.21. Testis kanseri küresel insidansı.....	39
Çizim 1.22. 1960-1990 yılları arasında Norveç'te testiküler kanser insidansı ve mortalitesindeki eğilimler.....	40
Çizim 1.23. Bleomisin'in kimyasal yapısı .....	49

Çizim 1.24. Sisplatin'in moleküler yapısı. a) <i>cis</i> formu b) <i>trans</i> formu.....	54
Çizim 1.25. a) Etoposid'in kimyasal yapısı b) İzomer yapısı .....	59
Çizim 4.1. Sıçanların deney başlangıcındaki ortalama vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması.....	86
Çizim 4.2. Sıçanların deney sonu ortalama vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması.....	87
Çizim 4.3. Sıçanların deney başlangıcı ve deney sonu ortalama vücut ağırlıkları arasındaki farkların gruplara göre karşılaştırılması .....	89
Çizim 4.4. Sıçanların ortalama sol testis ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması .....	90
Çizim 4.5. Gruplara göre sıçanların testis ağırlık indekslerinin karşılaştırılması (g).....	91
Çizim 4.6. Sıçanların ortalama epididimis ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması ...	92
Çizim 4.7. Gruplara göre sıçanların epididimal sperm sayısı (milyon/g). .....	94
Çizim 4.8. Gruplara göre sıçanların sperm motilitesi (%).....	95
Çizim 4.9. Salin, Etanol+Salin, BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait sıçanların normal sperm morfolojileri .....	95
Çizim 4.10. BEP ve BEP+Recovery gruplarına ait sıçanların sperm anomalileri. ....	98
Çizim 4.11. A. Salin, Etanol+Salin, BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait sıçan sperminde toluidin blue boyaması ile görülen normal kromatin yapısı B. BEP ve BEP+Recovery gruplarına ait sıçan sperminde toluidin blue boyaması ile görülen kromatin hasarı. ....	98
Çizim 4.12. Kontrol (Salin) grubuna ait H&E boyaması mikrografları .....	100
Çizim 4.13. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait H&E boyaması mikrografları.....	101
Çizim 4.14. BEP grubuna ait H&E boyaması mikrografları.....	102
Çizim 4.15. BEP grubuna ait H&E boyaması mikrograflarında dev hücre yapıları .....	103
Çizim 4.16. BEP + Recovery grubuna ait H&E boyaması mikrografları .....	104
Çizim 4.17. BEP + Melatonin grubuna ait H&E boyaması mikrografları .....	105
Çizim 4.18. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait H&E boyaması mikrografları.....	106
Çizim 4.19. Kontrol (Salin) grubuna ait H&E boyaması mikrografları .....	107
Çizim 4.20. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait PAS boyaması mikrografları.....	108
Çizim 4.21. BEP grubuna ait PAS boyaması mikrografları .....	108
Çizim 4.22. BEP + Recovery grubuna ait PAS boyaması mikrografları .....	109
Çizim 4.23. BEP + Melatonin grubuna ait PAS boyaması mikrografları .....	109



Çizim 4.24. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait PAS boyaması mikrografları.....	109
Çizim 4.25. Testis seminifer tübül çapı ölçümleri (µm) .....	110
Çizim 4.26. A. Kontrol (Salin) grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, B. 40X, C. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, D. 40X.....	112
Çizim 4.27. A. BEP grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, B. BEP+Recovery grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X .....	113
Çizim 4.28. A. BEP+Melatonin grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, B. BEP+Melatonin grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 40X .....	114
Çizim 4.29. Tüm grupların Anti-PCNA H-Skor Düzeyleri.....	115
Çizim 4.30. A. Kontrol (Salin) grubuna ait, B. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait, C. BEP grubuna ait, D. BEP + Recovery grubuna ait, E. BEP + Melatonin grubuna ait, F. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait Anti-Dmc1/ Lim15 işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	117
Çizim 4.31. Tüm grupların Anti-DMC1/ Lim15 H-Skor Düzeyleri .....	118
Çizim 4.32. A. Kontrol (Salin) grubuna ait, B. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait, C. BEP grubuna ait, D. BEP + Recovery grubuna ait, E. BEP + Melatonin grubuna ait, F. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait Anti-CD71/ Transferrin Reseptör işaretlemesini gösteren ışık mikrografları .....	120
Çizim 4.33. Tüm grupların Anti-CD71/ Transferrin Reseptör H-Skor Düzeyleri .....	121
Çizim 4.34. Kontrol (Salin) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları .....	123
Çizim 4.35. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları .....	124
Çizim 4.36. BEP grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları .....	125
Çizim 4.37. BEP + Recovery grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	126
Çizim 4.38. BEP + Melatonin grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	127
Çizim 4.39. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	127

Çizim 4.40. Sıçan gruplarına ait testislerin TUNEL işaretlemesi ile elde edilen ortalama apoptotik indeks değerleri (%) .....	128
Çizim 4.41. Salin grubuna ait TEM mikrografları. ....	131
Çizim 4.42. Etanol+Salin grubuna ait TEM mikrografları.....	132
Çizim 4.43. BEP grubuna ait TEM mikrografları .....	133
Çizim 4.44. BEP+Recovery grubuna ait TEM mikrografları.....	134
Çizim 4.45. BEP+Melatonin grubuna ait TEM mikrografları .....	135
Çizim 4.46. BEP+Melatonin+Recovery grubuna ait TEM mikrografları.....	136
Çizim 4.47. G1: Salin, G2: Etanol+Salin, G3: BEP, G4: BEP+Recovery, G5: BEP+Melatonin, G6:BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait PCNA ve $\beta$ -Aktin bantları .....	137
Çizim 4.48. PCNA/Aktin oranları .....	138
Çizim 4.49. G1: Salin, G2: Etanol+Salin, G3: BEP, G4: BEP+Recovery, G5: BEP+Melatonin, G6:BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait DMC1/Lim15 ve $\beta$ -Aktin bantları.....	139
Çizim 4.50. Dmc1/Aktin oranı .....	140
Çizim 4.51. G1: Salin, G2: Etanol+Salin, G3: BEP, G4: BEP+Recovery, G5: BEP+Melatonin, G6:BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait CD71/ Transferrin reseptör ve $\beta$ -Aktin bantları.....	141
Çizim 4.52. CD71/Aktin oranı .....	142
Çizim 4.53. Gruplara göre sıçanların testis dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg protein) ..	144
Çizim 4.54. Gruplara göre sıçanların testis dokusu GSH düzeyleri (mg/mg protein). ....	145
Çizim 4.55. Gruplara göre sıçanların testis dokusu SOD düzeyleri (U/g protein).....	147
Çizim 4.56. Gruplara göre sıçanların testis dokusu TAS düzeyleri (mmol/g protein).....	148
Çizim 4.57. Gruplara göre sıçanların testis dokusu TOS düzeyleri ( $\mu$ mol/g protein).....	150
Çizim 4.58. Gruplara göre sıçanların plazma Testosteron düzeyleri (ng/ml) .....	151
Çizim 4.59. Gruplara göre sıçanların plazma FSH düzeyleri (ng/ml).....	153
Çizim 4.60. Gruplara göre sıçanların plazma LH düzeyleri (mIU/ml) .....	154
Çizim 4.61. Gruplara göre sıçanların serum MDA düzeyleri (nmol/ml). ....	156
Çizim 4.62. Gruplara göre sıçanların serum GSH düzeyleri (mg/ml).....	157
Çizim 4.63. Gruplara göre sıçanların serum SOD düzeyleri (U/g Hb) .....	158
Çizim 4.64. Gruplara göre sıçanların serum TAS düzeyleri (mmol/l). ....	160
Çizim 4.65. Gruplara göre sıçanların serum TOS düzeyleri ( $\mu$ mol/l). ....	161

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Testise ait tabakalar.....	9
Çizelge 3.1. İmmunohistokimyasal Boyanma Yoğunluğunun Derecelendirilmesi.....	70
Çizelge 3.2. Serum MDA düzeyini ölçmek için kullanılan madde miktarları.....	80
Çizelge 3.3. Serum GSH düzeyini ölçmek için kullanılan madde miktarları.....	81
Çizelge 3.4. Serum GSH düzeyini ölçmek için supernatan aşamasından sonra kullanılan madde miktarları.....	81
Çizelge 4.1. Gruplara göre sıçanların deney başlangıcındaki ortalama vücut ağırlıkları (g) .....	85
Çizelge 4.2. Gruplara göre sıçanların deney sonu ortalama vücut ağırlıkları (g).....	86
Çizelge 4.3. Gruplara göre sıçanların deney başlangıcı ve sonundaki ortalama vücut ağırlıkları (g).....	88
Çizelge 4.4. Gruplara göre sıçanların sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması (g) .....	90
Çizelge 4.5. Gruplara göre sıçanların testis ağırlık indekslerinin karşılaştırılması (g) .....	91
Çizelge 4.6. Gruplara göre sıçanların epididimis ağırlıklarının karşılaştırılması (g) .....	92
Çizelge 4.7. Gruplara göre sıçanların epididimal sperm sayısı (milyon/g) .....	93
Çizelge 4.8. Gruplara göre sıçanların sperm motilitesi (%) .....	95
Çizelge 4.9. Testis seminifer tübül çapı ölçümleri ( $\mu\text{m}$ ) .....	110
Çizelge 4.10. Tüm grupların Anti-PCNA H-Skor Düzeyleri. ....	115
Çizelge 4.11. Tüm grupların Anti-DMC1/ Lim15 H-Skor Düzeyleri. ....	118
Çizelge 4.12. Tüm grupların Anti-CD71/ Transferrin Reseptör H-Skor Düzeyleri. ....	121
Çizelge 4.13. Sıçan gruplarına ait testislerin TUNEL işaretleme ile elde edilen ortalama apoptotik indeks (AI) değerleri (%).....	128
Çizelge 4.14. Gruplara göre PCNA/ $\beta$ -Aktin bant oranları .....	138
Çizelge 4.15. Gruplara göre DMC1/ $\beta$ -Aktin bant oranları.....	140
Çizelge 4.16. Gruplara göre CD71/ $\beta$ -Aktin bant oranları .....	142
Çizelge 4.17. Gruplara göre testis dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg protein) .....	143
Çizelge 4.18. Gruplara göre testis dokusu GSH düzeyleri (mg/mg protein).....	145
Çizelge 4.19. Gruplara göre testis dokusu SOD düzeyleri (U/g protein) .....	146
Çizelge 4.20. Gruplara göre testis dokusu TAS düzeyleri (mmol/g protein) .....	148
Çizelge 4.21. Gruplara göre testis dokusu TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol/g}$ protein).....	149
Çizelge 4.22. Gruplara göre plazma Testosteron düzeyleri (ng/ml).....	151
Çizelge 4.23. Gruplara göre plazma FSH düzeyleri (ng/ml).....	152

Çizelge 4.24. Gruplara göre plazma LH düzeyleri (mIU/ml).....	154
Çizelge 4.25. Gruplara göre serum MDA düzeyleri (nmol/ml) .....	155
Çizelge 4.26. Gruplara göre serum GSH düzeyleri (mg/ml).....	157
Çizelge 4.27. Gruplara göre serum SOD düzeyleri (U/g Hb) .....	158
Çizelge 4.28. Gruplara göre serum TAS düzeyleri (mmol/l) .....	159
Çizelge 4.29. Gruplara göre serum TOS düzeyleri ( $\mu$ mol/l).....	161



Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- ▣ Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- ▣ Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- ▣ Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- ▣ Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nn imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- ▣ Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- ▣ n sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- ▣ Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- ▣ Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- ▣ Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- ▣ Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- ▣ Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- ▣ Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- ▣ Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- ▣ Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

26 / 05 / 2017

Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN

İmza



# 1.GİRİŞ

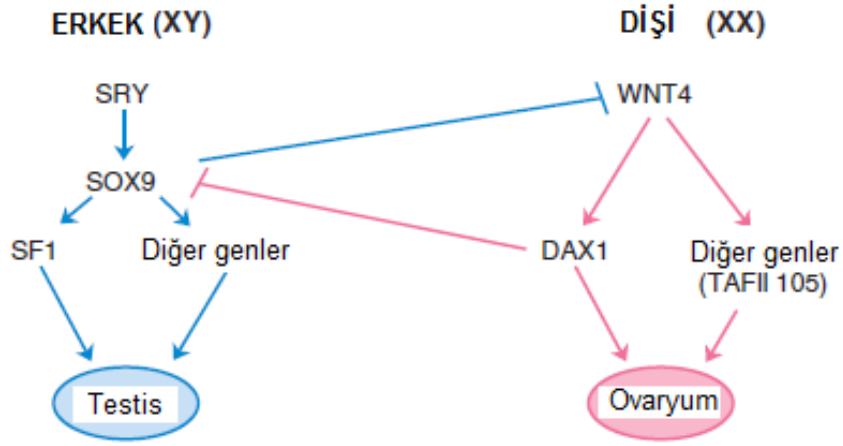
## 1.1.Testis

### 1.1.1.Testisin Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti genetik olarak fertilizasyon aşamasında Y kromozomunun varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak belirlenmiş olsa da, embriyonik gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar (testis ve over) dişi ya da erkek morfolojik özelliklerini taşımazlar. Erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesinin mümkün olmaması nedeniyle genital sisteminin bu başlangıç dönemine "seksüel gelişimin farklılaşmamış evresi" adı verilir (Sadler 2012, Moore ve diğ. 2016, Seçkin 2008).

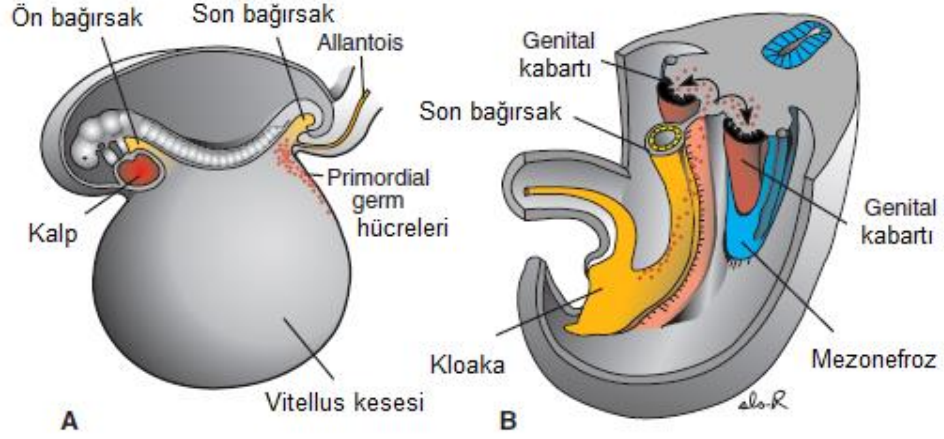
Gonadlar, üç farklı kaynaktan köken alır. Bunlar; karın arka duvarını döşeyen mezotelyum (mezodermal kölom epiteli), bunun altında yer alan mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)'dir (Moore ve diğ. 2016, Coşgun ve Aras 1998, Şeftalioğlu 1998).

Gonadlar, ilk olarak gelişimin 5. haftasında retroperitoneal bölgede, mezonefrozun medialinde bulunan mezotelyumun proliferasyonu ve altında yer alan mezenşimin yoğunlaşması ile oluşmuş olan bir çift longitudinal (uzunlamasına) yerleşimli "genital kabartı" ya da "gonadal sırtlar" şeklinde ortaya çıkarlar. Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital kabartılar içerisinde germ hücreleri bulunmaz. Her iki cinsiyette de bu genital kabartıların yapısı 6. haftada aynı olduğundan dolayı birbirinden ayırt edilemez ve bu evrede "farklanmamış gonad" olarak adlandırılır. Farklanmamış gonad, dış tarafında korteks ve iç tarafında ise medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XY kromozomuna sahip ise SRY (Sex-determining Region Y= cinsiyet belirleyici bölge Y) geni, SOX9 (SRY (sex determining region Y)-box 9), FGF9 (Fibroblast growth factor 9), WNT4 (*Wingless-type MMTV integration site family*, member 4), SF1 (Steroidogenic factor 1) ve DAX1 gibi diğer testis belirleyici genlerin aktivasyonu ile farklanmamış gonadın medullası testise farklılaşır, korteksi ise körelmiş kalıntılar dışında gerileyerek dejenere olur (Çizim 1.1) (Sadler 2012, Moore ve diğ. 2016, Coşgun ve Aras 1998, Seçkin 2008, Burgu ve Telli 2010, Wilhelm ve Koopman 2006).



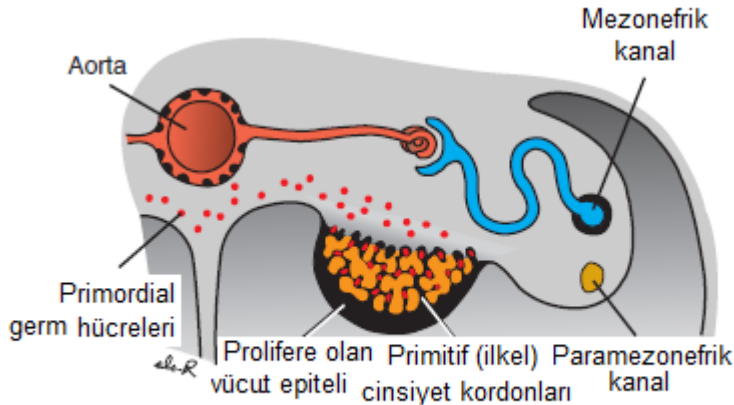
**Çizim 1.1.** Testis ve ovaryum farklılaşmasından sorumlu olan genlerin şematik olarak gösterilmesi (Sadler 2012).

Primordial germ hücreleri, embriyonik gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında yer alan endodermal hücrelerin arasında ortaya çıkarlar. Hücreler bu evrede ALP (alkalen fosfataz), Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), VASA, SSEA1 (stage-specific embryonic antigen 1), EMA1 (equi merozoite antigen gene), F9 (factor IX) ve tirozin kinaz reseptör c-kit eksprese etmeleri ile tespit edilebilirler. Embriyonun katlanmasıyla birlikte vitellüs kesesinin arka kısmı embriyonun içerisine girer. Bu sırada primordial germ hücreleri, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle göç ederek genital kabartılara 5. haftanın başında ulaşırlar ve 6. haftada da buraya yerleşmiş olurlar. Hücreler stella, fragilis genleri ve kemik morfogenetik protein 4 (BMP-4) etkisiyle bu yolu izleyerek genital kabartılara gelir ve buraya ulaşan hücrelerin göçleri sona erer. Eğer primordial germ hücreleri genital kabartılara ulaşamazlar ise gonadlar gelişemez. Primordial germ hücrelerinin, ilkel gonadların testise ya da overe farklılaşmasında indükleyici etkisi bulunmaktadır (Çizim 1.2) (Sadler 2012, Moore ve diğ. 2016, Moore ve Persaud 2009, Seçkin 2008, Simon 2007, Larsen 2003, Carlson 1996).



**Çizim 1.2.** A. Vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında ortaya çıkan primordial germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo. B. Primordial germ hücrelerinin, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle göç ederek genital kabartılara ulaşmasını gösteren bir embriyo kesiti (Sadler 2012).

Primordial germ hücrelerinin genital kabartılara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması esnasında genital kabartıların epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altlarında yer alan mezenşim içerisine doğru uzanarak "primitif (ilkel) cinsiyet kordonları" adı verilen düzensiz şekilli yapıları oluştururlar. Primitif cinsiyet kordonları yüzey epiteli ile ilişkidir (Çizim 1.3) (Sadler 2012, Moore ve diğ. 2016, Coşgun ve Aras 1998, Şeftalioğlu 1998).

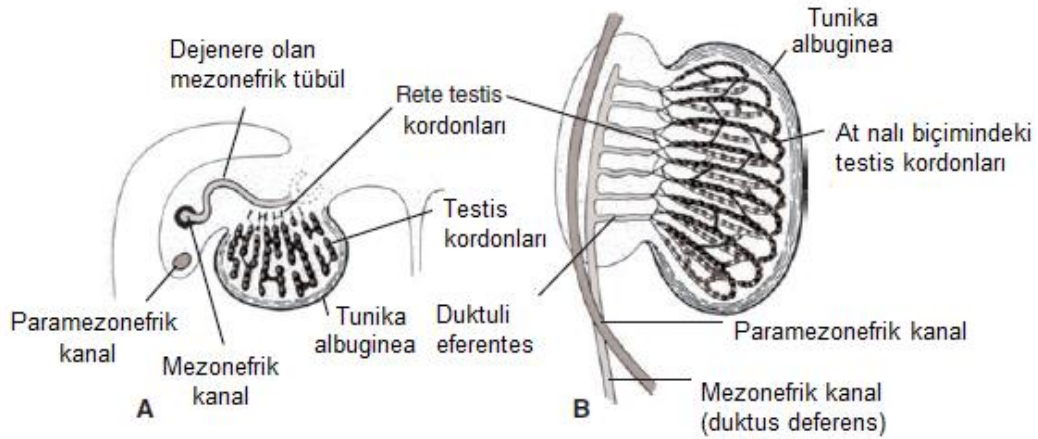


**Çizim 1.3.** Primitif (ilkel) cinsiyet kordonlarını gösteren altı haftalık bir embriyonun enine kesiti (Sadler 2012).



Cinsiyet kromozomunun tipi fertilizasyonla sağlanır, bu da farklanmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir. Testis ya da over yönünde gelişen gonadın tipi, daha sonra dış genitalerde ve genital kanallarda oluşan cinsiyet farklılaşmasını belirlemektedir. Eğer embriyo genetik olarak erkek ise, primordial germ hücreleri XY cinsiyet kromozomuna sahiptir. Y kromozomunun kısa kolu (Yp11) üzerinde yer alan SRY geninin protein ürünü olan TBF (Testis Belirleyici Faktör), primitif cinsiyet kordonlarının "testis kordonlarını" ya da "medullar kordonları" oluşturmak üzere çoğalmaya devam ederek medullanın derinliklerine doğru ilerlemesini sağlar. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru daha sonra rete testis tübüllerini oluşturmak üzere dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde, yoğun bağ dokusu içeren bir kapsül olan tunika albuginea'nın gelişmesi ile testis kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantıları sona erer (Sadler 2012, Şeftalioğlu 1998, Carlson 1996, Hassa 2003, Seçkin 2008).

Gelişimin dördüncü ayında, testis kordonları at nalı şeklini alarak uçları rete testis ile devam eder. Bu aşamada testis kordonları, primordial germ hücrelerini ve gonadın yüzey epiteli olan mezodermal kölom epitelinden köken alan Sertoli hücrelerini içerir (Çizim 1.4) (Sadler 2012, Şeftalioğlu 1998, Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006).



**Çizim 1.4.** A. Gelişimin sekizinci haftasında testisten geçen ve tunika albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren enine kesit. B. Testis ve genital kanalların dördüncü aydaki görünümü (Sadler 2012).

Genital kabartıya ait olan mezenşimden köken alan Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), testis kordonlarının arasında yer alır ve bu kordonların farklanmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Leydig hücreleri, gestasyonun 8. haftasından itibaren androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) üretmeye

başlar. Bu hormonlar, mezonefrik kanalların (Wolffian) ve dış genital organların erkek yönünde farklılaşmasını uyarırlar. Testosterona ek olarak, fetal testislerde yer alan Sertoli hücreleri tarafından AMH (Antimüllerian hormon) ya da MIS (Müllerian Inhibiting Substance) adı verilen glikoprotein yapıda bir hormon salgılanır. Bu hormon uterus, serviks, tuba uterina ve vajinanın üst kısımlarına farklılaşan paramezonefrik (Müllerian) kanalların gelişimini baskılar. AMH hormonunun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır (Sadler 2012, Gürsoy ve Koptagel 1997, Carlson 1996, Kierszenbaum 2006, Moore ve diğ. 2016, Hassa 2003, Şeftalioğlu 1998).

Puberteye kadar solid (tek parça) halde bulunan testis kordonlarının lümenleri puberteyle birlikte açılarak seminifer tübüleri oluştururlar. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur. Bunlar, testisin yüzey epitelinden köken alan Sertoli hücreleri ve primordial germ hücrelerinden farklılaşan, sperm hücrelerinin öncülleri olan spermatogonyumlardır. Seminifer tübüller kanalize olduğunda rete testis tübüleriyle birleşerek duktuli efferenteslere açılırlar. Duktuli efferentesler, duktus epididimisi oluşturan mezonefroz kanalı ile bağlanır. Duktus epididimisi de tek bir kanal olan duktus deferens ile birleşir (Sadler 2012, Gürsoy ve Koptagel 1997, Carlson 1996, Kierszenbaum 2006, Moore ve diğ. 2016, Hassa 2003, Şeftalioğlu 1998).

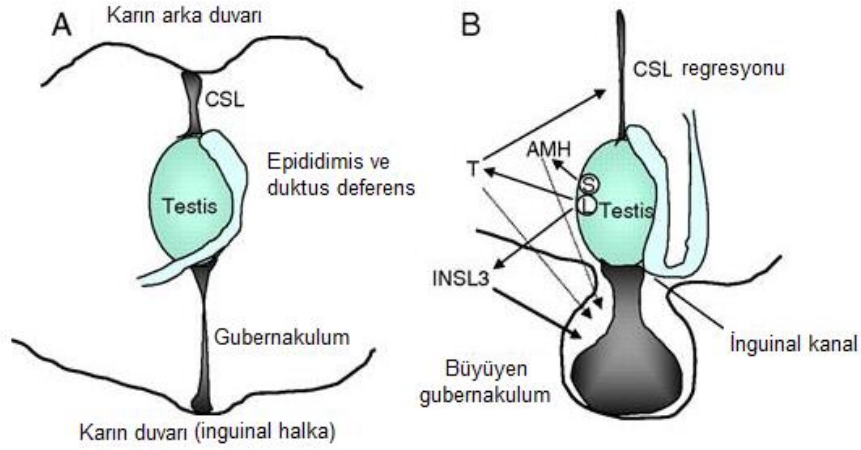
Gelişimin ilerlemesi ile genişlemeye devam eden testis, kademeli olarak dejenere olan mezonefrozdan ayrılarak kendi mezenteri olan mesorchium ile asılı duruma geçer. Fetal testisin yüzey epiteli yassılaşılarak yetişkin testisin dış yüzeyinde bulunan mezoteli oluşturur (Sadler 2012, Gürsoy ve Koptagel 1997, Kierszenbaum 2006, Moore ve diğ. 2016, Hassa 2003, Şeftalioğlu 1998).

#### **1.1.1.1. Testislerin İnisi**

İkinci ayın sonunda testisler mezonefrozun ventromedialine yerleşmiştir ve karın arka duvarına ürogenital mezenter ile kranial ve kaudalde iki ligament arasında asılı durumda bulunmaktadır. Bu ligamentler; cranial suspensory ligament (CSL= kranial asıci ligaman) ve genito-inguinal ligament (Gubernakulum)'dir. Gubernakulum, zengin hücre dışı matriksten oluşan yoğun mezenşimal bir yapıdır. Gubernakulum, processus vaginalis (PV)'den inguinal kanalların meydana gelmesi esnasında, ona ön karın duvarı boyunca bir yol oluşturur. Processus vaginalis, karın boşluğunu çevreleyen peritonun, karın ön duvarının orta hattının her iki yanında evajinasyonlar (cepler) oluşturmasıyla şekillenir. Müsküler ve fasiyel tabakalarla birlikte skrotal şişliğe doğru ilerleyen processus vaginalis, internal inguinal kanalın oluşmasını sağlar (Sadler 2012, Irkılata ve Alp 2012).

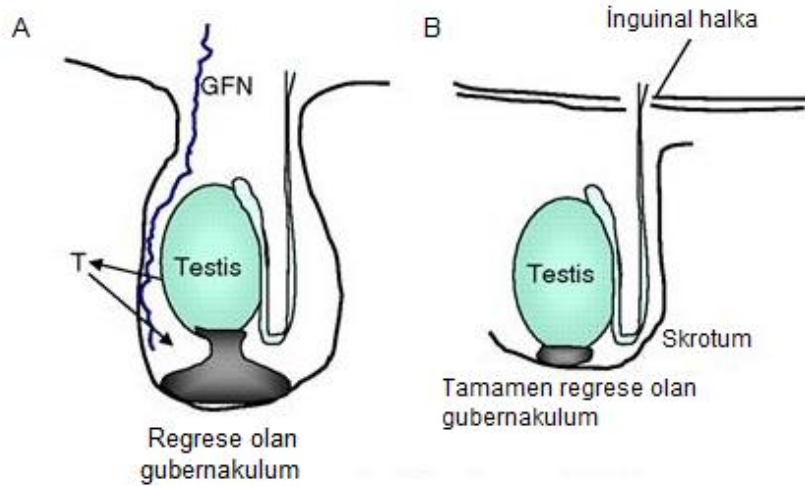
İnsanlarda testislerin iniş i iki ana evrede incelenir. Bunlar; transabdominal migrasyon (göç) evresi ve inguinokrotal iniş evresi (Hutson ve diğ. 1997, Ağras 2012, Irkılata ve Alp 2012).

İlk evre olan transabdominal migrasyon evresi; intrauterin gelişimin 10. ile 15. haftaları arasında, cinsel organlar gelişmeye başladıktan hemen sonra gerçekleşmektedir. Testiküler iniş in transabdominal migrasyon fazının gerçekleşebilmesi için, CSL'nin gerilemesi ve gubernakulumun ise genişleyerek olgunlaşması gerekmektedir. Bu evrede CSL'nin gerilemesini testosteron etkiler. Testisin transabdominal migrasyonu sırasındaki gubernakulum gelişimini ise, fetal testisin Leydig hücreleri tarafından üretilen INSL3 (Insulin-like 3= relaksin) hormonu uyarmaktadır. INSL3 hormonu gubernakulumda eksprese edilen LGR8 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8) isimli reseptöre bağlanarak bir şişme reaksiyonu (mezenkimal proliferasyon ve hyaluronik asit artışı) meydana gelir. Bu etkiyi MIS salınımı daha da artırır. Şişme reaksiyonu sonucunda gubernakulum kısalır, vücudun büyümesine paralel olarak uzamaz ve böylece 12. haftada fetal testisi oluşacak olan internal inguinal kanal yakınında tutmuş olur. Daha sonra 28. haftanın sonuna kadar devam eden bir duraklama zamanı olur ve testisler bu dönemde internal halka seviyesinde kalmaya devam ederler. Testislerin internal inguinal kanal girişinde sabit durduğu evrede duraklamanın nasıl sağlandığı ve bu dönemde ne gibi değişiklikler olduğu henüz bilinmemekle birlikte, muhtemelen genitofemoral sinire (GFN) giden L1 ve L2 duyuşsal sinir köklerinin maskulinizasyonu sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Duraklama esnasında gubernakulum ve PV, inguinal kanal yolu ile skrotuma doğru hareket ederek testiküler iniş için bir yol hazırlarlar (Çizim 1.5) (Ağras 2012, Irkılata ve Alp 2012, Hutson ve diğ. 1997, Zimmermann ve diğ. 1999).



**Çizim 1.5.** INSL3-bağımlı transabdominal migrasyon evresi. A. Y kromozomunun varlığında farklanmamış gonadın testisler ayrışması. B. Gelişmekte olan Sertoli hücrelerinden AMH'nin ve Leydig hücrelerinden testosteron ve INSL3'ün üretilmesi (Foresta ve diğ. 2008).

İkinci evre olan inguinokrotal iniş evresinde ise testisler inguinal kanaldan geçerek skrotuma yerleşirler ve iniş 35. hafta sonunda tamamlanır. Gubernakulumun kaudal kısmının bulböz yapısında, ekstrasellüler matriksin kaybı ile birlikte yeniden şekillenme söz konusu olmaktadır. Bu evrede gubernakulumun ve PV'nin uzaması, GFN (genitofemoral nerve)'yi etkileyerek kalsitonin gen-bağımlı peptid (CGRP) salınımına yol açan androjenlerin kontrolünde gerçekleşir (Çizim 1.6) (Ağras 2012, Hutson ve Hasthorpe 2005).



**Çizim 1.6.** Androjen-bağımlı inguinokrotal iniş evresi. A. Muhtemelen GFN ve CGRP vasıtasıyla, AMH ve androjenler tarafından gubernaküler kordun kısılması ve gubernaküler bulbusun büyümesi. B. Testislerin inguinal bölgeden skrotuma inişi (Foresta ve diğ. 2008).

Normal bir testiküler inişten sonra PV doğumdan önce tamamen kapanır ve involüsyona (normale dönme, gerileme) uğrar. Bu süreçteki bir anormallik asending (inmemiş) testisin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durum inguinal kanalın iç halkasının açık olması ile sonuçlanır. Doğumdan sonra testislerden birisinin ya da her ikisinin pelvis boşluğunda veya inguinal kanal içerisinde yerleşmiş olma durumları “kriptorşidizm” olarak adlandırılır. Kriptorşidizm sonucunda, pelvis boşluğunda ya da inguinal kanal içindeki yüksek ısı nedeniyle olgun spermatozoa üretilemez ve yaygın olarak infertilite (kısırlık) gözlenir. Kriptorşidizme sahip yenidoğanların 2/3’ünde genellikle 6 ay içerisinde kendiliğinden testiküler iniş görülür (Ağras 2012, Wenzler ve diğ. 2004, Burgu ve Telli 2010).

### **1.1.2. Testisin Anatomisi**

Testis (Orchis); abdominal kavitenin dışında, penis ve symphysis pubis’in altında yer alan, deri ve fibromuskuler yapıda bulunan kese şeklindeki skrotumun içerisine yerleşmiş olan ovoid şekilli bir çift organdır. Testisler birbirinden septum scroti ile ayrılmıştır. İnsanda testis 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde, 3 cm kalınlığında ve 20-30 g ağırlığındadır. Yetişkin bir bireyde ortalama testis hacmi 15-25 mL’dir (Snell 2000, Krstic 1994, Kumanov ve Agarwal 2016, Curry ve Tempkin 2016).

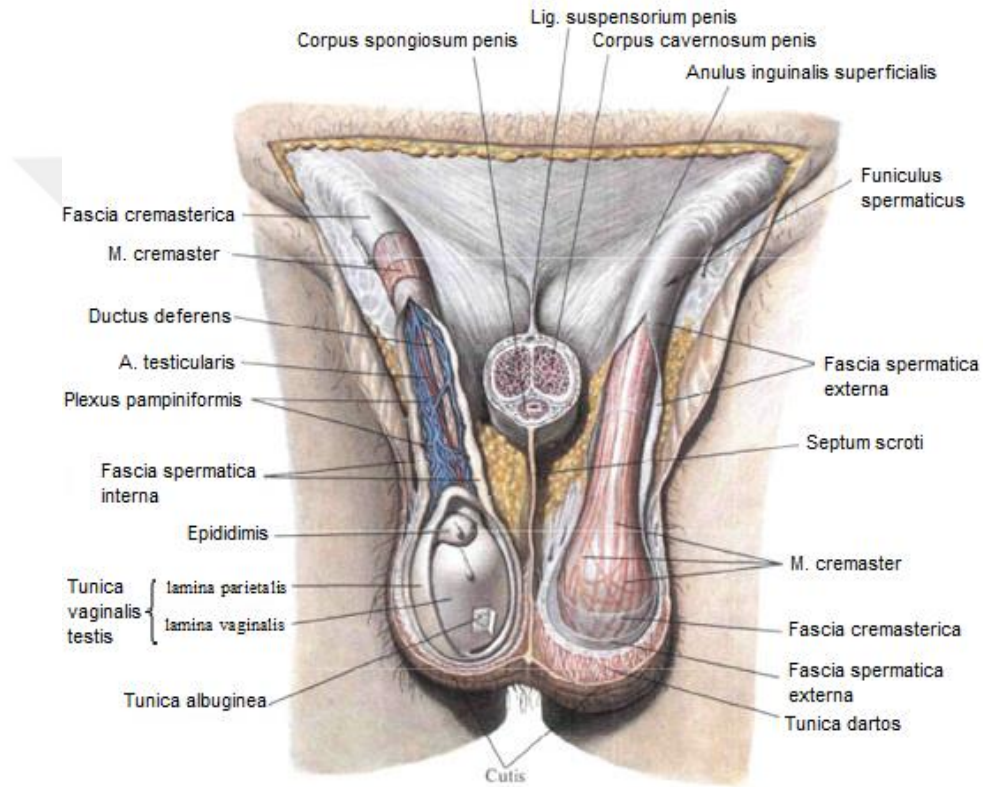
Testisler skrotumun içerisinde funiculus spermaticus’a asılı bir şekilde yerleşmiştir. Sol funiculus spermaticus daha uzundur ve bu da sol testisin, sağdakinden biraz daha aşağıda olmasına neden olmaktadır. Bu sayede iki testis yan yana gelmemiş olur. Bu durum hem ısı kontrolü, hem de sıkışma, ezilme ya da travmalardan koruma sağlar. Funiculus spermaticus’u içten dışa doğru; fascia spermatica interna, fascia cremasterica ile m. cremaster ve fascia spermatica externa çevreler (Coşgun ve Aras 1998, Ozan 2004, Arıncı ve Elhan 2001, Moore 2016, Yıldırım 2006, Drake ve diğ. 2007, Moore ve Dalley 2007).

Her bir testisin ön ve arka kenarı (margo anterior, margo posterior), iç ve dış yüzü (facies medialis, facies lateralis), üst ve alt ucu (extremitas superior, extremitas inferior) vardır (Arıncı ve Elhan 2001, Cumhuriyet ve diğ. 2001, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Snell 2004).

Testisler fütal hayatta karın boşluğu içerisinde, fasya transversalis ve periton arasında gelişir. Doğumdan önce ise inguinal kanaldan skrotum içine geçiş yapar. Karın ön duvarı tabakalarına da uzantıları bulunan tabakalar yer alır. Bu tabakalar çizelge 1.1 ve çizim 1.7’de gösterilmektedir (Aktümsek 2006, Arıncı ve Elhan 2006).

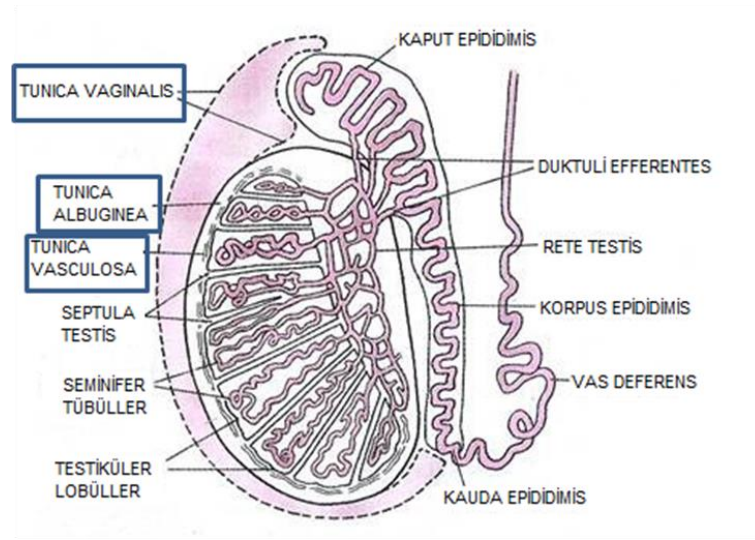
Çizelge 1.1. Testise ait tabakalar (Aktümsek 2006)

Skrotum	Deri
	Tunica dartos
Fascia spermatica externa	
Fascia cremasterica	
Fascia spermatica interna	
Tunica vaginalis testis	



Çizim 1.7. Testise ait tabakalar ([http://en.shram.kiev.ua/health/anatomy/page\\_2106.shtml](http://en.shram.kiev.ua/health/anatomy/page_2106.shtml))

Testisler dıştan içe doğru sırasıyla; tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak adlandırılan üç kılıf (capsula testis) tarafından sarılıdır (Çizim 1.8) (Yücel 2003, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Cumhuriyet ve diğ. 2001, Moore ve Agur 2006).



**Çizim 1.8.** Testislerin etrafını saran üç kılıf (capsula testis) yapısı (<http://www.yourarticlelibrary.com/biology/notes-on-human-male-reproductive-system-and-its-components/11846/>)

İki yapraklı seröz bir yapısı olan “tunica vaginalis”, kısmen testisi saran kapalı bir periton kesesidir ve embriyonik olarak PV’nin kapanan distal artığı şeklindedir. Testislerin funiculus spermaticus ve ductus epididimis’e tutundukları yerlerin dışında kalan yüzeylerini, ductus epididimis’in ve ductus deferens’in alt bölümlerini tunica vaginalis’in lamina visceralis (epiorchium) tabakası sarar. Skrotumun iç yüzünü ise tunica vaginalis’in mezotel ile kaplı olan lamina parietalis (periorchium) tabakası sarar. Lamina visceralis ve lamina parietalis arasında cavum serosum scroti denilen içi sıvı dolu bir boşluk yer alır. Böylece testislerin skrotum içerisinde kısmen hareket etmesi sağlanır (Yıldırım 2008, Sadler 2012, Cumhuriyet ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Moore ve Agur 2006, Moore ve Dalley 2007, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003).

“Tunica albuginea” testis dokusunu dıştan saran, lamina visceralis’in hemen altında yer alan ve en belirgin şekilde görülen kılıftır. Sıkı bağ dokusundan yapıldır ve mavimsi-beyaz renktedir. Kollajen liflerden zengin sert bir katmandır. Tunica albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşma yaparak mediastinum testis (Corpus highmori) yapısını oluşturur. Mediastinum testis; testise ait damar, sinir ve kanalların giriş çıkış yaptığı bölgedir. Mediastinum testis’in ön ve yan bölgesinden çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Bu fibröz uzantılar, testisin parankimasında ilerleyerek tunica albuginea’nın iç yüzüne doğru ışınal olarak uzanır ve organı piramidal şekilli 250-300 adet lobuli testis denilen lobüllere ayırır. Lobuli testislerin tepe kısımları mediastinum testise yönelirken taban kısımları ise periferine doğrudur. Her bir lobuli testis; 1-4 adet tubuli seminiferi contorti (Tubulus

seminifer convolutus= seminifer tübül) ismi verilen, çok sayıda kan damarları ile lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri içeren gevşek bağ dokusu tarafından sarılmış, kıvrıntılı tüplerden meydana gelir. Testiste bulunan 250-300 adet lobuli testis'te yaklaşık olarak toplam 600-1000 tane tubuli seminiferi contorti yer alır (Cumhur ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Gartner ve Hiatt 2007, Henrikson ve diğ. 1997, Ross ve Pawlina 2006, Snell 2004).

Tubuli seminiferi contorti'lerin çapları 150-250 µm ve uzunlukları ise 30-70 cm kadardır. Kıvrıntılı yapıda olan tubuli seminiferi contorti'ler kr bir uçla başlar, mediastinum testise bakan kısımlarında lümenleri daralır, düzleşerek birbirleriyle birleşip tubuli seminiferi recti adı verilen 20-30 adet kısa kanalları oluştururlar. Tubuli seminiferi recti'lerin çapları genişleyerek 0,5 mm olur, mediastinum testise uzanarak ve birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis (Haller ağı) denilen yapıyı oluştururlar. Rete testis (Haller ağı), mediastinum testis olarak adlandırılan kalınlaşmış tunica albuginea'nın üst kısmında bulunur. Rete testis, küçük kanalcıklar olan 12-15 adet ductuli efferentes testis'e açılır. Duktuli efferentes testisler, tunica albuginea'yı delerek caput epididimis'e açılırlar ve burada genişleyip daha kıvrımlı bir Şekil alarak konik yapıdaki lobülleri meydana getirirler. Duktuli efferentes testisler, caput epididimis'te tek bir kanal olan ductus epididymis'e açılırlar. Ductus epididymis ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak ductus deferens'e dönüşür (Cumhur ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Gartner ve Hiatt 2007, Henrikson ve diğ. 1997, Ross ve Pawlina 2006, Snell 2004, Moore ve Agur 2006).

"Tunica vasculosa" tunica albuginea'nın alt kısmında yer alan ve capsula testis'in en içte bulunan tabakasıdır. Damardan zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır. Tunica albuginea'nın testis parankimasına doğru yaptığı uzantıların i yüzünü örterek ve tübüllerin arasını doldurarak tüm lobuli testisler'i sarmış olur (Cumhur ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Snell 2004, Moore ve Agur 2006).

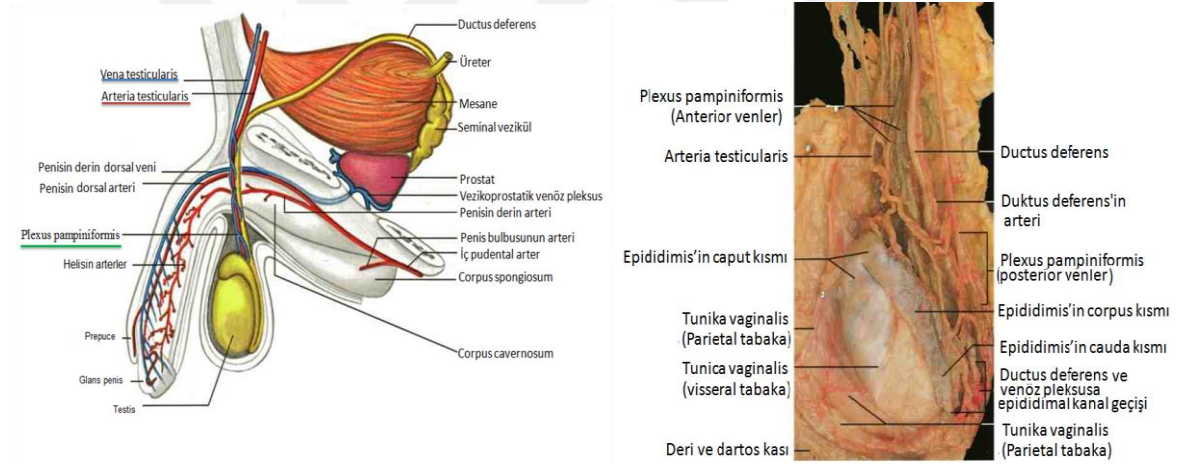
#### **1.1.2.1. Testis'in Kan Damarları, Lenf Dolaşımı ve Sinirleri**

Testisler, a. renalis'lerin biraz altında aorta abdominalis'in anterolateral yüzünden ayrılan bir dal olan a.testicularis'ler tarafından beslenir. Her iki tarafın a.testicularis'i; eğik bir uzanımla retroperitoneal bölgeye geçerek ureter, n. genitofemoralis ve a. iliaca externa'nın alt parçasını nden çaprazlar. Anulus inguinalis profundus'tan geçip kanala girerek burada ilerler. Daha sonra anulus inguinalis superficialis'ler aracılığıyla kanaldan çıkararak funiculus spermaticus'a girer ve mediastinum testis'te birçok dala ayrılarak testisi kanlandırır. A. testicularis ya da dallarından biri, a. ductus deferentis ile anastomoz yapar



(Cumhur ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Snell 2004, Moore ve Dalley 2007, Aktümsek 2001, Coşgun ve Aras 1998, Sancak ve Cumhur 2002).

Testislerde yer alan v. testicularis, testis ile epididimis'ten çıkarak venöz bir ağ olan plexus pampiniformis'i oluşturmak üzere birleşirler. Plexus pampiniformis, 8-12 venden oluşur ve funiculus spermaticus içerisinde ductus deferens'in ön kısmında a.testicularis'i sarar (Çizim 1.9). Plexus pampiniformis, testisi sabit ısıda tutarak ısı düzenleyici bir rol üstlenir. Sağ ve sol v. testicularis'ler plexus pampiniformis'ten çıktuktan sonra sol v. testicularis, v. renalis sinistra'ya dökülür; sağ v. testicularis ise v.cava inferior (VCI)'a açılır. Bu nedenle sol v. testicularis içinde basınç daha yüksektir (Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Moore ve Dalley 2007, Aktümsek 2001, Coşgun ve Aras 1998, Sancak ve Cumhur 2002, Drake ve diğ. 2007).



**Çizim 1.9.** Testisin kan damarları olan a. testicularis, v. testicularis ve plexus pampiniformis'in gösterimi (Rohen ve diğ. 2011).

Testislerin lenf damarları, yüzeysel ve derin olmak üzere iki grupta yer alır. Yüzeysel lenf damarları tunika vaginalis'in yüzeyinde uzanırken, derin lenf damarları ise testis ve epididimis'in içerisinde seyrederek ve funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerek nodi aortici laterales ve nodi preaortici'ye açılırlar (Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Coşgun ve Aras 1998, Cumhur ve diğ. 2001, Sancak ve Cumhur 2002).

Testislerin sinirsel uyarımı otonom sinirler tarafından sağlanır. Bu otonom sinirler, a. testicularis'in çevresindeki plexus testicularis'ten kaynaklanır. Plexus testicularis'i; n. vagus'tan gelen parasempatik lifler, medulla spinalis'in T 10-11. segmentlerinden gelen

sempatik ve viseral afferent lifler oluşturur (Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Coşgun ve Aras 1998, Sancak ve Cumhuriyet 2002, Moore ve Persaud 2002).

### 1.1.3. Testisin Histolojisi

Erkek üreme organları (organa genitalia masculina); skrotum içerisine yerleşmiş olarak bulunan bir çift testis, genital kanallar (testis içi ve dışı boşaltım kanalları), yardımcı üreme bezleri ve penisten oluşur. Testisler, hem ekzokrin hem de endokrin olarak görev yapan birleşik tübüler yapıda bezlerdir. Testislerin ekzokrin görevi, puberte dönemiyle birlikte erkek üreme hücresi olan spermatozoonların üretilmesi olan spermatogenezis'dir. Spermatogenezis sırasında meydana gelen hücre bölünmesi olayları hem mitoz hem de mayoz bölünmeyi içerir. Endokrin görevi ise, erkek cinsiyet hormonları androjenlerin sentezlenmesi, depolanması ve salgılanması olan steroidogenesis'dir. Başta testosteron olmak üzere üretilen androjenler, spermatogenezis için gereklidir, erkek embriyonun fenotipik olarak erkek fetusa gelişiminde önemli rol oynar ve cinsel dimorfizmden (fiziksel ve davranışsal erkek özellikleri) sorumludur. (Junqueira ve Carneiro 2009, Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Henrikson ve diğ. 1997).

Testisler; abdominal kavitenin dışında, penis ve symphysis pubis'in altında yer alan, deri ve fibromuskuler yapıda bulunan kese şeklindeki skrotumun içerisine yerleşmiş olarak bulunur. Skrotum, testislerin normal işlevini yapabilmesi için vücut ısısından daha düşük bir ısı olan 35 °C'de tutulmalarını sağlar. Spermatogenezis için çok önemli olan 35 °C sıcaklık; spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu plexus pampiniformis ile, musculus cremaster'in ve skrotum kesesinin dartos kasının ortam sıcaklığına göre kasılıp gevşemesiyle ve skrotumda yer alan ter bezleri sayesinde skrotumda sağlanır. Plexus pampiniformis sayesinde testislere giren sıcak arteriyel kan (37 °C), testisten dönen daha düşük sıcaklıkta olan (35 °C) venöz kan ile soğutulur ve böylece testisin sıcaklığının düşük tutulmasına yardımcı olur. Testisin ven ve arterlerinin bu şekilde bir arada ilerlemesi Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES- Countercurrent Heat Exchange System) olarak adlandırılır (Dahl ve Herrick 1959, Waites ve Moule 1961, Harrison 1975, Short 1997, Thonneau ve diğ. 1998, İlhan 2003).

Testisler, fetal gelişim sırasında karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişerek göç ederler ve skrotum içerisinde funiculus spermaticus'a asılı olarak dururlar. Gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle testisler, tunica vaginalis adı verilen peritondan gelişmiş olan seröz bir keseyi de beraberinde getirirler. Tunica vaginalis, skrotumun iç yüzünü örten mezotel ile kaplı olan lamina parietalis (periorchium) tabakası

ve testisin ön kenar ve yan yüzlerini saran lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki katmandan oluşur. Lamina visceralis ve lamina parietalis arasında cavum serosum scroti denilen içi sıvı dolu bir boşluk yer alır. (Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Coşgun ve Aras 1998, Ozan 2004, Arıncı ve Elhan 2001, Moore 2016, Yıldırım 2006, Drake ve diğ. 2007, Moore ve Dalley 2007).

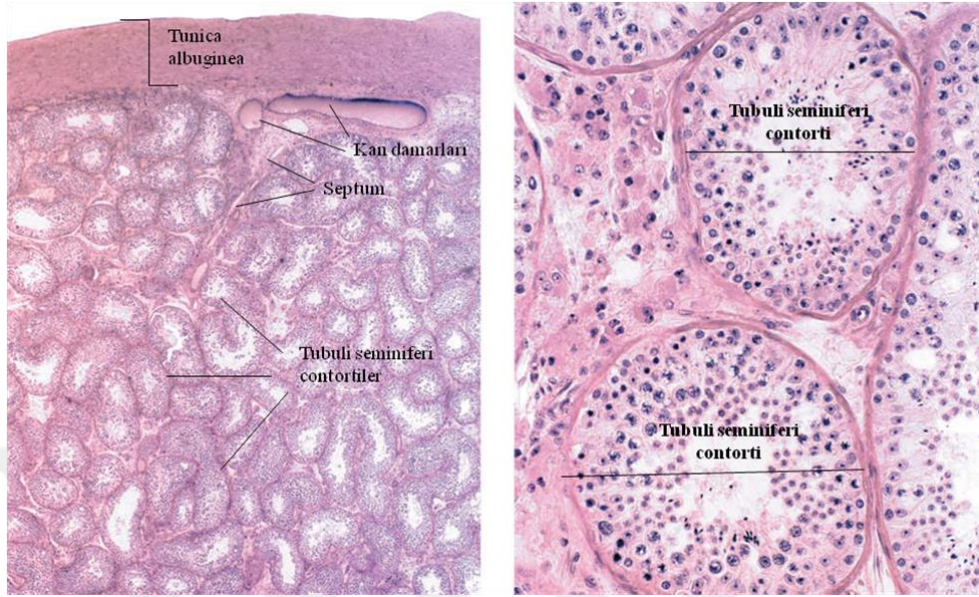
Tunica vaginalis'in lamina visceralis katmanının hemen altında kollajen liflerden zengin sıkı bağ dokusundan yapılmış sert bir tabaka olan tunica albuginea yer alır. Tunica albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşma yaparak testise ait damar, sinir ve kanalların giriş çıkış yaptığı bölge olan mediastinum testis (Corpus highmori) yapısını oluşturur. Mediastinum testis'in ön ve yan bölgesinden çıkan uzantılara "septula testis" adı verilir. Bu fibröz uzantılar, testisin parankimasında ilerleyerek tunica albuginea'nın iç yüzüne doğru ışınal olarak uzanır ve organı piramidal şekilli 250-300 adet lobuli testis denilen lobüllere ayırır. Lobuli testislerin tepe kısımları mediastinum testise yönelirken taban kısımları ise perifere doğrudur. Her bir lobuli testis; 1-4 adet tubuli seminiferi contorti ismi verilen, gevşek bağ dokusu tarafından sarılmış olan kıvrıntılı tüplerden meydana gelir. Tubuli seminiferi contorti'leri saran gevşek bağ dokusunda çok sayıda kan damarları ile lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreler olan Leydig hücreleri bulunur. Testiste bulunan 250-300 adet lobuli testis'te yaklaşık olarak toplam 250-1000 tane tubuli seminiferi contorti yer alır. Tubuli seminiferi contorti'lerde erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar üretilirken, interstisyel hücreler olan Leydig hücrelerinden testis androjenleri salgılanır (Cumhur ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Gartner ve Hiatt 2007, Henrikson ve diğ. 1997, Ross ve Pawlina 2006, Snell 2004, Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

Testisleri saran kapsülün en iç kısmında ise kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusu yapısında olan tunica vasculosa yer alır. Tunica albuginea'nın testis parankimasına doğru yaptığı uzantıların iç yüzünü örterek ve tübüllerin arasını doldurarak tüm lobuli testisler'i sarmış olur (Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2006, Cumhur ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003, Snell 2004, Moore ve Agur 2006).

#### **1.1.3.1. Tubuli Seminiferi Contorti (Tubulus seminifer convolutus = Seminifer tübül)**

Tubuli seminiferi contorti'ler testisin parankimasını oluştururlar. Her bir testiste yaklaşık olarak 250-1000 adet tubuli seminiferi contorti yer alır. Spermatogenezisin gerçekleştiği bu kıvrıntılı yapıların etrafını yoğun bir kapiller ağ sarmıştır. Her bir tubuli

seminiferi contorti yaklaşık olarak 150-250 µm çapına ve 30-70 cm uzunluğa sahiptir. Bir testiste yer alan seminifer tübüllerin toplam uzunluğu ise yaklaşık olarak 250 metre kadardır (Çizim 1.10).



**Çizim 1.10.** Tubuli seminiferi contorti'lerin histolojik görüntüsü (Ross ve Pawlina 2006).

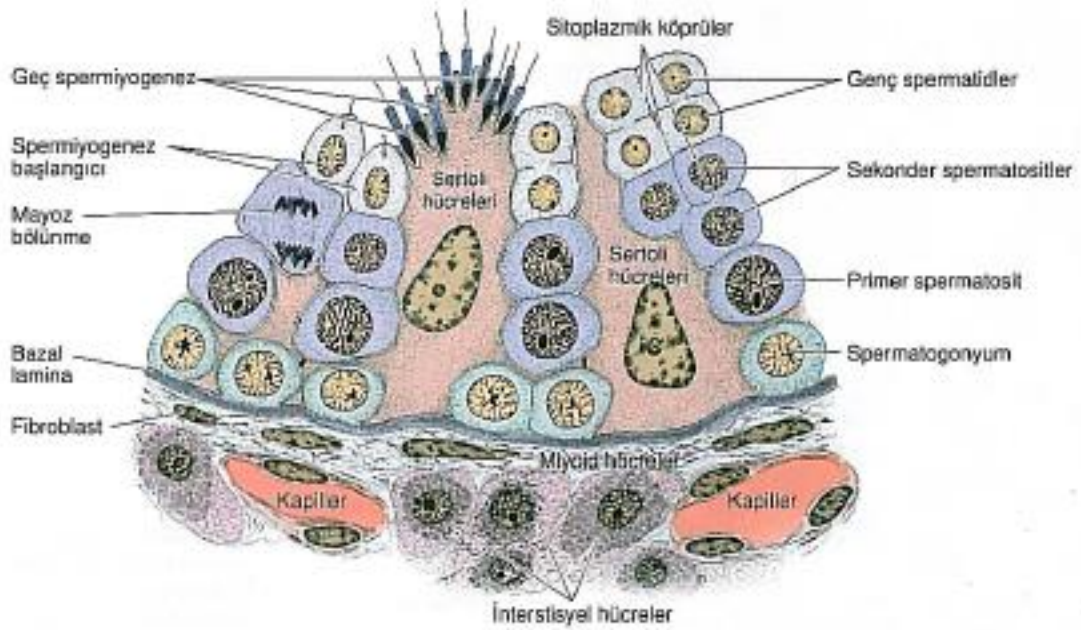
Tubuli seminiferi contorti'ler kör bir uçla başlarlar ve mediastinum testis'e bakan kısımlarında birbirlerine doğru yaklaşarak kısa, dar, düz olarak devam eden tubuli seminiferi recti olarak adlandırılan 20-30 adet kısa kanalları oluştururlar. Testis içi boşaltım kanallarından olan tubuli seminiferi recti'lerin çapları genişleyerek 0,5 mm olur, mediastinum testise uzanarak ve birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis (Haller ağı) denilen yapıyı oluştururlar. Rete testis (Haller ağı), mediastinum testis olarak adlandırılan kalınlaşmış tunica albuginea'nın üst kısmında bulunur. Rete testis, küçük kanalcıklar olan 12-15 adet ductuli efferentes testis'e açılır. Duktuli efferentes testisler, tunica albuginea'yı delerek caput epididimis'e açılırlar ve burada genişleyip daha kıvrımlı bir şekil alarak konik yapıdaki lobülleri meydana getirirler. Duktuli efferentes testisler, caput epididimis'te tek bir kanal olan ductus epididymis'e açılırlar. Ductus epididymis ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak ductus deferens'e dönüşür (Gartner ve Hiatt 2007, Henrikson ve diğ. 1997, Ross ve Pawlina 2006, Snell 2004, Moore ve Agur 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Cumhuriyet ve diğ. 2001, Arıncı ve Elhan 2001, Ozan 2004, Yıldırım 2006, Yücel 2003).

Tubuli seminiferi contorti'ler; fibröz bir bağ dokusu kılıfı, bazal membran ve çok katlı bir seminifer (germinal) epitelden oluşur. Tubuli seminiferi contorti'leri dıştan saran fibröz bir bağ dokusu kılıfı olan tunica propria, peritübüler doku olarak da adlandırılır ve interstisyel dokudan köken alır. İnfertil erkeklerin büyük bir kısmında bu peritübüler dokunun kalınlaştığı bilinmektedir. Bazal membrana yapışık olarak bulunan en içteki

katman tek tabaka şeklinde yerleşim gösteren, düz kas hücre özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücreleri içerir. Bu peritübüler miyoid hücreler, hem hareketsiz spermatozoonları rete testis'e ilerleten ritmik kasılma hem de sekresyon yapma özelliklerine sahiptirler. Kasılmaları ısı değişimlerine ve hormonlarla uyarıma son derece hassastır. Myoid hücrelerin sekresyon yapma özelliklerine bakıldığında; aktif olarak hücre dışı matriks bileşenleri olan fibronektin, tip-I kollagen salgıladıkları, parakrin bir etki gösteren P-Mod-S (peritubular modifies Sertoli) sentezledikleri ve iç kollagenöz tabakayı oluşturdukları görülür. P-Mod-S, Sertoli hücrelerinin gelişmesinde ve fonksiyonlarında önemlidir. Ayrıca testosteron sentezi, Sertoli hücrelerinin mezenşim ile etkileşimi ve Sertoli hücrelerinin sekresyonlarına etkili uyarıların iletilmesi gibi önemli işlevleri de bulunmaktadır. Tunica propria, oldukça iyi gelişmiş bir bazal membran ile seminifer (germinal) epitelden ayrılır. Bazal membran, Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen laminin, tip I kollagen ve tip IV kollagen içerir (Junqueira ve Carneiro 2009, Şeftalioğlu 1998, Anthony 1991, Wein ve diğ. 2012, Skinner ve Fritz 1986, Cigorraga 1994, Tung 1984, Maekawa 1996).

Tubuli seminiferi contorti'lerde bulunan seminifer (germinal) epitel, çok katlı bir yapı gösterir ve iki tip hücre içerir (Çizim 1.11). Bunlar:

1. Sertoli hücreleri (Epitheliocytus sustentans, Sustentacular cells, Destek hücreleri)
2. Spermatojenik hücreler (Cellulae spermatogenicae)



**Çizim 1.11.** Tubuli seminiferi contorti epiteli (Junqueira ve Carneiro 2009).

### **1.1.3.1.1. Sertoli Hücreleri (Epitheliocytus sustentans, Sustentacular cells, Destek hücreleri)**

Sertoli hücreleri ilk kez İtalyan fizyolog ve histolog olan Enrico Sertoli tarafından 1865 yılında tanımlanmıştır. Sertoli hücrelerinin geniş tabanları bazal membrana otururken apikal uçları ise tubuli seminiferi contorti'lerin lümenine doğru uzanır. Uzun, piramidal şekilli hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral hücre membranları düzensiz sınırlara sahiptir. Gelişmekte olan spermatogenik hücrelere kriptalar sağlayarak, lümene ulaşmalarını sağlarlar. Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini saran çok sayıda yan uzantı içermesi nedeniyle sınırları iyi belirlenemez ve soluk renkli görülürler. Yaklaşık olarak 9-12 µm boyutundadırlar. Elektron mikroskopunda, Sertoli hücrelerinin çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum (SER) sisternaları, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternaları, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda uzun mitokondriyon, primer ve sekonder lizozomlar, bol miktarda mikrotübül, lipid damlacıkları, glikojen granülleri ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) içerdikleri görülmektedir. Üçgen biçiminde uzamış olan nukleusları bazale yerleşmiştir ve az miktarda heterokromatin içerir. Nukleus içerdiği çok sayıdaki girintiler nedeniyle düzensiz şekillidir. Nukleolus çok belirgindir ve merkeze yerleşmiştir. Nadir olarak sitoplazmanın tabanında protein yapıda olan Charcot-Böttcher kristaloidleri adı verilen inklüzyon cisimcikleri görülebilir. Son çalışmalarda nukleus yakınında yer alan, 10-25 µm boyunda ve 1 µm genişliğinde olan bu kristaloidlerin lipoprotein reseptör protein kümesinden oluştukları tespit edilmiştir. Bu durumun Sertoli hücrelerindeki lipid transportu ve kullanımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Henrikson ve diğ. 1997, Neill 2006).

Sertoli hücreleri, puberteye kadar tubuli seminiferi contorti'lerde yer alan epitelin baskın hücre tipleridir. Puberteden sonra ise tubuli seminiferi contorti'lerde yer alan epitelin %10'unu oluştururlar ve postmitotik hale gelirler. Daha ileri yaşlarda spermatogenik hücre popülasyonu düştüğünde, Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline dönüşürler.

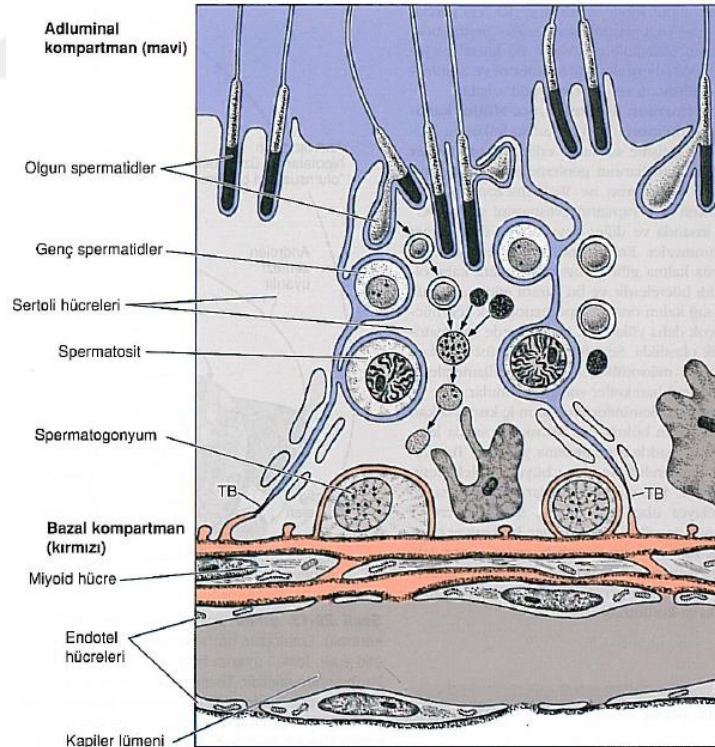
Sertoli hücreleri tubuli seminiferi contorti'ler arasında yer alan boşluk ile tübül lümeni arasında köprü hücreleri olarak görev yaparlar. Olumsuz şartlara ve yaralanmalara karşı spermatogenik hücrelere göre daha dayanıklıdırlar (Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Hassa 2003).

Yan yana yer alan Sertoli hücreleri birbirleri ile bazolateral bölgelerinde zonula okludens (tight junction, sıkı bağlantı) tipi bağlantılar yaparak, tubuli seminiferi contorti

lūmeninin çevresini saran kesintisiz bir hūcre tabakası oluřtururlar. Sertoli hūcrelerinin bazolateral bōlgede oluřturdukları bu zonula okludens tipi baēlantılar kan testis bariyerini oluřturarak, lūmenin altında yer alan bōlgeyi baē dokusundan gelen etkilere karřı korur. Kan-testis bariyeri spermatogenik hūcreler ile immūn sistem arasında geliřebilecek her tūrlū etkileřimi ortadan kaldırarak, antikorlar dahil proteinlerin geliřmekte olan spermatogenik hūcrelere ulařmasını engeller ve spermatogenik hūcreleri otoimmūn reaksiyonlara karřı korur. Aynı zamanda bu zonula okludens tipi baēlantı birimleri, seminifer (germinal) epiteli bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak iki ayrı bōlmeye ayırır (izim 1.12). Bu iki ayrı bōlme, spermatogenezis için dıř ortamdan izole ōzel bir mikroçevre saēlar. Zonula okludens tipi baēlantıların alt kısmında yer alan bazal kompartman dardır ve lūmene yakın olan adluminal kompartmanı çevreler. Bazal kompartman; interstisyel bořlukları, kan damarlarının lūmenlerini ve spermatogonyumlar tarafından doldurulan bōlgeleri içerir. Bazal kompartman içerisinde spermatogonyumlar ve genç primer spermatisitler (leptoten, zigoten) yer alırken, adluminal kompartman içerisinde ise olgun primer spermatisitler (pakiten), sekonder spermatisitler, spermatidler ve spermatozoa bulunur. Spermatogenezis sırasında spermatogenik hūcreler bu zonula okludens tipi baēlantılardan geçerek bazal kompartmandan, kan-testis bariyerinin ūzerinde yer alan adluminal kompartmana ulařırlar. Sertoli hūcrelerinin yan yūzlerinde ayrıca gap junction tipi baēlantılar (oluklu baēlantılar) bulunur ve bu baēlantı birimleri iyonik ve kimyasal alıřveriři saēlarlar (Bloom ve Fawcett 1994, Fawcett 1997, Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Henrikson ve diē. 1997, Kalaycı 1986). Sertoli hūcrelerinin birçok iřlevi vardır. Bunlar;

1. Geliřmekte olan spermatogenik hūcrelerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin dūzenlenmesi,
2. Spermiyogenezis sırasında spermatidler tarafından atılan fazla sitoplazmik parçacıkların lizozomlar tarafından fagosite edilmesi ve sindirilmesi,
3. Spermiasyon adı verilen sūrete, aktin-aracılı kasılmalarla olgun spermatozoonların tubuli seminiferi contorti lūmenine salınımının kolaylaştırılması,
4. Tubuli seminiferi contorti lūmenine genital kanallar yōnūnde akan ve sperm tařınması için kullanılan, protein ve iyondan zengin yapıda bir sıvının salgılanması,
5. Embriyonik geliřim sırasında erkek fetūste Mūller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini saēlayan glikoprotein yapıda Anti-Mūllerian hormon (AMH) sentezlenmesi,

6. Folikül uyarıcı hormon (FSH=Follicle Stimulating Hormone) ve testosteron kontrolü altında gerçekleşen, tubuli seminiferi contorti içerisinde spermatogenezis için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlayan androjen-bağlayıcı protein (ABP) salgılanması,
7. Aktivin alt ünitelerini ( $\alpha$  ve  $\beta$  alt üniteleri) salgılayarak hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve ön hipofiz bezinden salınan FSH üzerine pozitif feedback (geri bildirim) etki gösterilmesi,
8. İnhibin alt ünitelerini ( $\alpha$  ve  $\beta$  alt üniteleri) salgılayarak hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve ön hipofiz bezinden salınan FSH üzerine negatif feedback (geri bildirim) etki gösterilmesi,
9. Kan–testis bariyeri ile spermatositlerin ve spermatidlerin otoimmün yanıtı ve kandaki zararlı maddelere karşı korunmasının sağlanması,
10. Serum transferrin’den demiri alarak olgunlaşma sürecindeki spermatogenezis hücrelere taşıyan testiküler transferrin’in sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alınması (Junqueira ve Carneiro 2009, Kierszenbaum 2006, Gartner ve Hiatt 2007, De Kretser 2004, Şeftalioğlu 1998, Bloom ve Fawcett 1994).



**Çizim 1.12.** Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bazal ve adluminal kompartman (Junqueira ve Carneiro 2009).



### **1.1.3.1.2. Spermatogenik Hücreler**

Spermatogenik hücreler, bazal lamina ile lümen arasında yer alan, tubuli seminiferi contorti duvarını 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş bir şekilde döşeyen, düzenli olarak çoğalıp olgun spermatozoonlara farklılaşan hücrelerdir.

Seminifer (germinal) epitelin bazal kompartmanında yer alan ilkel germ hücresi olan spermatogonyumdan, olgun üreme hücresi olan spermatozoon (spermium) oluşuncaya kadar geçen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve farklılaşma süreci 'spermatogenezis' olarak isimlendirilir. Spermatogenezis, puberteden kısa bir süre önce, hipofizden salınan gonadotropinlerin sayesinde başlar ve hayat boyu sürer. Spermatogenezis, tüm tubuli seminiferi contorti'lerde ve her tübül içinde aynı anda gerçekleşmez. Bir dalgalanma şeklinde gerçekleşir. Böylece spermatogenezis her bölgede farklı bir evrede seyrederek, düzensiz bir görünüm alır. Bu nedenle tubuli seminiferi contorti'lerin bazı bölgelerinde sadece spermatidler bulunurken, diğer bölgelerinde spermatozoonlar da bulunmaktadır (Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009).

Spermatogenezisin tüm evreleri spermatogenik hücre katmanlarında gerçekleşir. Hücreler olgunlaştıkça bazal kompartmandan lümene doğru geçiş yaparlar. Bazal laminadan lümene doğru hücre çeşitleri; spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar şeklinde sıralanır (Sadler 2012 Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2006, Orhan 2006, Şeftalioğlu 1998).

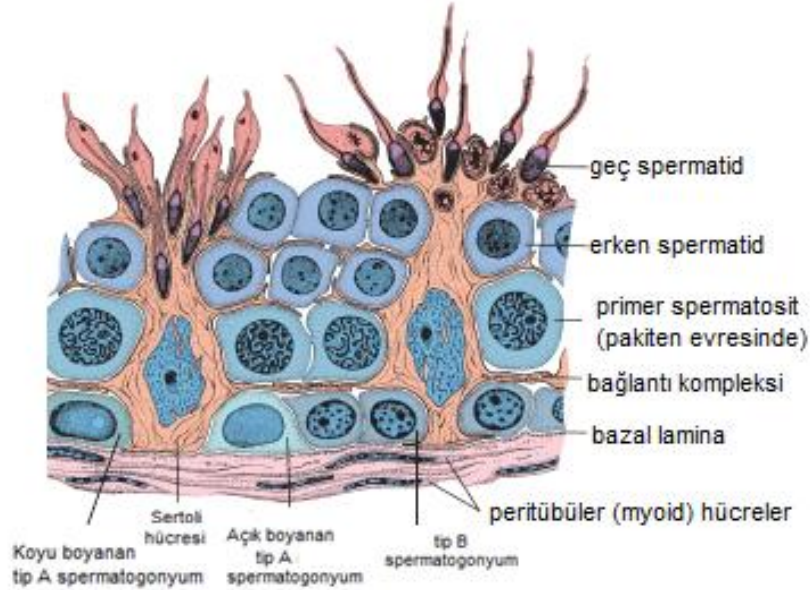
#### **1.1.3.1.2.1. Spermatogonyumlar**

Spermatogonyumlar, kan-testis bariyerinin altında yer alan bazal kompartmanda, bazal membranın hemen üstünde yer alırlar.

Primordial germ hücrelerinden farklılaşan ve diğer tipteki spermatogenik hücrelerin öncülleri olan spermatogonyumlar; diploid kromozoma sahip, yaklaşık 12 µm çapında, serideki diğer hücelere göre daha küçük ve soluk renkte boyanan nukleusa sahip olan hücrelerdir. Puberteye kadar tubuli seminiferi contorti duvarında spermatogenik hücre olarak sadece spermatogonyumlar bulunur. Pubertenin başlaması ile hormonal etki sonucu bu hücreler mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve diğer tip hücreleri oluşturur. (Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Maekawa 1996).

Seminifer (germinal) epitelde nukleuslarının görünümüne göre üç tip spermatogonyum tanımlanır. Bunlar; koyu boyanan tip A (Ad, dark type A) spermatogonyumlar, açık boyanan tip A (Ap, pale type A) spermatogonyumlar ve tip B

spermatogonyumlar (Çizim 1.13) (Maekawa 1996, Ross ve Pawlina 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Wein ve diğ. 2012, Nieschlag ve Behre 2001).



**Çizim 1.13.** Seminifer (germinal) epitelde yer alan spermatogonyumlar (Ross ve Pawlina 2006).

**Koyu boyanan tip A (Ad, dark type A) spermatogonyumlar:** Seminifer (germinal) epitelin kök hücreleridirler. Spermatogonial kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri bulunmaktadır. Kısmen sessiz hücreler oldukları için kanser kemoterapisine ve radyasyona karşı dirençlidirler. Yoğun bazofilik boyanan, ince granüler kromatinli ve oval şekilli nukleus içerirler. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirerek yeni hücre tiplerini oluştururlar. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir: koyu boyanan tip A (Ad, dark type A) spermatogonyumlar halinde kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da açık boyanan tip A (Ap, pale type A) spermatogonyumları oluştururlar.

**Açık boyanan tip A (Ap, pale type A) spermatogonyumlar:** Hormonal uyarılar ile mitoz bölünme geçirerek tip B spermatogonyumlara farklanan, ökromatik nukleusa ve belirgin nukleolusa sahip olan hücrelerdir. Tip B spermatogonyumlara dönüşmeden önce sırasıyla A1, A2, A3, A4 ve daha sonra ara (intermediate) spermatogonyumları oluştururlar.

**Tip B spermatogonyumlar:** Mitoz bölünme geçirerek primer spermatozitelere farklanan, yuvarlak şekilli nukleusa sahip olan ve koyu renkte boyanan hücrelerdir. Nukleus çevresinde ve nukleus zarı (karyoteka) boyunca yoğunlaşmış kromatin içerirler

(Wein ve diğ. 2012, Junqueira ve Carneiro 2009, Gartner ve Hiatt 2007, Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Nieschlag ve Behre 2001, Maekawa 1996).

#### **1.1.3.1.2.2. Primer ve Sekonder Spermatozitler**

Primer spermatozitler, tip B spermatogonyumların mitoz bölünme geçirmeleri sonucu oluşur. Bu hücreler, tubuli seminiferi contortide yer alan spermatogenik serideki en büyük hücrelerdir ve seminifer (germinal) epitelin orta kısmında yer alırlar. Primer spermatozitler,  $2N=46$  kromozom ( $44+XY$ ) ( $N$ : haploid kromozom sayısı [insanlarda= $23$  kromozom]) ve  $4C$  DNA ( $C$ : kromozom takımındaki DNA [Deoksiribonükleik asit] miktarı) içerirler. Primer spermatozitler oluştuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Profaz evresi yaklaşık olarak 22 gün sürer. Bu nedenle kesitlerde görülen spermatozitlerin çoğu bu evrededir (Junqueira ve Carneiro 2009, Kierszenbaum 2006, Şeftalioğlu 1998).

Birinci mayoz bölünmenin sonunda sekonder spermatozitler oluşur. Sekonder spermatozitler,  $N=23$  kromozom ( $22+X$  ya da  $22+Y$ ) ve  $2C$  DNA içeren, yoğun kromatin bulunduran nukleusa sahip daha küçük hücrelerdir. İnterfazda çok kısa bir süre kalan ve hızla ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücreler oldukları için sekonder spermatozitlerin testis kesitlerinde görülmesi zordur. İkinci mayoz bölünmenin sonunda her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid kromozoma sahip hücreler olan spermatidler oluşur. Sonuçta, primer spermatozitler peş peşe iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarını yarıya indirmiş olurlar ve haploid sayıda spermatidler oluşmuş olur. Mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içerisinde adluminal kompartmanda gerçekleşir. Tip A spermatogonyumlardan spermatidlerin oluşumuna kadar geçen çoğalma ve farklanma süreci boyunca sitokinesis tamamlanmamış olduğundan dolayı hücreler sitoplazmik köprüler ile birbirlerine bağlanmış durumdadırlar. Böylece birbirleri ile olan ilişkilerini koruyarak spermatogenezisi düzenlerler. Ayrıca farklanma süreci boyunca spermatogonyumlar ve spermatidler Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarındaki girintilere gömülü olarak kalırlar (Çizim 1.11) (Sadler 2012, Junqueira ve Carneiro 2009, Gartner ve Hiatt 2007, Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Nieschlag ve Behre 2001, Şeftalioğlu 1998).

#### **1.1.3.1.2.3. Erken ve Geç Dönem Spermatozitler**

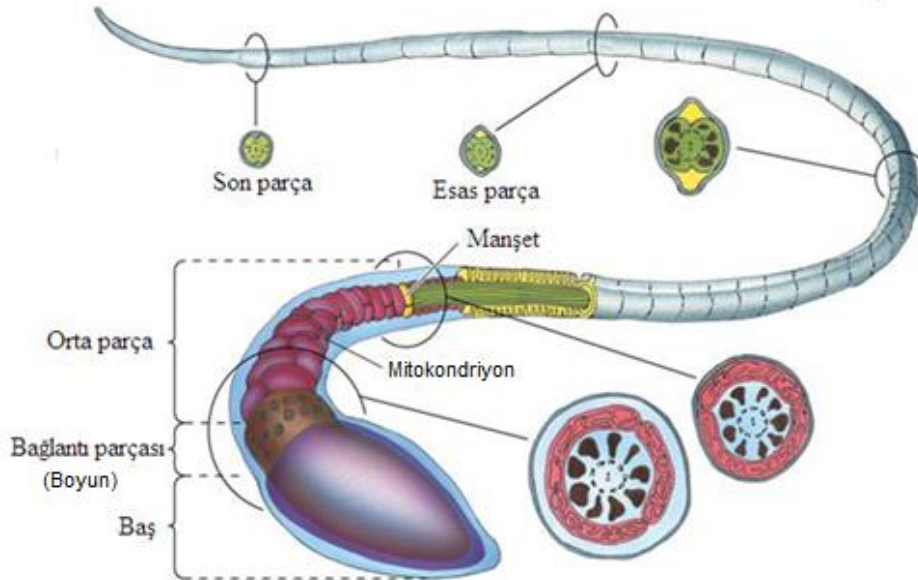
Erken dönem ya da round (yuvarlak) spermatidler,  $N=23$  kromozom ( $22+X$  ya da  $22+Y$ ) ve  $1C$  DNA içeren, lümene yakın adluminal kompartmanda yerleşmiş,  $7-8$   $\mu\text{m}$  boyunda, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları ile ayırt edilen, oval ya da yuvarlak şekilli küçük hücrelerdir. Sitoplazmaları, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi,

mitokondriyonlar, serbest ribozomlar, düz endoplazmik retikulum tübüleri ve bir çift sentriyol içerir.

Spermatidler bölünmeye uğramazlar. Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu yapısal değişiklikler; akrozom oluşumu, flagellum şekillenmesi, kromatin kondensasyonu (yoğunlaşması) ve fazla sitoplazmanın atılmasıdır. Spermatidin bu yapısal değişikliği geçirdiği dönem, geç dönem spermatid ya da elongated (uzamış) spermatid evresi olarak adlandırılır (Çizim 1.11) (Wein ve diğ. 2012, Junqueira ve Carneiro 2009, Cheng 2008, Delilbaşı 2008, Gartner ve Hiatt 2007, Kierszenbaum 2006, Nieschlag ve Behre 2001, Vicdan ve Işık 1999).

#### 1.1.3.1.2.4. Spermatozoonlar (Spermiumlar)

Olgun germ hücreleri olan spermatozoonlar, ortalama 60 µm uzunluğundadırlar. Baş ve kuyruk olmak üzere iki ana kısımdan oluşurlar (Çizim 1.14) (Bloom ve Fawcett 1994).



**Çizim 1.14.** Olgun spermatozoon yapısı (Gartner ve Hiatt 2007).

**Baş:** Yaklaşık olarak 4.5-5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında olan kısımdır. Spermatozoonların baş kısmı yassıdır. Başın büyük bir kısmını oluşturan nukleus, N=23 kromozoma sahiptir ve yassılaştırmış bir şekli, yoğun bir yapısı vardır. Nukleusun 2/3 ön kısmı hidrolitik enzimleri (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluridaz, akrosin, nöraminidazlar) içeren akrozomla örtülüdür. Akrozomal enzimler oositi saran korona radiata ve zona pellucida'ya spermatozoon girişini kolaylaştırmak için fertilizasyon

(dölllenme) sırasında salınır ve korona radiata hücrelerini ayırarak zona pellucida'yı eritir (Gartner ve Hiatt 2007, Sternberg 1997).

**Kuyruk (Flagellum):** Boyun kısmı, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan oluşur.

Boyun kısmı: Yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Kuyruk kısmının başa bitişik olan kısa ve dar bir bağlantı parçasıdır. Nukleusa tutunmuş proksimal sentriyolü ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolü bulundurur. Kuyruğun geri kalan kısmının dokuz adet dış yoğun fibriller ile tutunmuş olan bağlantı parçasını içerir.

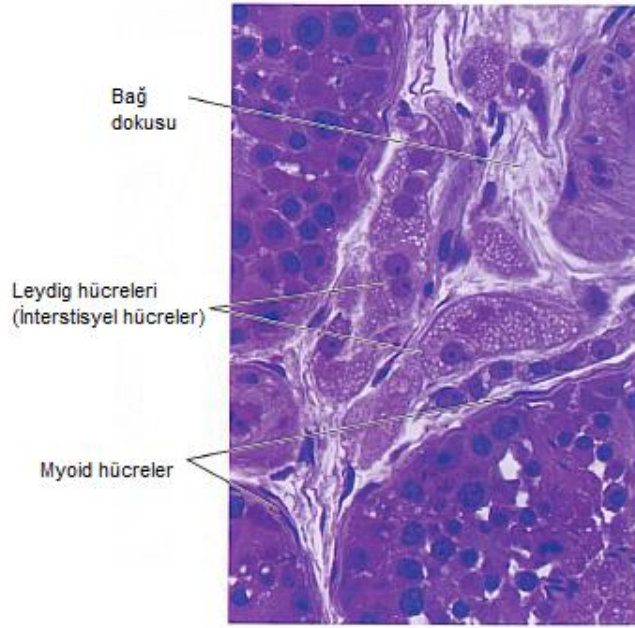
Orta parça: Boyun ile esas parça arasında uzanan bu kısım yaklaşık 7 µm uzunluğundadır. Çevrede dairesel olarak düzenlenmiş mitokondriyonlar vardır. Mitokondriyonlar, kuyruğun hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlarlar. Bu parçada, kuyruk yapısının %50'sini oluşturan ve kuyruk sonuna doğru incelerek kaybolan dış dens (yoğun) fibröz lifler yer alır.

Esas parça: Kuyruğun en uzun parçası olan bu kısım, yaklaşık 45 µm uzunluğundadır. Dış dens (yoğun) lifle sarılı olan merkezi aksonem ve fibröz bir kılıftan oluşur. Bu yapılar spermatozoonların öne hareketi sırasında mikrotübüllerin kayması ve kıvrılması için sağlam bir iskelet oluşturur. Fibröz kılıf üzerinde enerji düzeni ve hücre sinyalizasyonu ile görevli olan kinaz-A bağlayıcı protein 3 (AKAP3), kinaz-A bağlayıcı protein 4 (AKAP4) ve testis spesifik kinaz-A bağlayıcı protein (TAKAP) bulunmaktadır.

Son parça: yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Dış dens (yoğun) liflerin ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı sadece aksonemi içeren kuyruğun en kısa parçasıdır (World Health Organization 2010, Xu 2014, Gartner ve Hiatt 2007, Ozan 2004, Bloom ve Fawcett 1994, Sternberg 1997).

### 1.1.3.2. İnterstisyel Bağ Dokusu ve Leydig hücreleri

Tubuli seminiferi contorti'ler arasında yer alan interstisyel (ara) bağ dokusu, testis kütlelerinin yaklaşık %25-30'unu oluşturur. Çeşitli hücrelerden (fibroblast, makrofaj, mast hücresi, lenfosit, plazmosit, farklılaşmamış mezenkim hücreleri), kan damarlarından, lenf damarlarından ve sinirlerden zengin gevşek bir bağ dokusu yapısındadır. Puberte döneminde bu hücrelere ek olarak, Leydig hücreleri ya da interstisyel hücreler de fonksiyonel olarak belirgin hale gelir. Androjen üretimi açısından büyük bir önem taşır Testisin kılcal damarları pencere tiptedir ve kan proteinleri gibi büyük moleküllerin geçişine izin verir. Bu dokuda ince kollagen ve retiküler lifler bulunur (Çizim 1.15) (Junqueira ve Carneiro 2009, Kierszenbaum 2006).



**Çizim 1.15.** İnterstitial Bağ Dokusu ve Leydig hücreleri (Junqueira ve Carneiro 2009).

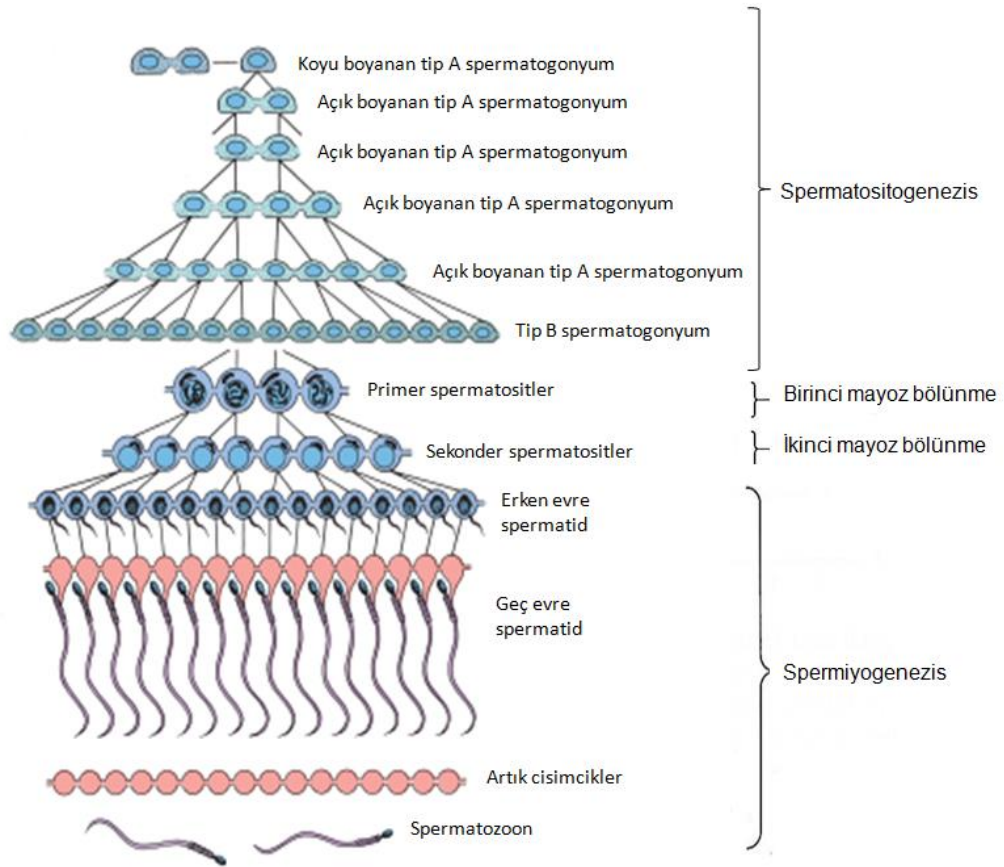
Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), kan damarları ve lenfatik kanal ya da sinüzoidler yakınında, interstisyel bağ dokusu içerisinde yerleşmiş olarak bulunurlar. Bu hücreler, 15-20 µm çapındadırlar. Poligonol şekilli, merkezi yerleşimli olan nukleusları ökromatiktir ve bir ya da iki nukleolus içerirler. Sitoplazmaları eozinofilik boyanan lipid damlacıkları içerirler. Tüm steroid salgılayan hücrelerde olduğu gibi Leydig hücrelerinde de iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda küçük lipid damlacıkları, lizozomlar, tübüler kristal mitokondriyonlar, yaşın ilerlemesiyle artan lipofuskin pigment granülleri ile kristalize yapıdaki proteinler olan Reinke kristali ve öncülleri bulunur (Ovalle ve Nahirney 2009, Young ve Heath 2000).

Leydig hücreleri, sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumlu bir hormon olan testosteronun üretiminden sorumludur. Vücutta toplam testosteronun %5'i adrenal bezin (böbrek üstü bezinin) korteksinde üretilirken, %95'i Leydig hücreleri tarafından üretilir. Leydig hücrelerinin salgıladıkları bu testosteron hormonu spermatogenezin devamlılığını sağlamada oldukça önemli bir role sahiptir. Testosteron sentezi mitokondriyonlarda ve granülsüz endoplazmik retikulumlarda yer alan enzimler tarafından gerçekleştirilir. Leydig hücrelerinin sitoplazmaları eozinofilik boyanan küçük lipid damlacıklarından zengin olmasına rağmen salgılayıcı vezikül bulundurmazlar. Bunun nedeni; üretilen testosteron hormonunun depolanmadan, sentezi tamamlandıktan hemen sonra direkt olarak kana verilmesidir (Ovalle ve Nahirney 2009).

İnsanda gebelik sürecinde plasentadan üretilen gonadotropik hormon, maternal (anneye ait) kandan fötusa geçer ve androjenik hormonların üretimi sağlayan fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Bu hormonlar, intrauterin gelişim sırasında erkek fötusta genital organların farklılaşmasını sağlar. Gebeliğin 8 ile 18. haftaları arasında oldukça aktif olan fetal Leydig hücreleri, daha sonra gerilerler. Leydig hücreleri, puberteden önceki döneme kadar inaktif olarak bulunurken, pubertede testosteron salgılanması, spermatogenezis, yardımcı üreme bezlerinde salgının başlatılması ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesi için aktif olarak gereklidirler. Leydig hücrelerinin işlevini hormonal uyarılar düzenler. Luteinize edici hormon (LH= Luteinizing hormone) ile uyarılması sonucu Leydig hücreleri testosteron üretirken, Prolaktin hormonu ile LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenler (Ovalle ve Nahirney 2009, Junqueira ve Carneiro 2009, Gartner ve Hiatt 2007).

### 1.1.3.3. Spermatogenezis

Spermatogenezis, spermatogonyumdan olgun spermatozoa oluşumunu içeren bir süreci kapsamaktadır. Bu süreç, puberteden kısa bir süre önce, hipofizden salınan gonadotropinler sayesinde başlar ve hayat boyu devam eder (Çizim 1.16) (Sternberg 1997).



Çizim 1.16. Spermatogenezis sürecinin evreleri (Ross ve Pawlina 2006).

Daha önceki çalışmalar, insanlardaki tüm spermatogenezis sürecinin yaklaşık olarak 64 gün gerektirdiğini kabul etmişlerdir (Wein ve diğ. 2012, Clermont 1972). Ancak son zamanlarda yapılan *in vivo* kinetik bir çalışma, sağlıklı erkeklerde bu sürenin 42 ile 76 gün arasında değişmekte olduğunu ve spermatogenezis süresinin bireyler arasında geniş çapta değişebileceğini öne sürmektedir (Wein ve diğ. 2012, Misell ve diğ. 2006).

Spermatogenezis süreci üç ana bölümden oluşur. Bunlar;

1. Spermatositogenezis
2. Mayoz Bölünme
3. Spermiyogenezis (Sternberg 1997).

#### **1.1.3.3.1. Spermatositogenezis**

Spermatogonyumların mitozla çoğalarak primer spermatositlere farklılaşma aşamasıdır. Seminifer (germinal) epitelin farklılaşmamış kök hücreleri olan Ad spermatogonyumlar puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirek yeni hücre tiplerini oluştururlar. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir: Ad spermatogonyumlar halinde kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da Ap spermatogonyumları oluştururlar. Ap spermatogonyumlar oluşuktan sonra hormonal uyarılar ile mitoz bölünme geçirek tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar. Sertoli bariyerinden geçen her bir tip B spermatogonyum, mitoz bölünme geçirek daha büyük yuvarlak hücreler olan primer spermatositlere farklılaşırlar. Primer spermatositler, 2N kromozom ve 4C DNA içerirler. Primer spermatositler oluşuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler (Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014, Wein ve diğ. 2012, Nieschlag ve Behre 2001).

#### **1.1.3.3.2. Mayoz Bölünme**

Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye girer. Profaz evresi yaklaşık olarak 22 gün sürer. Bu nedenle kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu evrededir (Junqueira ve Carneiro 2009, Kierszenbaum 2006, Şeftalioğlu 1998). Birinci mayoz bölünmenin sonunda sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler, N kromozom ve 2C DNA içerirler. İnterfazda çok kısa bir süre kalan ve hızla ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücreler oldukları için sekonder spermatositlerin testis kesitlerinde görülmesi zordur. İkinci mayoz bölünmenin sonunda her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (N) kromozoma sahip hücreler olan spermatidler oluşur. Sonuçta, primer spermatositler peş peşe iki mayoz bölünme geçirek kromozom sayılarını yarıya indirmiş olurlar ve haploid sayıda spermatidler oluşmuş olur.



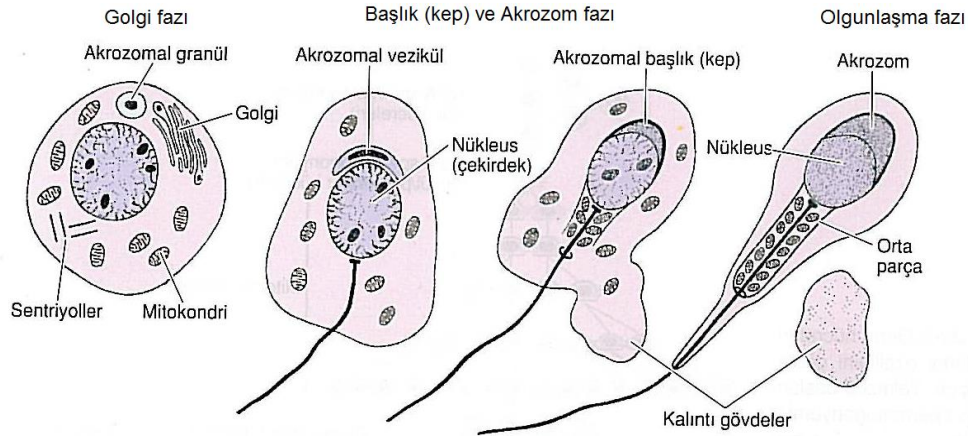
Birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde hücreler leptoten, zigoten, pakiten ve diploten şeklinde dört faz geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar. Birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin pakiten fazında, homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında gen alış verişi olan krossing-over gerçekleşir. Daha sonra hücreler metafaz evresine girer ve metafaz evresini takip eden anafaz safhasında, eşleşmiş homolog kromozomlar iğ iplikleri ile zıt kutuplara doğru çekilirler. İkinci mayotik bölünme sırasında profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarından sonra kardeş kromatidler yavru hücreler olan spermatidlere dağılırlar. Birinci mayoz bölünme ve ikinci mayoz bölünme arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediği için ikinci mayoz bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid spermatidler meydana gelir. Bu hücrelerin normal diploid sayıya dönmeleri ancak fertilizasyon ile mümkün olur. Mayoz bölünme sürecindeki indirgeyici işlev nedeniyle, kromozom sayısının türler için sabit olarak belirli bir miktarda kalması sağlanır (Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Wein ve diğ. 2012).

Mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içerisinde adluminal kompartmanda gerçekleşir. Tip A spermatogonyumlardan spermatidlerin oluşumuna kadar geçen çoğalma ve farklanma süreci boyunca sitokinesis tamamlanmamış olduğundan dolayı hücreler sitoplazmik köprüler ile birbirlerine bağlanmış durumdadırlar. Böylece birbirleri ile olan ilişkilerini koruyarak spermatogenezisi düzenlerler. Ayrıca farklanma süreci boyunca spermatogonyumlar ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarındaki girintilere gömülü olarak kalırlar (Sadler 2012, Junqueira ve Carneiro 2009, Gartner ve Hiatt 2007, Kierszenbaum 2006, Ross ve Pawlina 2006, Nieschlag ve Behre 2001, Şeftalioğlu 1998).

Erken dönem ya da round (yuvarlak) spermatidler, N kromozom ve 1C DNA içerirler. Mayoz bölünme sonucu meydana gelen spermatidler bölünmeye uğramazlar, Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek bir dizi yapısal değişikliğe uğrayarak spermiyogenezis adı verilen bir farklılaşma sürecini başlatırlar. Bu yapısal değişiklikler; akrozom oluşumu, flagellum şekillenmesi, kromatin kondensasyonu (yoğunlaşması) ve fazla sitoplazmanın atılmasıdır. Spermatidin bu yapısal değişikliği geçirdiği dönem, geç dönem spermatid ya da elongated (uzamış) spermatid evresi olarak adlandırılır (Wein ve diğ. 2012, Junqueira ve Carneiro 2009, Cheng 2008, Delilbaşı 2008, Gartner ve Hiatt 2007, Kierszenbaum 2006, Nieschlag ve Behre 2001, Vicdan ve Işık 1999).

### 1.1.3.3. Spermiyogenezis

Spermiyogenezis, spermatogenezisin son aşamasıdır ve spermatidlerin hücre bölünmesi gerçekleştirilmeden olgun germ hücreleri olan spermatozoonlara dönüştüğü bir süreçtir (Kierszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009). Spermiyogenezis dört faza ayrılmış şekilde incelenir ve bunlar (Çizim 1.17) (Kierszenbaum 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2006, Bloom ve Fawcett 1994):



**Çizim 1.17.** Spermiyogenezisin aşamaları (Junqueira ve Carneiro 2009).

#### **Golgi Fazı**

Çok sayıda Golgi kompleksinin bulunduğu bölgede, proakrozomal granüller olarak adlandırılan PAS (Periyodik Asit Schiff)-pozitif küçük granüllerin birikmesi ile karakterize bir dönemdir. Daha sonra glikoproteinden zengin içeriğe sahip olan bu proakrozomal granüller, nükleus zarı yakınındaki membranla sınırlı olan akrozomal veziküllerle birleşirler. Böylece membranla sınırlı bir akrozomal vezikülün içerisinde yer alan tek bir akrozom granülü haline dönüşürler. Bu bölge gelişen spermatozoonun ön kutbunu belirler.

Ayrıca bu dönemde sentriyoller göç ederek akrozomun olduğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Burada flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nükleusa doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem komponentleri çevresine sarılır (Junqueira ve Carneiro 2009, Eşrefoğlu 2009, Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2006).

#### **Başlık (Cap=kep) Fazı**

Bu fazda, akrozom vezikülü nükleusun ön yarısından daha fazlasını kaplayacak şekilde genişleyip şapka gibi bu bölümü örter Bu yapı akrozomal kep olarak isimlendirilir. Nükleus zarının buraya bakan bölümünde porlar kaybolur, nükleustaki yoğunlaşma devam

eder ve nukleus etrafını saran akrozomal kep kalınlaşır. (Eşrefoğlu 2009, Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2006).

### **Akrozom Fazı**

Akrozom; hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri aktivitesi olan proteaz gibi bazı hidrolitik enzimleri içerdiğinden dolayı lizozomun özelleşmiş bir tipi olarak görülmektedir. Bu enzimlerin, oositi çevreleyen korona radiata hücrelerini birbirinden ayırmada ve zona pellusidayı sindirmede işlev gördüğü bilinmektedir. Bu işlev akrozom reaksiyonu olarak adlandırılır ve fertilizasyonun ilk basamaklarından birini oluşturur.

Bu dönemde belirgin bir şekil değişikliği yaşanır. Spermatid kendisini yeniden düzenleyerek başını Sertoli hücresinin sitoplazmasının derinlerine doğru gömülü bir biçimde tutar. Gelişmekte olan flagellum iyice uzayarak tubuli seminiferi contorti lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nukleusu yassılaşıp uzar. Akrozom, hücre zarının apikal kısmına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mikrotübüller organize olarak silindirik bir kılıf şeklinde organize olurlar ve nukleusu çevreleyen manşet meydana gelerek spermatidin arka kısmına doğru ilerlerler.

Sentriyoller, nukleus arka yüzüne doğru göç ederek gelişmekte olan spermatozoonun boyun parçasını oluşturmak üzere değişime uğrarlar. Nukleusa bağlı olan sentriyolden kaynaklanan 9 adet kalın lif aksonemin mikrotübüllerinin periferinde yer alan dış dens (yoğun) lifler olarak flagellum içerisinde uzanır. Bu dış dens lifler, nukleus ve flagellumu birleştirdiklerinden dolayı bağlayıcı parça olarak isimlendirilirler. Plazma zarı flagellum yüzeyini kaplamak üzere arkaya doğru uzar ve silindir yapıdaki mikrotübül kılıfı kaybolur. Mitokondriyonlar flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça olarak isimlendirilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur ve bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağı olan yerdir. Orta parçanın distalinde yer alan iki longitudinal fibröz kolon ve çok sayıda bağlayıcı halka içeren fibröz kılıf, esas parçanın 9 adet longitudinal lifini çevreleyerek flagellumun ucuna yakın bir kısmına kadar ilerler. Fibröz kılıfın distalinde kalan, sadece aksonemi içeren bu kısa bölüm, son parça olarak adlandırılır (Junqueira ve Carneiro 2009, Eşrefoğlu 2009, Gartner ve Hiatt 2007, Ross ve Pawlina 2006).

Nukleusta yer alan kromatin yoğunlaşır. Somatik histonlar, arjinin ve lizinden zengin olan protaminlerle yer değiştirerek spermatozoonu özel histonlara dönüştürür (Kierszenbaum 2006).

## **Olgunlaşma Fazı**

Spermatid sitoplazmasının miktarında azalmanın görüldüğü son dönemdir. Spermatid sitoplazmasında artık cisimler oluşur ve bu artık cisimler spermiyasyon aşamasında bırakılarak Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilip ortadan kaldırılır. Mitokondriyonların gelişen flagellum boyunca dizilim göstermeleri tamamlanır. Flagellum, keratin içeren dış dens (yoğun) lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili durumdadır. Aksonem, eş merkezli 9+2 mikrotübül çifti içerir. Nükleus uzayarak yoğunlaşır ve manşetin kaudaline doğru ilerler. Olgunlaşma fazı, nükleus uzamış, yoğunlaşmış olarak son şeklini aldığı anda, manşet dağılmaya başladığında ve dış dens (yoğun) lifler tamamen organize olduğunda tamamlanmış olur (Bloom ve Fawcett 1994).

Spermatidler birbirleri ile olan bağlantılarını kaybederek, Sertoli hücrelerinden ayrılırlar ve lümeneye düşerler (Eşrefoğlu 2009, Junqueira ve Carneiro 2009).

### **1.1.4. Testisin Histofizyolojisi**

Testis dokusu ekzokrin ve endokrin fonksiyona sahip olan bir dokudur. Ekzokrin fonksiyonu spermiyogenezis ile spermatozoonları üretmek iken endokrin fonksiyonu ise androjenler olarak adlandırılan erkek cinsiyet hormonlarını salgılamaktır (Junqueira ve Carneiro 2009, Noyan 2005).

Hormonlar, spermatogenezis üzerindeki en önemli uyarılardır. Testisin endokrin işlevi, hipotalamusta yer alan nöroendokrin hücrelerden salgılanan Gonadotropin salgılatıcı hormon'un (GnRH= Gonadotropin Releasing Hormone) etkisi ile adenohipofizin pars distalis tabakasında bulunan gonadotrop hücreler tarafından üretilen gonadotropinler (FSH ve LH) tarafından düzenlenir. Bu gonadotropinler, testisin işlevini denetlerler (Junqueira ve Carneiro 2009, Noyan 2005).

FSH, Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını uyarır ve sonuçta döngüsel adenozin monofosfat (cAMP=cyclic adenosine monophosphate) artışına yol açar. Ayrıca Sertoli hücrelerinden Androjen bağlayıcı protein (ABP=Androgen-binding protein)'in sentez ve salgılanmasını sağlar. ABP, testosteron ile bağlanarak testosteronu tubuli seminiferi contorti lümenine taşır ve spermatogenezis için gerekli olan bu hormonun yoğunlaştırılmasını sağlar. Böylece spermatogenezisin uyarılması sağlanır. FSH'nin etkisiyle Sertoli hücrelerinden, GnRH ve FSH'nin salınımını inhibe eden 'inhibin' ve aktive eden 'aktivin' gibi proteinler de üretilir (Junqueira ve Carneiro 2009, De Kretser 2004, Ganong 2002, Patton 1989, Tok 2013).

LH, Leydig hücrelerini uyararak testosteron yapımını uyarır. Hipofiz bezinden FSH salgılanması negatif negatif feedback (geri bildirim) ile düzenlenmektedir. Testosteron

sentezi arttığında LH salınımı baskılanırken testosteron sentezi azaldığında LH salınımı artmaktadır (Junqueira ve Carneiro 2009, Gartner ve Hiatt, 2007, Ganong 2002, Patton 1989, Bullock ve diğ. 1994, Şahintürk ve Erçakır 1999).

Testisin esas hormonu, testisin interstisyel dokusunda yer alan Leydig hücreleri tarafından salgılanan, 17. Karbon atomunda –OH grubu taşıyan 19 Karbonlu steroid yapıdaki testosterondur. Testosteron hormonu, kolesterolden sentezlenir. Testosteron hormonu sentezi, LH hormonunun Leydig hücrelerini uyarmasıyla meydana gelir.

Leydig hücrelerinin LH tarafından uyarılması ise cAMP yoluyla gerçekleşir. cAMP, kolesterol esterden kolesterol oluşumunu artırır ve protein kinazın aktive edilmesi ile de kolesterolün pregnenolon'a dönüşmesi sağlanır. Biyosentez daha sonra pregnenolon üzerinden progesteron, androstenadion ve dehidroepiandrostenadion yolları ile gerçekleşir (Ovalle ve Nahirney 2009). Kolesterol, hem Leydig hücrelerinde 'de novo (yeniden)' olarak asetattan sentezlenebilmekte, hem de plazmada bulunan düşük molekül ağırlıklı lipoproteinler (sd-LDL= small dense-low-density lipoprotein) kaynak olarak kullanılabilir. İnsan Leydig hücreleri için temel ekstrasellüler kolesterol deposu, LDL (Low-density lipoprotein) kolesteroldür (Winters ve Troen 1986). LH, kolesterolün mitokondriyon içerisine taşınmasını (kısa süreli düzenleme) ve pregnenolonu metabolize eden enzimlerin profil ve aktivitelerini (uzun süreli düzenleme) kontrol ederek steroidogenezi düzenlemektedir (Keleşoğlu 2014).

Testosteronun salınımı, pulsatil (24 saatte 8-16 salınım) şeklindedir. Normal erişkin erkekteki testosteronun ortalama salgılanma hızı 4-9 mg/gün'dür. Sabah saat 08.00'de maksimum plazma düzeyine ulaşırken akşam saat 20.00'de en düşük düzeydedir. Yaşlanmayla birlikte bu sirkadiyen ritm kaybolmaya başlar (Kadioğlu 2004).

Plazmada yer alan testosteron'un %98'i proteine bağlı halde bulunmaktadır. %65'i gonadal-steroid bağlayıcı globulin (GBG) ya da seks steroidi-bağlayıcı globulin (SHBG) olarak adlandırılan bir  $\beta$ -globuline, %33'ü ise albumin'e bağlı olarak bulunmaktadır (Ganong 2002).

Testosteron hormonunun esas etki yeri olan prostatta ve diğer birkaç dokuda, 5 $\alpha$ -redüktaz enzimi aracılığı ile testosteron dihidrotestosteron'a çevrilir. Dihidrotestosteron, dış genital organların gelişiminin uyarılmasında son derece önemli bir etkiye sahiptir (Ganong 2002, Sadler 2012).

Testis dokusunda Sertoli hücrelerinden östrojen salgılandığı bildirilmektedir. Yetişkin erkeklerin plazmasında bulunan östradiol'ün %80'inden ve östron'un %95'inden fazlası, dolaşımdaki testosteron ve androstenedionun aromatisasyonu ile oluşmaktadır.

Geriye kalan kısım ise testis kökenlidir. Testosteron ve androstenedion, aromatozların etkisi ile sırasıyla östrodiol ve östron'a dönüşmektedir. Dolayısıyla erkeklerde dolaşan androjenlerin aromatisasyonu, östrojen oluşumu için esas yoldur. Testis kökenli venöz kandaki östradiol'ün bir kısmı Leydig hücrelerinden gelirken, bir kısmı da androjenlerin Sertoli hücrelerinde aromatisasyonu ile oluşmaktadır. Erkeklerde plazma östradiol düzeyi yaklaşık olarak 2ng/dl, toplam yapım hızı ise 0.05 mg/gün'dür. Aromatozlar, en fazla yağ dokusunda olmak üzere beyin, deri, karaciğer ve meme dokusunda bulunan membrana bağlı enzimlerdir. Testislerden salgılanan östrojen'in spermatogenezis üzerindeki etkisi henüz açıklanabilmiş değildir (Ganong 2002, Yaman 1999, Bullock ve diğ. 1994).

Testosteronun ve metabolitlerinin erkeklerdeki fonksiyonları; hipotalamo-hipofizer sistem aracılığıyla gonadotropin salgısının kontrolü, spermatogenezin başlatılması ve devam ettirilmesi, embriyonal ve fetal yaşam sürecinde erkek fenotipin oluşturulması ve puberte döneminde cinsel matürasyonun oluşturulması ve devam ettirilmesi olarak sıralanabilir. Ayrıca yağsız vücut kitlesini artırırken, yağlı kitleyi de azaltmaktadır (Keleşoğlu 2014, Herbst ve Bhasin 2004).

Spermatogenezis için çok önemli olan 35 °C sıcaklık; spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu plexus pampiniformis ile, musculus cremaster'in ve skrotum kesesinin dartos kasının ortam sıcaklığına göre kasılıp gevşemesiyle ve skrotumda yer alan ter bezleri sayesinde skrotumda sağlanır. Plexus pampiniformis sayesinde testislere giren sıcak arteriyel kan (37 °C), testisten dönen daha düşük sıcaklıkta olan (35 °C) venöz kan ile soğutulur ve böylece testisin sıcaklığının düşük tutulmasına yardımcı olur. Testisin ven ve arterlerinin bu şekilde bir arada ilerlemesi Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES=Countercurrent Heat Exchange System) olarak adlandırılır (Dahl ve Herrick 1959, Waites ve Moule 1961, Harrison 1975, Short 1997, Thonneau ve diğ. 1998, İlhan 2003).

## **1.2.Kanserin Genel Tanımı ve Testis Kanseri**

### **1.2.1. Kanserin Genel Tanımı**

Kanser kelimesi, Hippocrates (M.Ö. 460-370) tarafından ilk defa “carcinus” ve “carcinoma” olarak ülser oluşturan ve ülser oluşturmeyen tümörler için kullanılmıştır. Parmak benzeri uzantılara sahip olan kanser hücrelerinin, yengeçleri (cancer) andırmasından dolayı verilen “carcinus” ve “carcinoma” isimleri Romalı hekim Aulus Cornelius Celsus (M.Ö. 25- M.S. 50) tarafından Yunanca terimden Latinceye çevrilerek “cancer” olarak kullanılmaya başlanmıştır (Karataş 2014).

Kanser, bir organ ya da dokudaki büyüme özellikleri bozulmuş olan hücrelerin klonal yayılım göstermesidir. Kanser genetik bir hastalıktır ve genetik hastalıkların en

yaygın, en sık, çözülmesi ve anlaşılması en güç olanıdır (Futreal ve diğ. 2001). Hücre çoğalması (proliferasyon), farklılaşması (diferansiyasyon) ve ölümünü düzenleyen genlerde bozukluk sonucu oluşan kanser, dünyada en çok ölüme neden olan hastalıklardan birisidir (Olah 2005).

Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için tümör hücrelerinde mutlaka bulunması gereken özellikler; bağımsız olarak çoğalabilme (otonomi), kontrolsüz çoğalma (kontakt inhibisyon kaybı), apoptozisin baskılanması, anjiyogenezi sürekli destekleyebilme, ölümsüzlük, invazyon (çevre dokulara yayılma ve işlevlerini bozma) ve metastaz (köken aldığı organ dışına çıkarak diğer organlara yayılarak yerleşme) yapabilme yeteneğidir. Bu özelliklere sahip olan hücrelerin çoğalması ile kanser hastalığı ortaya çıkmaktadır.

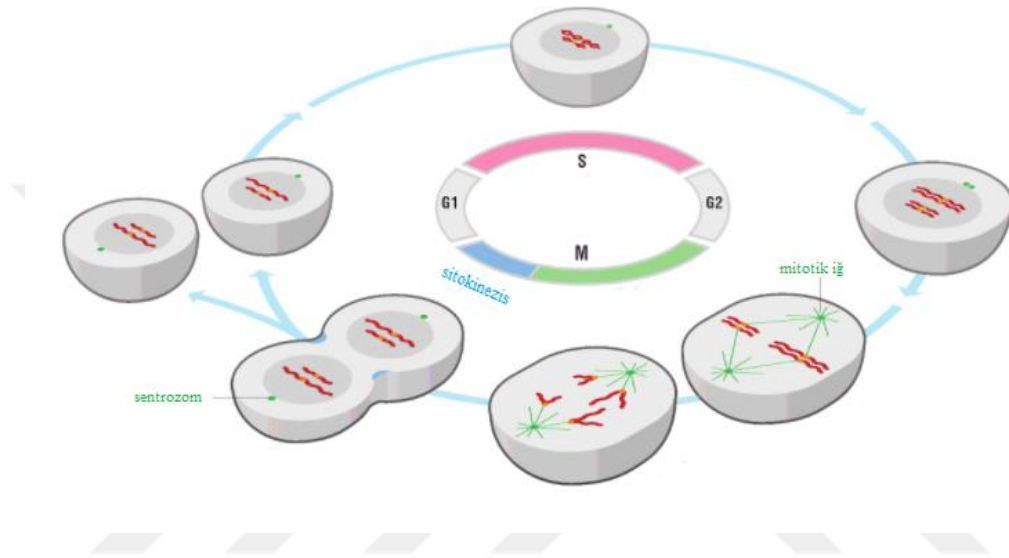
Kanser, hem çevresel hem de genetik etkenlerden kaynaklanır ve çok faktörlü, çok genli ve çok basamaklı gelişim gösteren bir hastalıktır (Lichtenstein ve diğ. 2000, Olah 2005, Akbulut ve Akbulut 2005). Karsinogenezis (kansere oluşumu) sürecindeki genetik değişiklikler; genomik dayanıksızlık, kromozom kaybı, kromozomların yeniden düzenlenmesi ya da kromozomların lokuslarına yabancı olan DNA dizilerinin (genellikle viral DNA dizileri) girmesi olarak özetlenebilir. Söz konusu genetik hasar, hücrenin büyümesini uyarıcı proto-onkogenler, hücrenin büyümesini önleyen tümör baskılayıcı genler, apoptozisi düzenleyen genler ve DNA yanlış eşleşme tamir genlerinde gerçekleşmektedir. Çevresel faktörler arasında ise UV (ultraviyole) ve radyasyon, beslenme tarzı, ilaç kullanımı, sigara içme ve alkol kullanımı gibi kişisel alışkanlıklar, enfeksiyon ajanları (virüsler [EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV1, HHV8 vb.], bakteriler (*Helicobacter pylori*) ve parazitler (Schistosoma), bazı küfler (alfatoksinler), meslekle bağlantılı olarak bazı karsinojenik ajanlara sürekli maruz kalmak (asbestos, ağır metaller, arsenik, benzen vb.) sayılabilir (Klug ve Cummings 2002, Clavel 2007, Yokuş ve Çakır 2012, Burger 2003, Olah 2005).

### **1.2.2. Hücre Döngüsü ve Kanser**

Son zamanlarda yapılan birçok araştırmada, hücre döngüsünü düzenleyen proteinler ile onkogenesis arasında kurulan bağlantıların sayısında önemli bir artış görülmektedir. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında ve düzenlenmesindeki anormallikler kanser gelişimine yol açmaktadır.

Normalde hücreler, uyaranlara bağlı olarak gerekli durumlarda kontrollü olarak bölünürler. Organizmada programlı olarak yürütülen ve hücreler arasında farklılık gösteren hücre döngüsünün süresi, bir dakika ile bir sene arasında değişmektedir ve dört evrede gerçekleşmektedir (Çizim 1.18). Bunlar:

- S (Sentez) evresi: DNA replikasyonu, RNA sentezi ve protein sentezi gerçekleşir.
- G2 (Gap 2) evresi: DNA replikasyonu gerçekleşmez, RNA sentezi ve protein sentezi devam eder. İğ ipliği ve aster proteinleri sentezlenir.
- M (Mitoz) evresi: Mitoz ve sitokinezis gerçekleşir.
- G1 (Gap 1) evresi: İlk bölünmede oluşan eş hücrelerin tekrar hücre bölünmesine girmeden S evresine hazırlandığı evredir. DNA replikasyonu görülmez ancak RNA sentezi ve protein sentezi devam eder (Yokuş ve Çakır 2012, Morgan 2007).

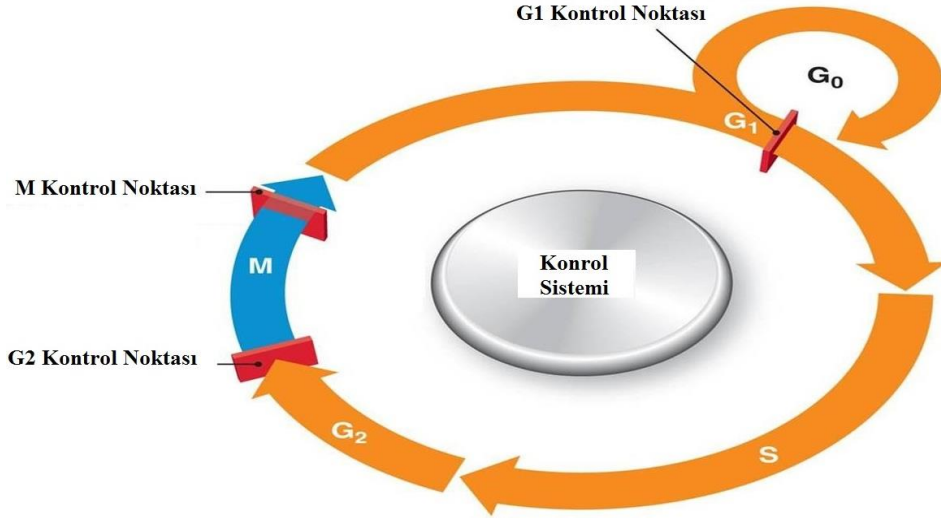


**Çizim 1.18.**Hücre döngüsünün evreleri (<https://exploreable.wordpress.com/2011/04/20/an-introduction-to-the-cell-cycle/>).

Mitoz evresinden G1 evresine geçen hücreler ya bölünmeye devam ederler ya da bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre döngüsünün aktif evrelerine girmezler ve dinlenme evresi adı verilen G0 evresinde beklerler. Bölünmesi duran ve tüm biyokimyasal olayların aktif olarak sürdüğü G0 evresindeki hücreler, büyüme faktörleri tarafından uyarılarak tekrar bölüneceği zaman hücre döngüsüne G1 evresinden katılmaktadırlar (Yokuş ve Çakır 2012, Morgan 2007).

Hücre döngüsü farklı noktalarda denetlenmektedir (Çizim 1.19). Bu denetim noktalarından biri G2/M geçişi, diğeri S evresine girmeden önceki geç G1 evresinin de dahil olduğu nokta ve bir diğeri ise M kontrol noktasıdır (Klug ve Cummings 2002, Morgan 2007).





**Çizim 1.19.** Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları (<http://bilimderyasi.com/wp-content/uploads/2017/01/Resim19.jpg>).

İlk kontrol noktası geç G1 evresidir ve hücrenin G1 fazını terkederek S fazına geçebilmesi için DNA'nın hasarsız olması gerekmektedir. Aksi takdirde hasar onarılan kadar hücre bu kontrol noktasında durdurulur. Eğer DNA hasar onarılamayacak boyutta ise birkaç saat alan G1 noktasındaki bu duraklama, p53 (tümör baskılayıcı protein 53) adı verilen bir transkripsiyon faktörünün devreye girmesiyle uzatılır. P53, onarım sürecini başlatır ancak DNA hasarı onarılamıyorsa apoptozis sürecini başlatarak DNA'sı hasarlı hücrenin ölümüne neden olur. G2 evresinde tamir mekanizmalarından kaçmış olan hasarlı DNA ya da replikasyona uğramamış DNA varsa kontrol edilir. Tam bir kromozom takımının yavru hücrelere geçmesini sağlamak üzere kromozomların mitoz sırasındaki dizilimlerini kontrol eden M kontrol noktası, eğer hatalı dizilim sonucu kromozomların tam bir takımının yavru hücrelere dağılımında bir problem oluşursa hata giderilinceye kadar mitoz evresinin metafazında hücre döngüsünü durdurur (Cabadak 2008, Kastan ve Bartek 2004).

Hücre döngüsünün denetim noktalarının her birinde, ilgili proteinlerce döngünün ilerlemesine ya da durmasına karar verilmektedir. Bu kontrolü sağlayan ilgili proteinler, hücre döngüsünün her aşamasını düzenleyen siklinler olarak bilinen bir dizi protein ailesinden ve hücre bölünmesini düzenleyen, hücre döngüsü evrelerini kontrol eden siklin-bağımlı kinazlardan (CDKs) oluşmaktadır. Hücre döngüsünün evrelerinde sentezlenen değişik siklinler, bağlandıkları bu inaktif CDK moleküllerini aktive etmektedirler (Klug ve Cummings 2002, Scriver ve diğ. 2001, Kopnin 2000, van den Heuvel ve Harlow 1993).

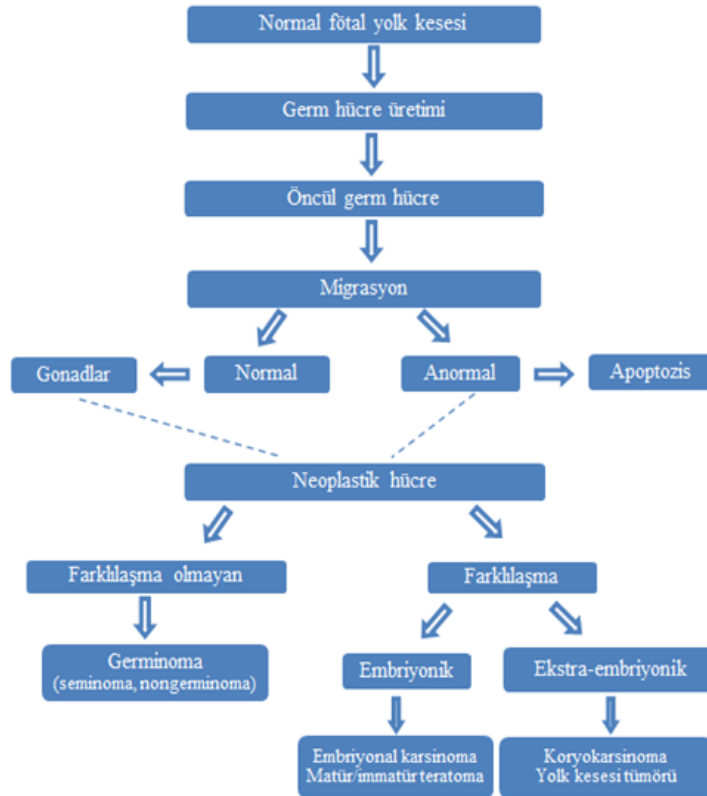
Kanser hücrelerinde genellikle hücre döngüsünün düzenlenmesinde herhangi bir basamakta bir hasar söz konusudur. Kanserli hücrelerde, normal hücrelerde görülen

kontrollü büyüme mekanizması mutasyonlar sonucunda bozulmuştur (Evan ve Vousden 2001, Ruddon 2007).

Günümüzde, köken aldıkları hücre türüne ve buldukları organa göre farklı isimler alan 100'den fazla sayıda kanser türü tanımlanmıştır ve tahmini olarak kanser türünün 200'den fazla olabileceği ileri sürülmüştür (Sawyers ve diğ. 2013). Oldukça karmaşık bir hastalık olan kanserde, popülasyonlardan bireylere, moleküler düzeyden genetik materyaldeki değişikliklere kadar birçok seviyede farklılık görülmektedir. Kanser genom çalışmaları da son yıllarda kanserin çok çeşitli genom değişiklikleri sonucunda ortaya çıktığı fikrini doğrulamıştır (Arnedos ve diğ. 2014).

### 1.2.3. Testis Kanseri

Testis kanseri 15-35 yaş arası genç erkeklerde yaygın olarak görülen kanser tipidir ve erkeklerde görülen malign tümörlerin %1-2'sini oluşturmaktadır (Gilligan 2007, Kawai ve diğ. 2006). Testis kanserinin %95'i germ hücreli tümörlerden oluşmaktadır (Huyghe ve diğ. 2007). Germ hücreli tümörler, heterojen bir grup olmalarına karşın, primordial germ hücresi olarak adlandırılan ortak bir öncül germ hücresinden köken alan tümörlerdir (Pizzo ve Poplack 2002). Germ hücreli tümörlerin histogenezisini gösteren şema çizim 1.20'de verilmiştir.



Çizim 1.20. Germ hücreli tümörlerin histogenezisi (Lanzkowsky 2011).

Testiküler kanserler üç grup altında incelenebilir (McIver ve diğ. 2013).

**1. Tip I testiküler germ hücre tümörleri (TGHT):** Başlıca yeni doğan erkeklerde ve genç çocuklarda görülür ve benign teratomalar ve malign yolk kesesi tümörleri içerir (Frazier ve diğ. 2012).

**2. Tip II TGHT:** En çok 20-40 yaş arasındaki erkekleri etkilemektedir ancak bu tümör tipinin kökeni fötal gelişim sırasında daha erken evreye dayanmaktadır (Looijenga ve diğ. 2011). Tüm Tip II TGHT'ler karsinoma in situ (CIS) adı verilen pre-invaziv lezyondan gelişmektedir. CIS, disfonksiyonel fötal germ hücre olarak tanımlanır (Kristensen ve diğ. 2008). Tip II TGHT insidansı son yüzyılda artış göstermiş ve 20-40 yaş arası erkeklerde en sık görülen kanser tipi haline gelmiştir (Baade ve diğ. 2008, Skakkebaek ve diğ. 2007, Walschaerts ve diğ. 2008). Tip II TGHT, seminoma (SGHT=Seminamatöz Germ Hücreli Tümör) ve nonseminoma (NSGHT=Non Seminamatöz Germ Hücreli Tümör) olmak üzere iki alt gruba ayrılarak incelenir.

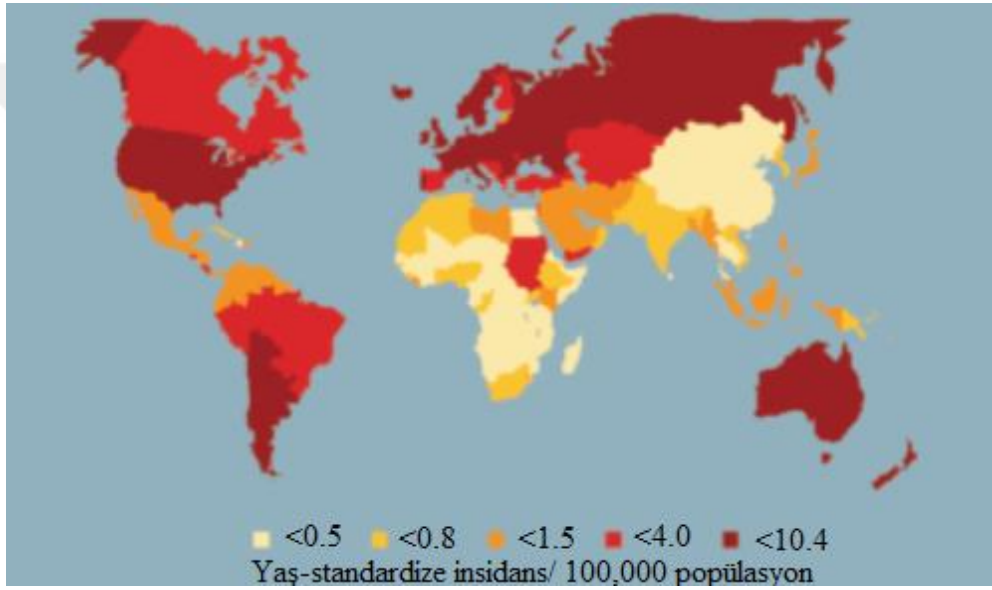
SGHT, testiküler germ hücre tümörlerinin %50'sini oluşturmaktadır ve çoğunlukla 40'lı yaşlarda görülmektedir. Klasik seminoma, anaplastik seminoma ve spermatositik seminoma olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. Prognostik açıdan bakıldığında aralarında fark yoktur. Klasik seminoma, tüm seminomaların % 85'ini oluşturur. Klasik seminomada hücreler, büyüktür ve şeffaf sitoplazma ile koyu boyanan nükleusa sahiptirler. % 10-15'inde sinsiyotrofoblastik elemanlar bulunmaktadır. Bu tip seminomalarda kanda  $\beta$ -hCG yüksek miktarda bulunur. Anaplastik seminoma, tüm seminomaların % 5-10'unu oluşturur. Mikroskop altında büyük büyütme ile her sahada 3 ya da daha fazla mitoz içeren alan bulunmaktadır. Nükleuslar aşırı derecede pleomorfizm göstermektedir. Spermatositik seminoma, tüm seminomaların % 5-10'unu oluşturur. Hücre boyutları değişkendir, sitoplazmaları daha koyu boyanır ve yoğun kromatin içeren yuvarlak nükleusları vardır. Spermatositik seminoma, en çok 50 yaş üzerindeki erkeklerde görülür (Tansuğ 2005).

Testiküler germ hücre tümörlerinin geriye kalan kısmını NSGHT (embriyonal karsinom, yolk kesesi tümörü, koryokarsinom ve teratoma) oluşturmaktadır ve çoğunlukla 30'lu yaşlarda görülmektedir (Carver ve Sheinfeld 2005).

**3. Tip III TGHT:** Spermatositik seminomlar olarak da isimlendirilir. 50 yaşın üzerinde bulunan erkekleri etkilemektedir. Yavaş büyüyen tip B spermatogonyumun yayılmasıyla ortaya çıkmaktadır (Bahrami 2007).

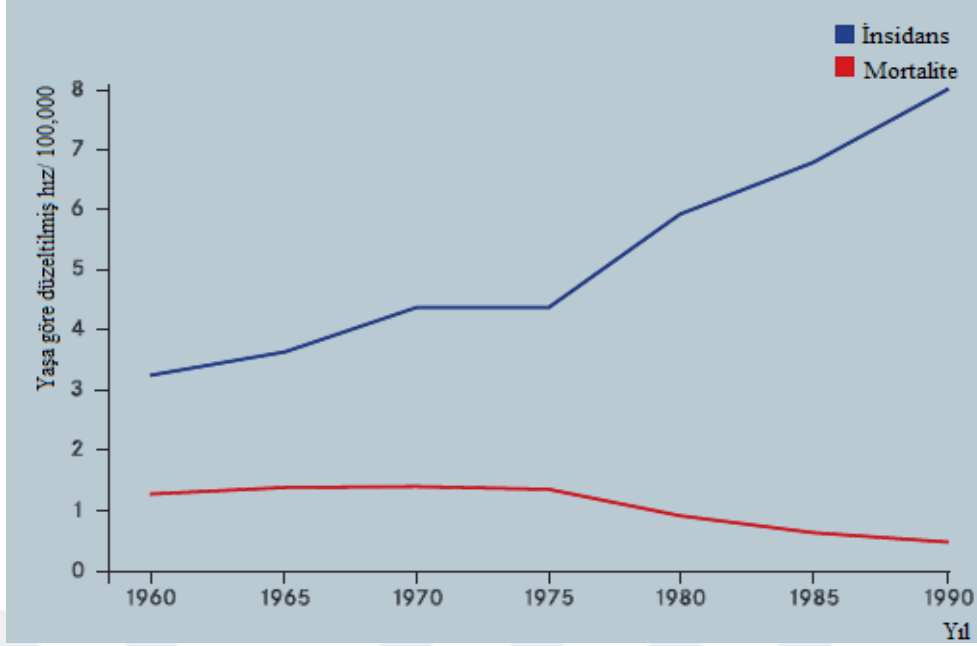
### 1.2.3.1. Testis Kanseri Epidemiyolojisi

Testis kanserinin insidansı coğrafi çeşitlilik göstermektedir ve bu insidans son 50 yılda dünya genelinde giderek artmaktadır. Testis kanser insidansı, İskandinavya ve İsviçre’de en yüksek düzeyde iken, Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere’de orta düzeyde, Afrika ve Asya’da ise en az düzeydedir (Çizim 1.21). TGHT, daha çok beyaz ırkta görülürken, nadir olarak Afrika kökenli Amerikalılarda görülmektedir. Yapılan çalışmalarda testis kanserinin görülme oranının, beyaz ırkta Afrika kökenli Amerikalılardan 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Delbes ve diğ. 2007, Huyghe ve diğ. 2007, Carver ve Sheinfeld 2005).



Çizim 1.21. Testis kanseri küresel insidansı. En yüksek oranlar zengin Kafkasya nüfusundadır (Stewart ve Kleihues 2003).

Son yıllarda testis kanseri insidansı birçok popülasyonda artış gösterirken, mortalite oranının (hastalığa bağlı ölüm oranının) azaldığı görülmektedir (Çizim 1.22). Mortalite oranının azalmasındaki nedenler; nonseminomlara göre seminomların daha fazla görülmesi, erken evrede hastalığın teşhis edilebilmesinde görülen artış ve ilerlemiş evredeki hastalarda tedavi edici kemoterapinin bulunmuş olmasıdır (Küçüksayan 2011).



Çizim 1.22. 1960-1990 yılları arasında Norveç'te testiküler kanser insidansı ve mortalitesindeki eğilimler. İnsidans önemli oranda artarken, etkili kemoterapiye bağlı olarak mortalite azalmıştır (Stewart ve Kleihues 2003).

### 1.2.3.2. Testis Kanseri Etiyolojik Risk Faktörleri

TGHT etiyojisi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte birçok etmene bağlı olduğu bilinmektedir. Genetik faktörlerin yanı sıra kimyasal karsinojenlere maruziyet ve travma gibi bilinen çevresel risk faktörlerinin de TGHT gelişimi üzerine etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir (Richiardi ve diğ. 2007, Rukstalis 1996). Buna ek olarak birçok genetik mutasyonun hem sporadik hem de ailesel TGHT vakalarında TGHT oranlarını olumlu yönde etkilediği keşfedilmiştir (Matin ve Nadeau 2005).

TGHT oluşması için en önemli risk faktörleri arasında kriptorşidizm, orşit, ailede TGHT öyküsü, Klinefelter sendromu, spermatik ve testiküler disjenezi, testiküler atrofi, inguinal herni (kasık fıtığı) ve hidrosel sayılabilir (di Pietro ve diğ. 2005, Holzik ve diğ. 2004). Etnik köken de kansere yakalanma riskini etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda testis kanserinin görülme oranının, beyaz ırkta Afrika kökenli Amerikalılardan 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Delbes ve diğ. 2007, Huyghe ve diğ. 2007, Carver ve Sheinfeld 2005).

Genel popülasyonda kriptorşidizm insidansı %0,4 iken TGHT olan olgularda inmemiş testis oranı %3,5- %12'dir. Kriptorşidizimli hastalarda normal kişilere oranla testis kanseri riski 30-50 kat artmıştır (Fonkalsrud 1996). İntraabdominal yerleşimli testislerde bu oran daha da yüksek görülmektedir (Campbell 1942). 2009'da yayınlanan bir

meta-analiz sonucuna göre; kriptorşidizim olgularında aynı taraflı testiste malignite gelişimi için relatif risk 6,3 iken karşı taraf inmiş testiste malignite relatif riski 1,74 olarak saptanmıştır (Akre ve diğ. 2009). Kriptorşidizim olgularında testiküler malignite riskindeki artışın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte bu konuda iki görüş bulunmaktadır. Bu görüşlerden ilki, intraabdominal yerleşimli testisin karşılaştığı daha yüksek sıcaklığın testiküler maligniteye yol açabileceğidir. Diğer görüş ise, inmemiş testise neden olan faktörlerin aynı zamanda testiküler maligniteye de neden olduğu görüşüdür. On iki yaşından sonra orşiopeksi yapılan ya da inmemiş testis nedeniyle tedavi almayan olgularda, prepubertal dönemde orşiopeksi yapılan olgulara göre testiküler malignite 2-6 kat daha fazla görülür. Kriptorşidizimde görülen malign transformasyon daha çok seminoma yönündeyken, düzeltilmiş kriptorşidizimde ve skrotal testiste görülen malign dejenerasyon daha çok non-seminoma tiptedir (Wood ve Elder 2009).

TGHT hastalarının yaklaşık %2'si testis kanseri olan bir başka aile üyesine sahiptir. Literatürde bildirilen ailelerin çoğunun testis kanseri olan iki üyesi bulunmaktadır. Nadiren bazı ailelerde 3 ya da daha fazla testis kanseri aile üyesi bulunmaktadır. Bu da resesif (çekinik) ya da düşük baskınlıkta (düşük dominantlıkta) bir kalıtım olabileceğini düşündürmektedir (Chaganti ve Houldsworth 2000). Daha önce testis kanseri tanısı konmuş bir hastanın diğer testisinde ikinci bir kanser gelişme riski %2-3 oranındadır (Gilligan 2007).

TGHT ile infertilite arasındaki bağlantı, tip II tümörlü hastalarda azalmış fertilitate ile kanıtlanmıştır. Görülen lezyonlar, erkek üreme sağlığında azalmanın ve artan fertilitate problemlerinin göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Aschim ve diğ. 2008, Paduch 2006). Tip II TGHT'nin, işlevsel olmayan gonositlerin seminifer tübülde yerleşimi sonucu geliştiği bilinmektedir (Sonne ve diğ. 2009). TGHT'ye zemin hazırlayan risk faktörleri erkek fotal gelişiminde aktiftir (McIver ve diğ. 2013).

### **1.2.3.3. Testis Kanseri Tanısı**

Olgular sıklıkla hassas olmayan skrotal kitle ile hastaneye başvururlar. Ek bulguların az olması tanıda gecikmeye neden olmaktadır. Testiküler tümörler transilluminasyon (saydamgörüm) vermezlerse de tanı anında hastaların %20'sinde reaktif hidrosel saptanmaktadır (Exelby 1980, Jones 1985). Ayrıca, hastaların %21'inde testiküler tümöre eşlik eden inguinal herni bulunmaktadır (Li ve Fraumeni 1972). Metastaz genelde retroperitoneal lenf bezlerine olmaktadır. Sağ testiküler tümörler, aort ve inferior vena kava arasındaki lenf bezlerine, sol taraflı tümörler ise aortun lateralindeki lenf bezlerine

metastaz yapmaktadır. Retroperitoneal lenf bezi tutulumu görülmeyen olgularda ise sol supraklavikuler ve pulmoner lenf bezi tutulumu bildirilmiştir (Ehrlich ve diğ. 2006).

Operasyon öncesi değerlendirmede serum tümör belirteçlerinin düzeyinin belirlenmesi evreleme ve hasta takibinde önemlidir. En sık kullanılan tümör belirteçleri; Alfa-feto-protein (AFP) ve  $\beta$ -insan korionik gonadotropin ( $\beta$ -hCG)'in yer aldığı onkofetoproteinler, hücresel enzimler (LDH, PLAP), sitogenetik ve moleküler belirteçlerdir. Bu belirteçler tanıda, tedaviye yanıtın takibinde, rezidüel ya da ilerleyici hastalığın varlığını göstermede kullanılmaktadır. Hidrosel ile testiküler kitle ile ilişkili reaktif hidroselin ayırımında ultrasonografi yardımcı olabilir. Olguların metastaz açısından değerlendirilebilmesi için abdominal ve pelvik USG (ultrasonografi), LDH (Laktat dehidrogenaz) ve bilgisayarlı tomografi, akciğer grafisi ve toraks BT, kemik tutulumu açısından  $^{99m}\text{Tc}$  perteknetat sintigrafisi yapılmalıdır (Gobel ve diğ. 2000, Ries ve diğ. 2007).

#### **1.2.3.4. Testis Kanserinde Evreleme ve Sınıflama**

Testis tümörlerinin evrelendirilmesi ve sınıflandırılması, uygun tedavinin planlanması ve prognoz hakkında bilgi edinilmesi yönünden çok önemlidir ve T, N, M ve S kategorilerinin belirlenmesini içerir. T; primer (ana) tümörün testisin yanındaki dokulara ne kadar yayılmış olduğunu, N; kanserin bölgesel (yakın) lenf nodlarına ne kadar yayıldığını, M; kanserin metastatik hale gelip gelmediğini (uzaktaki lenf nodlarına ya da vücudun diğer organlarına yayılımını), S; bazı testiküler kanserler tarafından değişen tümör belirteçlerinin serum (kan) seviyelerini gösterir. Bu kategoriler şu şekildedir (Fleming ve diğ. 1997):

#### **Primer Tümör Evresi (pT)**

**pTX:** Primer tümör değerlendirilemiyor.

**pT0:** Primer tümör bulgusu yok.

**pTis:** İntratübüler germ hücreli neoplazi (karsinoma in situ).

**pT1:** Tümör testis ve epididimise sınırlı ve vasküler/lenfatik invazyon yok; tümör tunika albuginea'ya invaze olmuş olabilir ancak tunika vaginalis ile herhangi bir ilişkisi yok.

**pT2:** Tümör testis ve epididime sınırlı ve vasküler/lenfatik invazyon var ya da tunika albuginea'yı aşmış ve tunika vaginalis invazyonu oluşmuş.

**pT3:** Tümör spermatik korda invaze olmuştur (vasküler/lenfatik invazyon var ya da yok).

**pT4:** Tümör skrotuma invaze olmuştur (vasküler/lenfatik invazyon var ya da yok).

#### **Bölgesel Lenf Nodları (N)**

#### **Klinik**

**NX:** Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.

**N0:** Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok.

**N1:** En büyük boyutu 2 cm ya da daha az olan tek lenf nodu tutulumu ya da hiçbiri 2 cm'yi geçmemiş olan birden fazla lenf nodu metastazı.

**N2:** 2 cm'den büyük 5 cm'den küçük tek lenf nodu tutulumu ya da en az biri 2cm'den büyük ancak 5 cm'den küçük birden fazla lenf nodu metastazı.

**N3:** 5 cm'den büyük lenf nodu metastazı.

### **Patolojik (pN)**

**pNX:** Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.

**pN0:** Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok.

**pN1:** En büyük boyutu 2 cm ya da daha az olan tek lenf nodu tutulumu ya da hiçbiri 2 cm'yi geçmemiş olan birden fazla lenf nodu metastazı.

**pN2:** 2 cm'den büyük 5 cm'den küçük tek lenf nodu tutulumu ya da en az biri 2cm'den büyük ancak 5 cm'den küçük birden fazla lenf nodu metastazı.

**pN3:** 5 cm'den büyük lenf nodu metastazı.

### **Uzak Metastaz (M)**

**MX:** Uzak metastaz değerlendirilemiyor.

**M0:** Uzak metastaz bulgusu yok.

**M1:** Uzak organ metastazı var.

**M1a:** Bölgesel olmayan lenf nodu ya da akciğer metastazı.

**M1b:** Akciğer dışı organ metastazları.

### **Serum tümör belirteçleri (S)**

**SX:** Serum tümör belirleyici sonuçları elde yok ya da çalışılmamış

**S0:** Serum tümör belirleyicileri normal sınırlarda

**S1:** LDH (U/l)  $<1,5 \times N$  ve hCG (mIU/ml)  $<5000$  ve AFP (ng/ml)  $<1000$

**S2:** LDH (U/l)  $<1,5-10$  veya hCG (mIU/ml)  $5000-50000$  veya AFP (ng/ml)  $1000-10000$

**S3:** LDH (U/l)  $>10 \times N$  veya hCG (mIU/ml)  $>50000$  veya AFP (ng/ml)  $>10000$

### **Klinik Evreleme**

**Evre 0:** İntratübüler germ hücreli neoplazi (pTis) olarak da adlandırılan karsinoma in situ anlamına gelir (pTis, N0, M0, S0).

**Evre I:** Kanser herhangi bir T düzeyindedir ve lenf nodlarına ya da diğer organlara yayılma kanıtı yoktur. Serum tümör belirleyici seviyeleri henüz yapılmamıştır ya da mevcut değildir (p T1-4, N0, M0, SX).

**Evre IA:** Kanser testiste bulunur ve kanser rete testis ve epididimise doğru gelişebilir ancak testisteki lenfatik ya da kan damarlarına, lenf bezlerine veya uzak bölgelere



yayılmamıştır. Testisteki tümör, tunika albuginea denilen testisi çevreleyen iç membrana büyümüş olabilir ancak tunika vaginalis olarak adlandırılan dış zarı etkilememiş olabilir. Serum belirteçleri normaldir (pT1, N0, M0, S0).

**Evre IB:** Testis tümörü tunika vaginalis, testis içindeki kan ya da lenfatik damarlar, spermatik kord veya skrotuma yayılmıştır. Lenf düğümlerine veya uzak bölgelere yayılmamıştır. Serum belirteçleri normaldir (pT2, pT3 veya pT4 ve N0, M0, S0).

**Evre IS:** Kanser herhangi bir T evresindedir ve lenf nodlarına veya uzak bölgelere yayılmamıştır. Serum belirteçleri, kanserli testis alındıktan sonra normal seviyelerin üstünde kalır (herhangi bir pT/TX, N0, M0 ve S1-3). Evre IS non-seminom testis kanseri evre III testis kanseri ile aynı şekilde tedavi edilir.

**Evre II:** Kanser, herhangi bir sayıda bölgesel lenf noduna yayılmıştır ancak vücudun diğer bölümlerinde veya uzak organlarda lenf nodlarına yayılmamıştır. Serum belirteçleri kullanılamaz (herhangi bir pT/TX, N1-3, M0, SX).

**Evre IIA:** Kanser retroperitoneal lenf düğümlerine klinik veya patolojik N1 evrede yayılmıştır ancak hiçbiri 2 cm'den büyük değildir ve lenf nodu diseksiyonu yapılırsa, 5'den fazla lenf nodu kanser içermez. Buna ek olarak, serum tümör belirteçleri normal seviyelerde veya sadece biraz yüksektir ve retroperitoneumdan başka herhangi bir yere yayılma belirtileri yoktur (herhangi bir pT/TX, N1, M0, S0 veya S1).

**Evre IIB:** Kanser retroperitoneumda lenf bezlerine yayılmıştır. Kanser ya da lenf nodu kitlesi bulunan en büyük lenf nodu boyutu 2-5 cm arasındadır veya eğer lenf nodu diseksiyonu yapılırsa, kanser en az 1 lenf düğümüne (veya lenf nodu kitlesine) 2 cm ile 5 cm arasında veya 5 cm'den fazla lenf noduna kadar uzanır, hiçbiri 5 cm'den büyük olmamalıdır. Serum belirteçleri normal seviyelerde ya da hafif yüksektir ve retroperitoneumdan başka herhangi bir yere yayılmış herhangi bir kanser bulgusu yoktur (herhangi bir pT/TX, N2, M0, S0 veya S1).

**Evre IIC:** Kanser, 5 cm'den büyük en az 1 lenf düğümüne (veya lenf nodu kitlesine) yayılmıştır. Serum belirteçleri normal seviyelerde veya hafif yüksektir ve retroperitoneumdan başka herhangi bir yere yayılmış kanser bulgusu yoktur (herhangi bir pT/TX, N3, M0, S0 veya S1).

**Evre III:** Kanser uzaktaki lenf bezlerine veya herhangi bir organa yayılmıştır ve serum tümör belirteçleri seviyeleri bilinmemektedir (herhangi bir pT/TX, N0-3, M1, SX).

**Evre IIIA:** Kanser uzaktaki lenf nodlarına ve/veya akciğerlere yayılmıştır. Serum belirteçleri normal seviyededir ya da sadece hafif derecede artmıştır (herhangi bir pT/TX, N0-3, M1a, S0 veya S1).

**Evre IIIB:** Kanser tüm lenf bezlerine ve/veya akciğerlere yayılmıştır ancak diğer herhangi bir organa yayılmamıştır. En az bir serum belirteci büyük oranda yükselir (herhangi bir pT/TX, N1-3, M0, S2 veya herhangi bir pT/TX, N0-3, M1a, S2).

**Evre IIIC:** Aşağıdakilerden biri veya her ikisi söz konusudur:

- En az 1 serum belirteci aşırı derecede yüksektir ve kanser en az 1 lenf noduna veya organa yayılmıştır (herhangi bir pT/TX, N1-3, M0, S3 veya herhangi bir pT/TX, N0-3, M1a, S3).

- Kanser, akciğerler dışındaki bir organa yayılmıştır (herhangi bir pT/TX, N0-3, M1b, herhangi bir S) (Fleming ve diğ. 1997).

### 1.2.3.5. Testis Kanseri Tedavisi

Testis kanseri yüksek oranda tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, bu kanserin tüm aşamalarında uygun tedavinin seçilmesi ve uygulanması önemini korumaktadır. Yerinde olmayan uygulamalar morbidite, mortalite oranlarını ve tedavi yükünü arttırmaktadır. Hastaya kanser tanısı konulduktan ve hastalığın yaygınlığı belirlendikten sonra tümörün histolojik yapısına, lokalizasyonuna, büyüklüğüne, hastalığın evresine, metastaz olup olmamasına, hastanın fizyolojik ve psikolojik durumuna ve gereksinimlerine göre yaşam süresini uzatmaya ya da yaşam kalitesini artırmaya yönelik uygun tedavi yöntemleri seçilmelidir (Carver ve Sheinfeld 2005).

Testis kanseri tedavisi; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve yeni tedavi yöntemlerinin (hormon tedavisi, immünoterapi-biyolojik tedavi, anjiyogenez inhibitörleri, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi, kemik iliği transplantasyonu) tümünü ya da bir kısmını içerebilir (Olgun ve Şimşek 2010). Testis kanserli hastaların %80'i kemoterapi ve cerrahi ile tedavi edilebilmektedir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e kadar ulaşmaktadır. Fakat özellikle geç teşhis edilen %20'lik dilimde yer alan hastalar, günümüzde hala tedavi edilememektedir (Mizutani ve diğ. 2006). Cerrahi yöntem ile testis kanserli hastalara radikal inguinal orşiektomi yani kanserli testisin çevre dokusu ile birlikte vücuttan uzaklaştırılması işlemi uygulanır. Bu işlemde karın bölgesindeki lenf düğümleri de birlikte çıkarılır. Bir testisi alınmış kişilerin diğer testisinde de % 2-5 oranında kanser gelişme riski vardır (Dearnaley ve diğ. 2001). Radyoterapi ile kanser hücrelerinin hasar gömesi ve büyümesinin durdurulması sağlanır. SGHT'ler radyasyona çok duyarlıdır ve cis-platin'e dayalı kemoterapi tedavisine de duyarlılıkları bulunmaktadır (Looijenga ve diğ. 2011). SGHT'li hastaların cerrahi tedavileri sonrasında abdominal lenf nodları için radyoterapi uygulanır. Ancak NSGHT'ler radyasyona duyarlı olmadıklarından dolayı bu tip kanserlerin tedavisinde kemoterapi kullanılır. Anti-kanser ilaçlar, genellikle hastalığın

vücudun başka kısımlarına metastaz yapması durumlarında tercih edilirler ancak bu ilaçlar tümörün cerrahi girişim öncesine kadar küçülmesini sağlamak amacıyla da kullanılabilirler (Shabbir M ve Morgan 2004).

### 1.3. Kemoterapi

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapinin ana ilkesi; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden özellikle kontrolsüz çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etki göstererek tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ya da yok etmektir. Kemoterapi doğal ya da sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar veya hormonlarla yapılan tedavilerin tümünü içine alan bir tedavi şeklidir (Akyol 2004).

Kemoterapinin başlıca amacı; hastalığı tedavi etmek, kanserli hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını engellemek, hastalığın yayılmasını önleyerek kanserin kontrol altında tutulmasını sağlamak, hastalığın büyümesini yavaşlatmak ya da durdurmak, metastaz yapan kanser hücrelerini yok etmek, hastalığa bağlı rahatsızlıkları azaltmak, ortalama yaşam süresini uzatmak ve böylece yaşam kalitesini yükseltmektir (Brooks ve diğ. 2009).

1900'lü yıllarda Alman bakteriyolog Paul Ehrlich (1854-1915), bakterilerin vücut dokularına yerleşerek birçok hastalığa sebep olduğu bilgisinden yola çıkarak hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde bakterilere karşı toksik olabilecek kimyasal maddelerden nasıl yararlanılabileceğini araştırmıştır. Yaptığı deneylerde bazı boyaların bakterilerde yoğunlaşabileceğini keşfetmesi ile bakteri ve toksinlerin yol açtığı olumsuz etkilere karşı çeşitli kimyasal maddeler kullanılarak hastalıkların tedavi edilebileceği düşüncesi ile ilk kez 'kemoterapi' terimini ortaya atmıştır. Bunun üzerine bir çok araştırmacı transplante tümörleri taşıyan fare modelleri kullanarak potansiyel kanser kemoterapi ajanlarını test edebilmişlerdir ve böylece günümüze kadar yaklaşık 40 yararlı anti-kanser ilacı keşfedilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar; kanser hücresi üzerindeki etkilerine, hastalığın evresine, hastanın genel durumuna göre tek başına ya da birkaç ilacın birlikte verilmesi şeklinde kombine olarak uygulanabilirler (Vahaboğlu 2004).

Kemoterapötik ajanlar; kimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına, hücre döngüsü ve potansiyel hedefteki etkilerine göre sınıflandırılabilirler. Bunlar; alkilleyici ajanlar, antitümör antibiyotikler, antimetabolitler, alkaloidler, enzimler, kortikosteroidler (hormonlar ve hormon antagonistleri) olmak üzere etki mekanizmaları birbirinden farklı çeşitli kategorilere ayrılırlar (Özalp 2008).

- Alkilleyici ajanlar; yapılarındaki alkil kökü ile makromoleküllerin nükleofilik kısımlarına geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar ve DNA zincirlerinde çapraz bağlantıların kırılmasına neden olarak doğrudan DNA'yı etkilerler. Böylece replikasyonu engellerler. Özellikle hızlı

bir şekilde çoğalan hücrelere etki ederler. Busulfan, Melphalan, Karmustin, Lomustin, Klorambusil, Karboplatin, Sisplatin, Dakarbazin, Siklofosamid, Prokarbazin, İfosamid ve Nitrojen mustard alkilleyici ajanlar arasında yer almaktadır.

- Antitümör antibiyotikler; hedefleri DNA interkalasyonu ve DNA kırıklarıdır. Hücrede DNA ve RNA replikasyonunu durdururlar. Dokularda uzun süre kaldıklarından dolayı DNA sentezi boyunca hücre ölümüne yol açarlar. Radyasyonla birlikte verildiklerinde toksisiteyi artır. Bleomisin, Aktinomisin, Daktinomisin, Adriyamisin, Doksorubisin, Epirubicine, Daunorubicin, Mitomycin-c, Mitoxantrone ve İdarubisin antibiyotik ajanlar arasında yer almaktadır.

- Antimetabolitler; hücrede bulunan normal metabolitler ile benzerlik gösterdiklerinden dolayı rahatlıkla hücre içerisine girerek metabolitlerin yerine geçip aktiviteyi bloke eder, azaltır ya da makromoleküllerin içine girerek, işlevi olmayan bir makromolekül yaratırlar. DNA sentezi gibi hücrenin metabolik süreçlerini bozarak hücre gelişimini bloke ederler. Bu gruptaki ilaçlar hücrenin S fazında etkilidirler. Allopürinal, Fluorourasil, Metotreksat, 6-Merkaptopürin, Hidroksiürea, Floksüridin, Gemsitabin, Fludarabin, 6-Tioguanin ve Pentostatin antimetabolit ajanlar arasında yer almaktadır.

- Alkoloidler; mitoz bölünme evresinde mikrotübül fonksiyonlarını ve dolayısıyla mitotik iğlerin oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini bloke eden ilaçlardır. Podofilotoksinler'den ve vinca alkoloidlerinden semisentetik olarak elde edilirler. Etoposid, Teniposid, Vinkristin, Vinblastin, Vinerabin, Paklitaksel, Doketaksel alkoloid ajanlar arasında yer almaktadır.

- Enzimler; protein sentezini ve hücre metabolitlerini inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellerler. L-asparaginase bu grupta yer alan ajanlardır.

- Kortikosteroidler (hormonlar ve hormon antagonistleri); hormon sekresyonlarını baskılayan veya antagonist hormon etkisi gösteren ilaçlardır. Pasif difüzyon ile hücre içerisine girerler. Glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak nükleusa geçer ve DNA'ya bağlanarak DNA'nın transkripsiyonunu engellerler. Özellikle hormon bağımlı kanserlerin büyümesini, çoğalmasını önler, protein sentezini inhibe eder. Prednisone, Dexamethasone kortikosteroidler grubunda yer alan ajanlardır (Akyol 2004, Küçüksu ve Ruacan 1978, Özalp 2008, Sipahioğlu 1981, Hossfeld ve diğ. 1990).

### **1.3.1. BEP Rejimi (Bleomisin, Etoposid, ve sisPlatin)**

Kanser tedavisinde ilaçların tek başına kullanılması yerine kombine olarak kullanılması önemli bir gelişme olmuştur. İlaçları biyokimyasal etki mekanizmalarına ve

hücre döngüsünün farklı evrelerine etkilerine göre kombine etmek mümkündür. Başarılı ilaç kombinasyonlarının çoğu ampirik kullanım ile geliştirilmiştir.

İlaçların kombine olarak kullanımlarında bazı ilkeler uygulanır. Bunlar;

- Etki mekanizması farklı ilaçların kullanılması,
- İlaçların toksisitelerinin benzer olmaması,
- Her bir ilacın mümkün oldukça alışılmış tedavi dozlarına yakın dozlarda kullanılması,
- Tek başına etkisiz olan ilaçların kombine tedavide de kullanılmamasıdır (Hossfeld ve diğ. 1990).

BEP rejimi; Bleomisin, Etoposid, ve sisPlatin kombinasyonundan oluşan ve metastatik nonseminomatöz testis tümörlerinde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür. Bu kür ayrıca, evre I testis tümörü için uygulanan orşiektomi sonrasında tümör dokusunda saptanan vasküler invazyonun yaratabileceği yüksek orandaki tekrarlama (nüks) ihtimali için de kullanılabilir (Jones ve Vasey 2003).

Testis tümörlerinin tedavisinde sisplatin içeren kemoterapi kombinasyonlarının etkinliği mortalite oranlarını son derece düşürmüştür. Bleomisin, Etoposid ve sisPlatin'in beraber kullanılması, iyileşme yüzdesini tedavi edilebilen hastalarda %90'lara kadar çıkarmıştır. Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri oldukça uzundur. İleri evre tümörlerde Bleomisin, Etoposid ve Sisplatin tedavisinin üstün başarısı bu kombinasyonu standart hale getirmiştir. Hatta yeni kemoterapötik ajan arayışlarını bile sınırlamıştır (Huddart ve diğ. 2005).

BEP rejimi, her bir siklus 3 hafta olmak üzere, üç ya da dört siklus olarak uygulanır. Dozlar şu şekildedir;

- \* Bleomisin: 30 U/ gün, i.v., siklusun 2., 9. ve 16. günleri,
- \* Etoposid, 100 mg/m<sup>2</sup>/ gün, i.v., siklusun 1-5. günleri,
- \* Sisplatin, 20 mg/m<sup>2</sup>/ gün, i.v., siklusun 1-5. Günleri (Williams ve diğ. 1987).

### **1.3.1.1. Bleomisin**

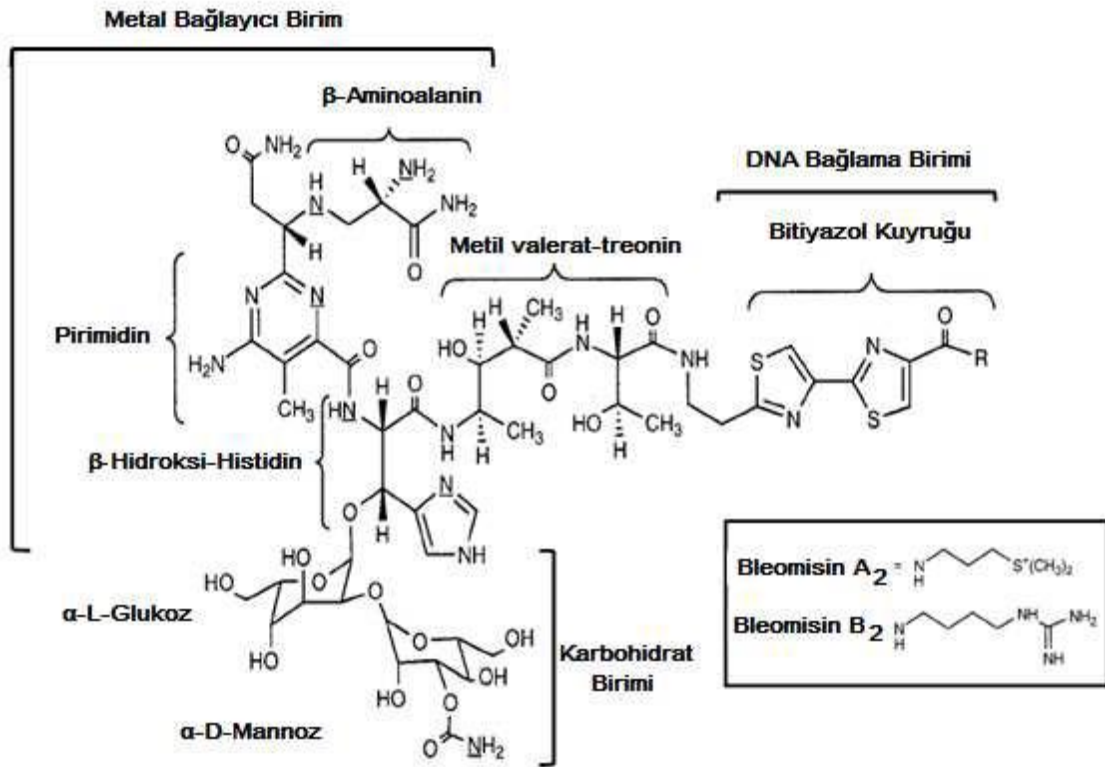
#### **1.3.1.1.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı**

Bleomisin, 1966 yılında Umezawa tarafından antitümör özelliği keşfedilmiş olan glikopeptid yapısında bir antibiyotiktir (Corcoran ve diğ. 1975). Bleomisin, orijinal olarak *Streptomyces verticillus* adlı bakteriden izole edilmiştir (Sleijfer 2001). Bleomisin grubu ilaçlar 200'den fazla yakın ilişkili bileşik içerirken, Bleomisin'in uygulanan formu olan Blenoxane, başlıca A2 ve B2 formlarını içerir. Bleomisin A2'nin molekül ağırlığı 1415,6 dalton ve molekül formülü C<sub>55</sub>H<sub>84</sub>N<sub>17</sub>O<sub>21</sub>S<sub>3</sub> iken; Bleomisin B2' nin molekül ağırlığı 1425,5 dalton ve molekül formülü C<sub>55</sub>H<sub>84</sub>N<sub>20</sub>O<sub>21</sub>S<sub>2</sub> şeklindedir. Bleomisin ailesi terminal

amin kısmının birbirinden farklı olması ile ayırt edilir. Renksiz ya da sarımsı renkte toz halinde olan Bleomisin, suda çözünür (Claussen ve Long 1999, Sugiyama ve diğ. 2002).

Bleomisin, 4 ana bölgeden oluşmaktadır. Bunlar:

- N-terminal birim: Metal bağlanmasından, oksijen aktivasyonundan ve alan selektif DNA kırılmasından sorumlu olan birimdir.
- Metilvalerat-treonin grubu
- C-terminal birim: DNA'ya bağlanma afinitesini sağlayan işlevsel bir bitiyazol grubu içeren birimdir.
- Glukoz ve mannoz şekerlerini içeren bir disakkarit grup: Disakkarit grubunun; metal iyon bağlanmasında, hücre yüzeyinin tanınmasında ve bazı hücrelerde Bleomisin'in selektif birikimi üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Çizim 1.23.) (Claussen ve Long 1999).



Çizim 1.23. Bleomisin'in kimyasal yapısı (Claussen ve Long 1999, Abraham ve diğ. 2001).

Bleomisin, Bleomisin hidrolaz adlı bir enzimle deaktive edilir ve bu enzim başlıca karaciğer, dalak, kemik iliği ve bağırsakta bulunmaktadır. Bleomisin hidrolaz, normal ve malign hücrelerde bulunan bir sistein proteazdır ancak akciğer ve deride çok az bulunmaktadır. Bleomisinler katyonik moleküllerdir ve hücre membranından Bleomisin

bağlayıcı protein ile zayıfça bağlanarak hücre içine alınmaktadır. Alınan Bleomisin ya nükleusa transloke olmaktadır ya da Bleomisin hidrolaz tarafından parçalanmaktadır (Page ve diğ. 2006).

#### **1.3.1.1.2. Bleomisin'in Etki Mekanizması**

Bleomisin'in etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte aktivitesini DNA sentezini ve daha az olarak da RNA ve protein sentezini inhibe ederek gösterdiği anlaşılmıştır. Bleomisin özellikle hücre döngüsünün G2 ve M fazında etkili olmaktadır. Bleomisin, DNA'ya direkt olarak bağlanarak tek ve çift zincir kırılmalarına yol açar ve büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu süreç, oksijen ve ferröz iyonuna bağlıdır (Day ve diğ. 2002). Birçok çalışmada demir, bakır ve kobalt gibi metallerin, Bleomisin tarafından indüklenen DNA kırılmasını desteklediği gösterilmiştir ancak demirin in vivo olarak etki gösteren başlıca metal olduğuna inanılmaktadır (Abraham ve diğ. 2001). DNA kırılması için, DNA ile Bleomisin'in metal bağlayıcı birimi ve bitiyazol kısmının etkileşimini gerektiren bir mekanizma önerilmektedir. Labil Fe (II)-Bleomisin-O<sub>2</sub> kompleksinin, aktive edilmiş Bleomisin'e dönüşümü, DNA'yı hasara uğratmaktadır. Ayrıca son çalışmalar, Bleomisin'in RNA'nın alışılmamış 3 boyutlu yapısını yıktığını göstermiştir (Sugiyama ve diğ. 2002).

Deneysel çalışmalar, Bleomisin hassasiyetinin birçok nedene bağlı olabileceğini göstermektedir. DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar, çift zincir kırılmalarının tamirinde gerekli olan genlerdeki mutasyonlarla ilişkili içerisindedir. Bu mutasyonlar aşırı hassasiyete yol açmaktadır. Çift zincir tamirine katkıda bulunan bir gen olan RAD21'in inhibisyonu, hücrelerin Bleomisin'e hassasiyetinin artmasına neden olmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda, Bleomisin direncinin birçok nedene bağlı olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenler Bleomisin hidrolaz aktivitesindeki artış, taşıyıcı yetersizliğinden dolayı ilacın hücreye alınmasındaki azalma, artmış DNA tamir kapasitesi ya da serbest radikallerin artmış detoksifikasyonu olarak sıralanabilir (Chabner 2008). Bleomisin'in meydana getirmiş olduğu ROS, lipid peroksidasyonuna da yol açmaktadır (Cort ve diğ. 2012).

Bleomisin'in anti-neoplastik etkisinin mekanizması; demir iyonlarının şelasyonu ile moleküler oksijenin, süperoksit ve hidroksil radikallerine redüklenmesi esasına dayanan pseudo enzim reaksiyonu ile gerçekleşir (Moeller ve diğ. 2008). Bleomisin, süperoksit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. Ayrıca Bleomisin, mitokondriyonların elektron transport sisteminde (ETS), elektron transportu esnasında yüksek düzeyde ROS ve süperoksit radikali oluşturur (Conklin 2004). Oluşan bu radikaller

DNA'ya atak yaparak tek ve çift zincir kırılmalarına yol açmaktadır ve bu da DNA-RNA-protein sentezinde (transkripsiyon ve translasyon) hasara neden olarak Bleomisin'in anti-neoplastik etki göstermesini sağlamaktadır (Sausville ve diğ. 1978). ROS'un neden olduğu artmış hücrel oksidatif stres, hücrenin redoks durumunu değiştirir ve birçok reaksiyonu tetikler (Cejas 2004). Oksidatif stres, geçici büyüme durması, adaptasyon, gen transkripsiyonu, sinyal iletim yollarının başlaması gibi birçok değişik biyolojik cevabı indükleyebilmektedir (Mates ve Sanchez-Jimenez 2000, Davies 1999). Serbest oksijen radikallerinin rolü, süperoksit dismutaz'ın, Bleomisin tarafından indüklenen DNA hasarını önlediğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Kanser hücrelerinin oksidatif strese hücrel cevabı, hücrenin genetik geçmişine, içerdiği ROS tipine, oksidatif stresin yoğunluğuna ve süresine bağlıdır (Pelicano ve diğ. 2004, Kong ve diğ. 2000). Yüksek oksidatif stresin hücreye zararlı olduğu bilinmektedir ancak düşük oksidatif stres düzeyleri hücrel proliferasyonu artırabilir. Bu da hücrel cevabın ROS'un dozuna bağlı olduğunun göstergesidir (Cejas 2004). Bleomisin'in oluşturduğu değişimler sonucu ortama göç eden inflamatuvar hücrelerden bir çok oksijen metabolitinin açığa çıktığı ve DNA kırıkları dahil birçok yapı fonksiyonlarının ortaya çıktığı da son zamanlarda Bleomisin'in toksisitesi hakkında bildirilen gelişmeler arasındadır. Ancak hasarın tam mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir.

#### **1.3.1.1.3. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı**

Bleomisin; germ hücreli tümör, lenfoma, kaposi sarkoma, servikal kanser, baş ve boyun squamous hücreli karsinom ve intraplevral uygulama ile malign plevral efüzyon tedavisinde kullanılmaktadır (Chen ve Stubbe 2004). Derialtına (subkutan), kas içine (intramüsküler), plevra içine (intraplevral), periton içine (intraperitoneal) ya da kana kolayca verilebilmektedir. Kas içine enjeksiyon yapıldıktan sonra, pik kan değerleri 30-60 dakika içerisinde görülmektedir. Benzer dozda kana enjeksiyon ile en yüksek pik konsantrasyonları elde edilmektedir (Chen ve Stubbe 2004). Bleomisin, intraplevral veya intraperiotanal bir uygulamadan sonra % 45 oranında sistemik dolaşıma geçmektedir ve yaklaşık %1 oranında serum proteinlerine bağlanmaktadır. Bleomisin'in plazma yarılanma süresi yaklaşık olarak 115 dakikadır. Bleomisin'in eliminasyonu başlıca böbreklerle olmaktadır ve Bleomisin'in alınmasından 24 saat sonra uygulanan dozun % 60-70'i idrar ile aktif formları halinde atılmaktadır (Sleijfer 2001).

Bleomisin uygulanması bazen ölümcül yan etkiler oluşturabilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden Bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı Bleomisin toksisitesi başlıca akciğer ve deride meydana gelir. Bleomisin'in alımından sonra ateş ve bazen de



hipotansiyon görülebilir (Sleijfer 2001). Pulmoner toksisite, Bleomisin için doz sınırlayıcı bir yan etkidir ve bu yan etki genellikle kendini fiziksel muayenede öksürük, dispne, kuru inspiratuvar raller röntgende toraks infiltrasyonları şeklinde gösterir (Katzung ve diğ. 2012, Sleijfer 2001). 400 üniteden daha fazla doz alan hastalarda ve Bleomisin tedavisi öncesi mediastinal ya da göğüs bölgesine radyoterapi uygulanmış olan hastalarda, pulmoner yan etkilerin görülme insidansı daha yüksektir. Nadir de olsa bazı olgularda pulmoner toksisite öldürücü etkiye sahip olabilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden hidrolaz akciğerde yok denecek kadar az bulunduğundan dolayı Bleomisin, akciğerde pulmoner fibrozisi olumsuz etkiler. Bu yüzden farelerde Bleomisin indüklü pulmoner fibrozis modeli, özellikle oksijen serbest radikallerinin indüklediği fibröz oluşum mekanizmasının incelenmesi için yardımcı bir araç olmaktadır (Hagiwara ve diğ. 2000). Orta dereceli ateş, lokalize göğüs ağrısı ve gastrointestinal sistem şikayetleri gibi yan etkilere yol açan Bleomisin, plevra boşluğunda sınırlı emilimi nedeniyle hastalarda az oranda sistemik toksisiteye de yol açmaktadır (Kessinger ve Wigton 1987).

Günümüzde Bleomisin'in, çeşitli kanser tiplerinin (başlıca testis kanseri, lenfoma ve yassı hücreli kanser) tedavisinde yaygın olarak kullanımı söz konusudur. Özellikle testis kanserinin tedavisinde Bleomisin, kemoterapinin indüksiyonunda kullanılan en önemli ve en temel ilaçtır.

#### **1.3.1.1.4. Bleomisin'in Yan Etkileri**

Bleomisin ile kemoterapi tedavisi gören hastaların yaklaşık %10' unda görülen en ciddi potansiyel yan etkidir. En sık rastlanan yan etki pnömonidir. Pulmoner toksisite yaşa ve doza bağlı olmakla birlikte toplam dozu 400 mg' ın üzerinde alan ve 70 yaşın üzerindeki hastalarda daha çok rastlanır. Düşük doz alan genç hastalarda da bazen pulmoner toksisite gözlemlenir. Tedavi edilen hastaların yaklaşık % 1'i pulmoner fibrozisten hayatını kaybetmektedir. Pulmoner fonksiyon testlerinde sık olarak rastlanan değişiklikler toplam akciğer hacminde ve vital kapasitede azalmadır.

Bleomisin ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %50'sinde dermatolojik ve mukokutenöz yan etkilere sıklıkla rastlanmaktadır. Bunlar eritem, kızartı, çizgi, vezikülasyon, hiperpigmentasyon ve derinin aşırı hassasiyeti şeklindedir. Ayrıca hiperkeratoz, tırnak yapısında değişiklikler, alopesi, kaşıntı ve stomatit vakaları da bildirilmiştir.

Bleomisin tedavisinin hematolojik olarak yan etkileri; trombositopeni, lökopeni, ve hemoglobin seviyelerinde hafif düşüştür.

Ateş, titreme, bulantı ve kusma Bleomisin'in sık olarak bildirilen yan etkileridir. İştahsızlık ve kilo kaybı yaygındır ve tedavi sonrasında uzun süre daha devam edebilmektedir. Bazen de diyare de görülebilir.

Ciltte bazen hiperestezi ve paresteziye ulaşabilen değişiklikler, ağız içinde, dil ve dudaklarda ülserasyonlar, genel durum bozukluğu ya da baş ağrısı ve baş dönmesi görüldüğü bildirilmiştir.

Bleomisin oligüri gibi böbrek bozuklukları, idrar yaparken ağrı ve idrar birikmesi hissi gibi üriner bozukluklara yol açabilir. Nadiren hematüri, sistit ve hemorajik sistit görülebilmektedir.

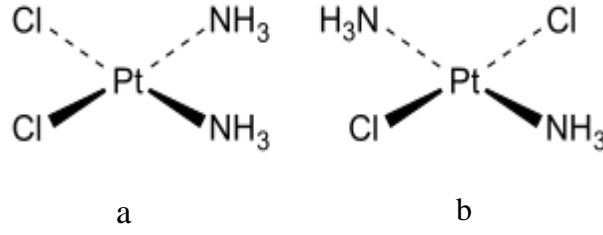
Bleomisinle birlikte farklı kemoterapötiklerin ortak kullanılması sonucu kanserli hastalarda oligo- ve azoo-spermi, spermelerde DNA hasarı (Spermon ve diğ. 2006) ile birlikte kromozomal anöploidiler (Martin ve diğ. 1999) görülmektedir. Bleomisin ile yapılan bir çalışmada, sperm sayısında azalma ve anormal sperm oranında da artışlar tespit edilmiştir (Arrebola ve diğ. 2010). Benzer şekilde başka bir çalışmada, 100 mg/kg Bleomisin'in farklılaşma sürecindeki fare spermatogonyumlarının yaşama oranını, %37'den %4'lere düşürdüğü gözlemlenmiştir (Hansen ve Sorensen 1991).

### **1.3.1.2. Sisplatin**

#### **1.3.1.2.1. Sisplatin'in Kimyasal Yapısı**

Sisplatin, 1965 yılında biyofizikçi Barnett Rosenberg ve arkadaşları tarafından, elektriksel alanın bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesine olan etkilerini incelemek için Escherichia Coli ile yaptıkları deney sırasında keşfedilmiştir. Sisplatin, 1978 yılında Amerika Gıda ve İlaç kurumunun (FDA) onayını alarak antineoplastik ilaçlardan biri olarak klinik kullanıma girmiştir ve hastalar üzerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Gonzalez ve diğ. 2001, Nozaki ve diğ. 2009, Sastry ve Kellie 2005, Wang ve Lippart 2005, Loehrer ve Einhorn 1984).

Sisplatin (cis-diaminedikloroplatinum (II), cis-platinum (II), cis-DDP, CDDP); merkezdeki iki değerlikli platin (Pt) atomuna bağlı iki klor (Cl) ve iki amonyum atomu içerir. Suda çözünebilen bir bileşiktir. Kimyasal formülü;  $Cl_2H_6N_2Pt$  ve moleküler ağırlığı ise 300.05 g/mol'dür (Wang ve Lippart 2005, Pil ve Lippard 1997). *cis* ve *trans* olmak üzere iki izomere sahiptir ve bunlardan cis formu sitotoksik özelliğe sahiptir (Çizim 1.24.) (Wang ve Lippart 2005, Loehrer ve Einhorn 1984).



Çizim 1.24. Sisplatin'in moleküler yapısı. a) *cis* formu b) *trans* formu

### 1.3.1.2.2. Sisplatin'in Etki Mekanizması

Sisplatin, alkilleyici ajanlar grubuna girmektedir. DNA çapraz bağlarını etkileyerek hızla kontrolsüz olarak çoğalan kanser hücrelerinin bölünmesini engeller. Sisplatin antitümöral etkisini gösterebilmek için hücre içerisinde reaktif platin türlerine (monoqua-diamine-platin veya diaqua-diamine-platin) hidrolize olmak zorundadır. İlaç etkinliğinin görülebilmesi için Sisplatin'in hücre içine alımı önem kazanmaktadır. Sisplatin hücre içine pasif difüzyon ve aktif transport yolu ile alınmaktadır. Pasif difüzyon ile alımında, ortamda yer alan klor iyonu konsantrasyonu önem taşımaktadır. Hücre içi klor iyonu konsantrasyonunun hücre dışı klor iyonu konsantrasyonundan az olduğu durumlarda Sisplatin, pasif difüzyon yolu ile hücre içine alınmaktadır. Sisplatin'in hücre içine aktif transport ile alımında görev alan mekanizmalar organlara göre değişiklik göstermektedir. Hücre membran proteinlerinden olan bakır transport proteini 'copper transporter 1' (CTR1) ile Golgi kompleksi ve hücre membranı arasında taşıyıcı olarak rol alan ATP7A ve ATP7B proteinleri Sisplatin'in hücre içerisine alınmasında görev alan moleküllerdir. Ayrıca organik katyon transporter (OCT) proteini de proksimal tübüllerde Sisplatin'in hücre içerisine alınmasında rol oynar (Sastry ve Kellie 2005, Wang ve Lippart 2005, Loehrer ve Einhorn 1984, Rabik ve Dolan 2007).

Sisplatin hücre içerisine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek hücrede apoptozis, nekroz, oksidatif stres, fibrojenesis, inflamasyon, hipoksi ve mitokondriyal hasara yol açarak sitotoksik etki göstermektedir. Özellikle Sisplatin konsantrasyonu hücrenin sitozolünde, mitokondriyonunda, nükleusunda ve mikrozoamlarında maksimum seviyededir (Kanter ve diğ. 2007). Sisplatin hücre içerisine alındıktan sonra su ile reaksiyona girerek sahip olduğu klor iyonlarını kaybeder ve klor iyonları yerine su molekülü olarak nükleik asitlerle ve proteinlerle reaksiyona giren pozitif yüklü aktif şekli oluşur (Sastry ve Kellie 2005, Loehrer ve Einhorn 1984).

Pozitif yüklü hale gelen aktif yeni moleküle hücre içerisindeki çiftlenmemiş elektron içeren oksijen atomları, sülfür ve nitrojen atomları, tiyoller, membrandaki fosfolipidler,

hücre iskelet elemanlarından mikrofilamanlar, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'in pürin bazları ve birçok aminoasit yan zincirleri gibi nükleofilik gruplar bağlanarak sitotoksik etki özelliği kazandırılırlar. Özellikle Sisplatin'in sitotoksik özellik gösterdiği başlıca hedef DNA'dır. Sisplatin, DNA'daki pürin bazlarının (adenin ve guanin) oldukça reaktif olan 7. azot atomu ile kolayca reaksiyona girerek tekli bağ oluştururken, DNA ile sitozol ve nükleustaki proteinler arasında, iki DNA zinciri arasında (interstrand) (cis-platinumdiamine-d (GpG)) ve en sık olarak da tek DNA zincirindeki pürin bazları arasında (intrastrand) (cis-platinumdiamine-d (ApG)) kovalent çapraz bağlar oluşturmaktadır. Oluşturduğu bu kovalent bağlar nedeniyle DNA'nın yapısını bozarak DNA'nın transkripsiyonunu ve replikasyonunu inhibe eder ve hücre döngüsünün G2 fazında durmasını sağlar. DNA'da oluşan hasar sonucunda hücre içinde bulunan ve DNA'da oluşan hasarı tanımakla görevli olan hücre içi proteinler devreye girer. Ancak Sisplatin'in modifiye ettiği DNA yeterince yenilenemediğinden dolayı ortaya çıkan DNA hasarı onarılamayacak boyutlardadır ve hücre tarafından tolere edilemez. Bu nedenle DNA hasarını tespit eden ve DNA sarmalı üzerine bağlanan proteinler birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek apoptozis ya da nekrozis yolu ile hücre ölümüne neden olurlar (Sasry ve Kellie 2005, Wang ve Lippart 2005, Loehrer ve Einhorn 1984, Rabik ve Dolan 2007, Kanter ve diğ. 2007, Tufekci ve diğ. 2009).

Sisplatin'in hücre DNA'sında sitotoksik etki oluşturmasının yanında hücrelerin mitokondriyonlarındaki işlevsel mekanizma üzerine de etkisi vardır. Sisplatin mitokondriyondan kalsiyum peroksit ( $CaO_2$ ) çıkışını artırır ve aynı zamanda oksijen taşınması işlevinde artışa neden olarak solunum hızında yükselişe ve dolayısı ile hipoksiye neden olmaktadır. ATPaz (Adenozin trifosfataz) aktivitesini de engellediği bilinmektedir. Tüm bu olaylar sonucu hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunda artışa neden olarak fibrozise neden olur (Wang ve Lippart 2005).

Sisplatin, tümör nekroz faktör alfa'nın (TNF- $\alpha$ ) da ekspresyonunu artırarak hücrede inflamasyona neden olur. Bunun yanı sıra apoptozis'i indükleyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine yol açar. ROS üretiminin neden olduğu oksidatif stres hasarı Sisplatin sitotoksitesinde önemli bir role sahiptir. Mitokondriyon, ksantin-ksantin oksidaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) tarafından reaktif oksijen türleri üretilir. Sisplatin etkisi ile tüm bu yollar tarafından üretilen reaktif oksijen türleri proteinlere, lipitlere ve DNA'yı etkileyerek yapılarına zarar verir. Sisplatin aynı zamanda Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve Hekzokinaz aktivitelerinin artışına neden olarak reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu tetikler ve Glutasyon

peroksidaz (GSH-Px), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (KAT) gibi aktif antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek antioksidanların üretiminde azalmaya yol açmaktadır. Antioksidan sistemlerinin hasar görmesi sonucunda ise lipid peroksidasyon ürünü olan Malondialdehid (MDA) düzeyi artmaktadır. Oluşan serbest radikaller, hücre membranında yer alan lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak hücre membranının lipid yapılarına zarar verir ve proteinlerin denatürasyonuna neden olur. Bunun sonucunda enzimatik inaktivasyona ve mitokondriyal işlev bozukluğuna sebep olur (Rabik ve Dolan 2007, Pil ve Lippard 1997). Serbest oksijen radikallerinin artmasına bağlı olarak serbest yağ asitleri miktarında artış görülür ve özellikle karaciğer ile böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu yükselir, fosfolipidler degrades olur, antioksidan üretimi düşer, mitokondriyodaki voltaj bağımlı kanallarla reaksiyon sonucu membran permeabilitesi değişir ve sitokrom c'nin mitokondriyondan salınmasına yol açar. Ayrıca birçok sinyal ileti yolağını aktifleştirerek hücrede apoptozisi başlatır ve hücre ölümüne sebep olur (Sastray ve Kellie 2005, Wang ve Lippart 2005, Loehrer ve Einhorn 1984, Rabik ve Dolan 2007).

#### **1.3.1.2.3. Sisplatin'in Tedavide Kullanımı**

Sisplatin mide ve bağırsak kanalından emilemediği için intravenöz (IV) ya da intraperitoneal (IP) yolla uygulanır. Her iki uygulamada da toksisite oranı aynı olarak görünse de intraperitoneal uygulama sonrasında Sisplatin konsantrasyonunun periton boşluğunda (diyaframda, mezenterde, omentumda, peritonda) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle intraperitoneal uygulama daha çok tercih edilmektedir. Vücuttan uzaklaştırılması ise üriner yol ile gerçekleşir. Sisplatin ya tek başına yaklaşık 100 mg/ m<sup>2</sup> dozda uygulanır ya da Bleomisin, Etoposid gibi diğer kemoterapötik ajanlarla yaklaşık olarak 20 mg/ m<sup>2</sup> dozda kombine olarak uygulanır. Sisplatin uygulandıktan sonra ilk 5 gün içinde ilacın %27-43'ü böbrekler ile elimine olmaktadır. Geri kalan kısmı ise daha uzun bir sürede vücuttan atılmaktadır. Yaklaşık olarak 180 güne kadar ilaç dokularda saptanabilmektedir (Loehrer ve Einhorn 1984, Mese ve diğ. 2000, Seaman ve diğ. 2003).

#### **1.3.1.2.4. Sisplatin'in Yan Etkileri**

Sisplatin'in ve benzer kemoterapötik ilaçların, tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durduran tedavi edici etkilerinin yanı sıra normal hücre ile tümör hücreleri arasındaki yapısal benzerlikten dolayı normal hücrelerin de hasar görmesine neden olan etkileri bulunmaktadır.

Sisplatin'in kullanımını sınırlayan klinik açıdan öneme sahip birçok sistem üzerinde yan etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Sisplatinin'in doz kısıtlayıcı en

iyi bilinen yan etkileri; ototoksisite, nefrotoksisite, renal toksisite, nörotoksisite ve gonadotoksisitedir. Sisplatin büyük oranda (%90) idrar yolu ile atıldığından dolayı en önemli doz sınırlayıcı yan etki nefrotoksisitedir. Diğer organlara oranla böbreklerin Sisplatin'e daha çok maruz kalması, ciddi ve geri dönüşümsüz böbrek hasarına yol açmaktadır. Böbreklerin işlevini yitirmesi, akut böbrek yetmezliği, akut tübüler nekroz, glomerüler filtrasyonun bozulması gibi yan etkilerin oluşması Sisplatin alan hastalarda sıklıkla görülmektedir (Rabik ve Dolan 2007). Bunun yanı sıra Sisplatin; şiddetli bulantı, kusma, diyare, iştahsızlık, tat duyusunda bozukluk gibi gastrointestinal sistem bozuklukları, bradikardi, hipertansiyon, serebral arterit gibi kardiyovasküler bozukluklar, saç dökülmesi, döküntü gibi dermatolojik etkiler, miyelosüpresyon, anemi, hemolitik anemi, miyelosüpresyon gibi hematolojik bozukluklar, ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonlar, karaciğer fonksiyon testlerinde artış, bilirubin seviyesinde yükselme gibi hepatik sistem bozuklukları, gen mutasyonları, kromozomal kırılmalara ve somatik hücrelerde anöploidide neden olmaktadır. İşitme kaybı, görme bozukluğu, renk algısında değişiklik, periferik nöropati gibi nörolojik bozukluklar, kemik iliği üzerine depresif etki, kas krampları, serum demir düzeyinde yükselme gibi birçok istenmeyen yan etki de görülmektedir (Rabik ve Dolan 2007, Kanter ve diğ. 2007). Ayrıca üreme organları üzerinde toksik etki sonucu infertiliteye neden olmaktadır. Sadece Sisplatin ya da Sisplatin tabanlı kombine kemoterapi alan kanserli hastaların hemen hemen hepsinde akut azoospermi şekillenmektedir (Sakamoto ve diğ. 2007). Hastaların yaklaşık yarısında kemoterapiden sonraki 6 ay ile 5 yıl arasındaki bir sürede sperm sayısında normalleşme görülmektedir (Ishikawa ve diğ. 2004). Bununla birlikte hastaların %30'unda da kalıcı azoospermi meydana gelmektedir (Petersen ve diğ. 1998). Geriye dönüşümsüz spermatogenezis hasarı ise Sisplatin'in kümülatif dozu ile ilişkili olup 400 mg/m<sup>2</sup>'den düşük dozlar uzun süre sperm üretimini baskımlarken 600 mg/ m<sup>2</sup>'den daha yüksek dozlarda kalıcı azoospermi riski artmaktadır (Colpi ve diğ. 2004, Sakamoto ve diğ. 2007). Platin bileşiklerinden karboplatin uygulaması sonucunda sıçanlarda testiküler histopatolojik lezyonlar (spermatogeneziste yavaşlama; spermatogonyum, spermatosit, spermatid, Leydig hücrelerinde azalma ve dejenerasyon), steroidogenik enzimlerin (3β-hidroksisteroid dehidrogenaz, 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz) testiküler aktiviteleri ve serum testosteron düzeyinde azalmalar, serum FSH ve LH düzeylerinde artışlar, sperm sayısı ve motilitesinde azalmalar ile ayrıca sperm membran bütünlüğünde bozulmalar gibi önemli reproduktif sistem hasarları meydana gelmektedir (Reddy ve diğ. 2010a, Reddy ve diğ. 2010b, Türk ve diğ. 2008) . Yetişkin erkek sıçanlarla yapılan pek çok çalışmada,

Sisplatin'in testis, epididimis, seminal bez ve prostat ağırlıkları, sperm yoğunluğu, motilitesi ve morfolojik olarak normal yapılı spermelerin sayısında azalmalara, seminifer tubul çaplarında daralmalara, testiküler dokuda dejenerasyon, nekroz ve ödem gibi histopatolojik lezyonlara, testiküler apoptotik germ hücre sayısı, serum FSH düzeyinde artışlara, DNA'sında kırılmalara ve testosteron düzeylerinde ise azalmalara yol açtığı bildirilmektedir (Ateşşahin ve diğ. 2006a, Ateşşahin ve diğ. 2006b, Ateşşahin ve diğ. 2006c, İlbey ve diğ. 2009a, İlbey ve diğ. 2009b, İlbey ve diğ. 2009c Türk ve diğ. 2008, Silici ve diğ. 2009, Azu ve diğ. 2010, Çiftçi ve diğ. 2011, Beytur ve diğ. 2012, Türk ve diğ. 2011, Amin ve diğ. 2008, Azu ve diğ. 2011, Ahmed ve diğ. 2011).

Oluşan bu yan etkileri önlemek için, Sisplatin hızlı enjeksiyon yerine uzun süreli infüzyon şeklinde uygulanabilir ve bu sayede atılan ilaç miktarı azaltılarak toksisite minimuma düşürülmüş olur. Eğer toksisite bu şekilde engellenemezse doz azaltılır ya da ilaç tamamen kesilir (Akşit ve Bildik 2008).

Sisplatin'e bağlı olarak gelişen toksik etkilerin önlenmesi amacıyla ilaç verilirken ve ilaç verildikten sonra salin (%0.9 NaCl) ile hidrasyon yapılması da Sisplatin'in yol açtığı toksisiteyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Salin ya da benzeri hipertonic sıvıların Sisplatin ile birlikte kullanılması Sisplatin'in vücuttan atılımını hızlandırmaktadır. Ayrıca salin yüksek oranda içerdiği klor iyonu konsantrasyonu sayesinde, Sisplatin'den klor iyonlarının ayrılması önlenerek reaktif Sisplatin türevlerinin oluşumu da engellenmiş olur (Loehrer ve Einhorn 1984, Tufekci ve diğ. 2009, Mese ve diğ. 2000).

Tedaviye devam etmek için Sisplatin'in kullanımının zorunlu olduğu durumlarda ise istenmeyen yan etkilerinden korunmak amacı ile yalnızca tümörlü hücreyi hedef alarak, ilacın antitümöral etkinliğini de engellemeden, koruyucu ajanlar birlikte kullanılarak oluşan toksisite minimuma indirilmeye çalışılır (Tufekci ve diğ. 2009).

Kemoterapötik ilaçların yan etkilerini azaltmak ya da yok etmek amacıyla, toksisiteyi önleyici ajanlarla birlikte kullanımı da son zamanlarda önem kazanmıştır ve bununla ilgili çok sayıda deneysel çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda birçok antioksidan kullanılmış ve bu antioksidanların Sisplatin'e bağlı olarak oluşan toksisiteyi azalttıkları gösterilmiştir (Tufekci ve diğ. 2009).

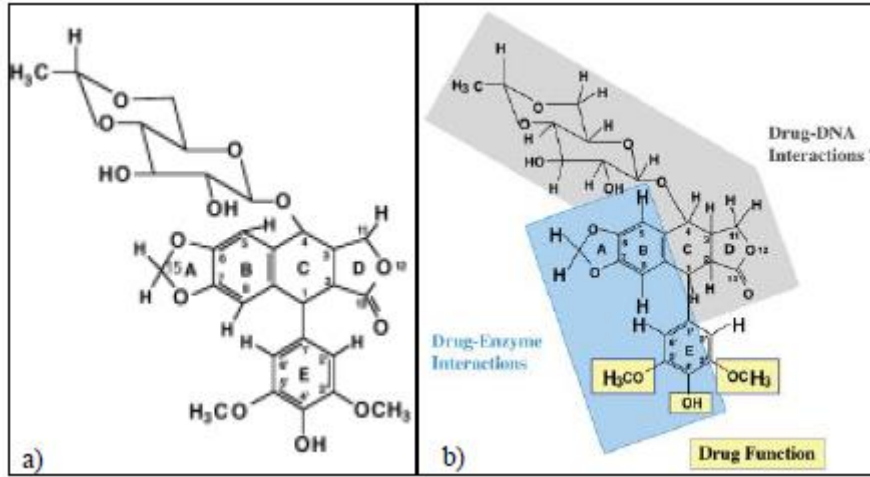
### **1.3.1.3. Etoposid**

#### **1.3.1.3.1.Etoposid'in Kimyasal Yapısı**

Etoposid (VP16), Kuzey Amerika'da May apple ve Hindistan'da Podophyllum emodi Wallich olarak adlandırılan Podophyllum peltatum bitkisi tarafından sentezlenen,

doğal olarak oluşan bir bileşik olan 4'-demetylpodophyllotoxin'in yarı sentetik bir türevidir. Son 30 yıldır klinikte kullanılmaktadır (Burden ve Osheroff 1998).

Etoposidin yapısı fonksiyonu açısından oldukça önemlidir. Etoposid'de yer alan A, B ve E halkalarının, ilaç-enzim etkileşimleri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. -OH ve -COH<sub>3</sub> gruplarının ilaç fonksiyonunda yer aldığı düşünülmektedir. Ayrıca, Etoposid yapısındaki D-halkası ve şeker parçasının DNA ile olan etkileşiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Çizim 1.25.) (Bender ve diğ. 2008).



Çizim 1.25. a) Etoposid'in kimyasal yapısı b) İzomer yapısı (Bender ve diğ. 2008).

### 1.3.1.3.2. Etoposid'in Etki Mekanizması

Etoposid ve teniposid gibi podofilotoksinler S sonu- G<sub>2</sub> fazı ile mitokondriyon fonksiyonlarını inhibe etmektedirler (Page ve Takimoto 2004, Dancey ve Arbutk 2000). Etoposid'in başlıca hücrel hedefi topoizomeraz II'dir (Wilstermann ve Osheroff 2001). Bu enzim, bir nükleik asit segmentini ayırmada meydana gelen geçici çift zincir kırığı boyunca intakt bir çift heliksi geçerek DNA'nın topolojisini değiştirmektedir (Walker ve Nitiss 2002). Topoizomeraz II enzimi, DNA rekombinasyonu ve replikasyonu gibi normal hücrel süreçlerde genetik materyalde meydana gelebilecek düğümleri çözmek için gereklidir. Topoizomeraz II yokluğunda, kardeş kromatitler ayrılamaz ve hücre, mitotik başarısızlıktan dolayı ölür (Burden ve Osheroff 1998).

Spesifik enzimleri hedefleyen birçok ilacın aksine, Etoposid ve diğer topoizomeraz II'yi hedef alan antikanser ajanlar, sinsi bir tutumla hareket ederler. Etoposid, bu enzimin aktivitesini bloklamaktan çok, topoizomeraz II-DNA bağlanma komplekslerinin konsantrasyonunu azaltarak hücreleri öldürmektedir (Burden ve Osheroff 1998). İlacın bu etkisi, topoizomeraz II'yi genomu fragmente eden potansiyel hücrel bir toksine



dönüştürmektedir. Bu nedenle, Etoposid'i enzimin toplam katalitik aktivitesini inhibe eden ilaçlardan ayırmak için topoizomeraz II zehiri olarak adlandırılır (Bromberg ve diğ. 2003).

Etoposid'in nükleik asit moleküllerini bağlamak için enzimin yeteneğini inhibe ederek topoizomeraz II ilişkili çift zincir DNA kırıklarını stabilize ettiği son on yıldan fazladır bilinmektedir (Bromberg ve diğ. 2003, Alpsy ve diğ. 2014). Ancak, ilacın moleküler mekanizması hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Diğer taraftan, tamir edilmeyen zincir kırıkları da DNA hasarı yanıtını başlatmakta ve sonucunda hücre ölümüne neden olmaktadır. Yine de, hücreler apoptozisten kaçabilir ve Etoposid'in indüklediği stres altında prolifer olmaya devam ederek bu sayede ilaca dirençli hale gelebilir. Daha önce yapılan çalışmalar ile, hücrelerde Etoposid'e karşı direnç geliştiğinde, topoizomeraz II ekspresyonunun değiştiği, topoizomeraz II'nin Etoposid'e duyarlılığının azaldığı (Schneider ve diğ. 1994), DNA yanlış eşleşme tamirine dahil olan genlerin ekspresyonunun azaldığı (Fedier ve diğ. 2001, Kaplan ve Gündüz 2012), Etoposid dirençliliğinden sorumlu olduğu düşünülen MDR1 ve MRP1 gibi ABC taşıyıcılarının ekspresyonlarının arttığı (Szak ve diğ. 2009) ortaya konmuştur.

#### **1.3.1.3.3.Etoposid'in Tedavide Kullanımı**

Etoposid kemoterapide; Kaposi sarkoma, Ewing sarkoma, akciğer kanseri, testiküler kanser, lenfoma, nonlenfomatik lösemi ve glioblastoma tedavisinde kullanılır. Sıklıkla başka ilaçlarla (testiküler kanserde asbleomisin gibi) kombine edilerek de kullanılır (Hande 1998).

#### **1.3.1.3.4.Etoposid'in Yan Etkileri**

Etoposidle birlikte birkaç kemoterapötüğün kombine olarak testiküler tümörlü hastalarda kullanılması sonucunda kemoterapiyi takip eden spermatogenezis sürecinde ve Leydig hücrelerinde fonksiyon bozukluğu (De Mas ve diğ. 2001) ile spermatozoonlarda artan derecede anöploidi gibi reproduktif yan etkiler meydana gelmektedir. Bu etkilerin ise Etoposid'den daha çok diğer ajanların etkisi ile ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (Gerres ve diğ. 1998). Prepubertal dönemde sıçanlara uygulanan Etoposid doza bağımlı olarak apoptotik germ hücre sayısında artış (Stumpp ve diğ. 2004), reproduktif organ ağırlıkları ile spermatogonyum, spermatozoid ve spermatidlerde azalma, testiküler histopatolojik lezyonlar ve infertiliteye (Freitas ve diğ. 2002) neden olmaktadır. Farelerde yapılan çalışmalarda da Etoposid'in farklılaşmakta olan spermatogonyumlar ve spermatozoidlerde kromozom kırıklarına (klastojenik etki) neden olduğu bildirilmektedir (Palo ve diğ. 2005, Marchetti ve diğ. 2006). Etoposid'in spermatogonyumlardaki klastojenik etkisinin 8 hafta

sonra da olgun spermelere taşındığı, anormal sperm sayısındaki artışın da bu durumun bir göstergesi olduğu ileri sürülmektedir (Palo ve diğ. 2005).

## 1.4. Antioksidanlar

### 1.4.1. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), esas olarak memelilerin beyinde serebral yarım küreler arasında yer alan epifiz bezinden (pineal bez) ve ayrıca over, göz merceği ve kemik iliği hücreleri ile gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur (Reiter ve diğ. 1997)

Melatonin sentezi sirkadian bir ritim göstermektedir. Sirkadian ritim, tüm ökaryotik organizmalarda varolan zamana bağlı olarak gerçekleşen devirsel işlemleri düzenleyen biyolojik bir saattir (Campbell ve Reece 2006). Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olarak, epifiz bezinde Melatonin sentezini başlatırlar. Sentezini takiben epifiz bezinden doğrudan dolaşıma verilen Melatonin, membran reseptörleri aracılığıyla hedef organlara ulaşmaktadır. Melatonin, lipofilik özelliği (lipid çözünürlüğünün suya göre yüksek olması) nedeniyle bütün hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle Melatonin'in etkileri sadece membrana yönelik olarak gerçekleşmemektedir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Hardeland ve diğ. 1993).

Çeşitli çalışmalarda doku hasarı üzerinde Melatonin'in koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Reiter ve diğ. 2003, Karbownik ve Reiter 2000, Li ve diğ. 2008).

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla birlikte, bu serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek amacıyla antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Melatonin'in en güçlü serbest radikal tutucu olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle Melatonin'e olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Millan-Plano ve diğ. 2010).

Melatonin'in bir antioksidan olduğu ilk kez 1991 yılında Ianas ve diğ. (1991) tarafından öne sürülmüş ve bu görüş daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla birlikte desteklenmiştir (Merle ve diğ., 2000). Bu çalışmalar değerlendirildiğinde, Melatonin'in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir (Brzezinski 1997, Reiter ve diğ. 2003):

1) Direkt antioksidan etki: Oksidatif strese yol açan serbest radikallerle reaksiyona girerek onların zararlı etkilerini önlemesidir.

- 2) Antioksidan enzim aracılı etki: Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz,  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırıcı etki göstermesidir.
- 3) Prooksidan enzim aracılı etki: Hidrojen peroksit, nitrik oksit gibi prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azaltıcı etki göstermesidir.



## 2.AMAÇ

Bu çalışmanın amacı; kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan BEP (Bleomisin, Etoposid, sisPlatin) rejiminin testis dokusu, sperm yapısı ve sperm parametreleri üzerinde oluşturduğu yan etkileri değerlendirmek ve bu etkilerin azaltılması veya önlenmesine yönelik koruyucu bir faktör olarak antioksidan özellikte olan Melatonin uygulanmasının erkek fertilitesi üzerine etkilerini incelemektir.

Antikanser ilaçların bulunması ve sürekli yeni ilaçların geliştirilmesi şüphesiz kanser hastalarının yaşam süresinin uzamasındaki en etkili faktörlerden biridir. Bununla birlikte bu ajanların üreme sisteminde kanserli olmayan normal doku ve hücrelerde meydana getirdiği yan etkiler erkeklerin cinsel ve fertil yaşam kalitesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bu konuyla ilgili kanserli erkekler ve sağlıklı deney hayvanlarında yapılan sayısız bilimsel çalışmanın sonuçları, özellikle genç erkeklerin gelecekteki fertilitate potansiyellerinin ciddi bir tehlike içerisinde olduğunu ne yazık ki çok açık bir şekilde ortaya koymaktadır.

Bu çalışmaların pek çoğunda kemoterapötiklerin genellikle lipid, kolesterol ve protein peroksidasyonu ile oksidatif strese yol açarak özellikle spermatogenik hücrelerde DNA hasarı, apoptosis, sperm kalitesinde düşüşler, infertilite ve hatta sterilite gibi yan etkilere neden olduğu görülmektedir. Dolayısıyla yapılan pek çok çalışmada hormon uygulamalarının ve çeşitli antioksidan maddeleri ihtiva eden tamamlayıcı ve alternatif uygulamaların kemoterapiden önce ya da kemoterapi esnasında ilaçların erkek üreme sistemindeki yan etkilerinin azaltılması veya önlenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir.

Melatonin'in endokrin ve sirkadiyen ritm üzerine bilinen etkilerinden başka son yıllarda yapılan çalışmalar, *in vivo* ve *in vitro* olarak direkt serbest radikalleri yok edici antioksidan etkiye sahip bir ajan olarak da kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Hatta antioksidanlar içerisinde, melatoninin en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürüldüğünden, melatonine olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Melatonin hormonunun antioksidan özelliği çalışmalarda gösterilmesine rağmen, BEP (Bleomisin, Etoposide, cisPlatin) rejimi uygulanması sonucu testis dokusunda ve spermde oluşabilecek apoptotik değişiklikler üzerinde nasıl bir etki gösterdiğine ve koruyuculuğunun nasıl olduğuna dair bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma ile ulaşılmak istenen hedef, BEP rejiminin testis ve sperm parametrelerinde oluşturacağı olumsuz etkileri Melatonin uygulayarak azaltmak ya da yok etmektir. Her ne kadar kemoterapi uygulanacak hastalarda tedavi öncesi sperm dondurularak önlem alınmaya çalışılsa da, bu hem sosyo-ekonomik yönden hastaya sıkıntı yaratmakta hem de alınan sperm örnekleri belirli bir süre dahilinde saklanabilmektedir. Ayrıca bu imkana sahip olmayan sağlık kuruluşları da dikkate alındığında hastanın mevcut fertilitenin korunması ya da tedavi sonrası geri kazandırılmasında yardımcı olunması daha büyük önem arz etmektedir.



### 3.YÖNTEM

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan "KOU HADYEK: 8/ 1-2015" sayılı karar numarası ile 13.07.2015 tarihinde onay alındı, tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

#### 3.1.Deney Hayvanları

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen 72 adet, 13-15 haftalık Wistar albino ırkı erkek sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar 20–22 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, uygun kafesler içerisinde barındırılarak serbestçe beslenip su içmeleri sağlandı. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca normal pelet yem ve su ile beslendi.

#### 3.1.1.Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Her grupta 12 hayvan olacak şekilde, kontrol ve deney grupları olmak üzere 6 grup oluşturuldu. Deney başından itibaren sakrifiye edilmelerinden önceye kadar hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere günlük olarak tartıldı. Kontrol ve deney grupları şu şekilde oluşturuldu (Narayana ve diğ. 2013):

- Kontrol grubu (n=12): 1 mL %0,9 salin intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.
- Melatonin'in kontrol grubu (n=12): Melatonin'in çözücü maddeleri olan etanol ve salin 1 mL olacak şekilde i.p. olarak verildi.
- BEP (Bleomisin, Etoposide, cisPlatin) uygulanan grup (n=12): 0.75 mg/kg/gün olacak şekilde Bleomisin, 7.5 mg/kg/gün olacak şekilde Etoposide ve 1.5 mg/kg/gün olacak şekilde cisPlatin 30'ar dk (dakika)'lık aralıklarla i.p. yolla verildi. BEP uygulaması, her bir siklus 21 gün olmak üzere 3 siklus olacak şekilde uygulandı.  
Bleomisin 2., 9. ve 16. günlerde; Etoposide ve cisPlatin ise her siklusun ilk haftası 1. günden 5. güne kadar uygulandı.
- BEP (Bleomisin, Etoposide, cisPlatin) uygulanan ve 9 haftalık iyileşme (recovery) sürecine bırakılan grup (n=12): 0.75 mg/kg/gün olacak şekilde Bleomisin, 7.5 mg/kg/gün olacak şekilde Etoposide ve 1.5 mg/kg/gün olacak şekilde cisPlatin 30'ar dk'lık aralıklarla i.p. yolla verildi.  
BEP uygulaması, her bir siklus 21 gün olmak üzere 3 siklus olacak şekilde uygulandı.

Bleomisin 2., 9. ve 16. günlerde; Etoposide ve cisPlatin ise her siklusun ilk haftası 1. günden 5. güne kadar uygulandı. Daha sonra hayvanlar 9 haftalık bir iyileşme sürecine bırakıldı.

- BEP (Bleomisin, Etoposide, cisPlatin)+Melatonin uygulanan grup (n=12): Melatonin, 10 mg/kg/gün olacak şekilde BEP verilmeye başlamadan 1 hafta önce i.p. olarak uygulanmaya başlandı ve daha sonra BEP uygulaması süresince, BEP enjeksiyonundan 30 dk önce 10 mg/kg/gün olacak şekilde i.p. olarak uygulanmaya devam edildi.

BEP uygulaması; 0.75 mg/kg/gün olacak şekilde Bleomisin, 7.5 mg/kg/gün olacak şekilde Etoposide ve 1.5 mg/kg/gün olacak şekilde cisPlatin 30'ar dk'lık aralıklarla, her bir siklus 21 gün olmak üzere 3 siklus olacak şekilde uygulandı.

Bleomisin 2., 9. ve 16. günlerde; Etoposide ve cisPlatin ise her siklusun ilk haftası 1. günden 5. güne kadar uygulandı.

- BEP (Bleomisin, Etoposide, cisPlatin)+Melatonin uygulanan ve 9 haftalık iyileşme (recovery) sürecine bırakılan grup (n=12): Melatonin, 10 mg/kg/gün olacak şekilde BEP verilmeye başlamadan 1 hafta önce i.p. olarak uygulanmaya başlandı. BEP uygulaması süresince BEP enjeksiyonundan 30 dk önce ve BEP uygulaması bittikten sonra 9 haftalık bir iyileşme sürecinde de 10 mg/kg/gün olacak şekilde i.p. olarak Melatonin uygulanmasına devam edildi.

BEP uygulaması; 0.75 mg/kg/gün olacak şekilde Bleomisin, 7.5 mg/kg/gün olacak şekilde Etoposide ve 1.5 mg/kg/gün olacak şekilde cisPlatin 30'ar dk'lık aralıklarla, her bir siklus 21 gün olmak üzere 3 siklus olacak şekilde uygulandı.

Bleomisin 2., 9. ve 16. günlerde; Etoposide ve cisPlatin ise her siklusun ilk haftası 1. günden 5. güne kadar uygulandı.

### **3.1.2.Sakrifikasyon**

Deney sürelerinin sonunda, i.p. olarak uygulanan Ketamine (90 mg/kg) ve Xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında, her gruptaki tüm hayvanlardan intrakardiak infüzyonla kan örnekleri alındı. Dokular alınmadan önce moleküler çalışmaların sonucunun kan bileşenleri tarafından etkilenmemesi için sıçanlar ılık serum fizyolojik ile intrakardiyak olarak perfüze edildi. Perfüzyon esnasında serum setinin iğnesi sol ventrikül içerisine sabitlendi ve sağ atrium kesilerek serum fizyolojik solüsyonunun dolaşım sistemi boyunca geçmesi sağlandı. Her bir sıçan için gerekli perfüzyon solüsyon miktarı ve perfüzyon zamanı ağırlığı ile orantılı olarak belirlendi. Perfüzyon sonrası sıçanların karın bölgesi açılarak testisleri ve epididimileri çıkarılarak ağırlıkları ölçülüp kaydedildi. Sol testislerin bir kısmı Bouin

çözeltilisine alınıp fikse edilerek histolojik boyamalar ve immünohistokimyasal çalışmalar için kullanılırken bir kısmı ise Gluteraldehit çözeltilisine alınarak elektron mikroskopisi için kullanıldı. Sağ testisler ise biyokimyasal ölçümler ve western blot çalışmaları için ayrıldı.

### **3.1.3.Vücut Ağırlıklarının Ölçümü**

Hayvanların vücut ağırlıkları, deney başından itibaren sakrifiye edilmelerine kadar, uygulanacak madde dozlarını belirlemek için günlük olarak tartılarak kaydedildi.

### **3.1.4.Testis ve Epididimis Ağırlıklarının Ölçümü**

Sakrifikasyonu takiben, çevre dokulardan iyice temizlenen sol testislerin ve epididimislerin ağırlıkları Scaltec-STB31 marka hassas terazi ile tartıldı. Tüm gruplarda, sıçanların bir kısmının sol testisleri histolojik boyamalar ve immünohistokimyasal çalışmalar için rutin histolojik doku takibi uygulanmak üzere Bouin çözeltilisi içerisine alınarak fikse edildi, bir kısmının ise elektron mikroskopi incelemeleri için %2,5'lik Gluteraldehit çözeltilisine alındı. Sağ testisler ise biyokimyasal ölçümler ve western blot çalışmaları için PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltilisi) ile yıkanarak kullanılacağı güne kadar -80 °C'de saklandı.

### **3.1.5.Sperm Sayımı ve Morfolojik İnceleme**

Perfüzyon sonrası sıçanların karın bölgesi açılarak epididimisleri çıkarıldı ve epididimisin kauda bölgesi ayrılarak, petri kabı içerisinde bulunan %10 FBS (fetal bovine serum) içeren DMEM/ F12 (Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium/ nutrient mixture F-12) solüsyonuna aktarıldı. İşlem yapılmaya kadar buz üzerinde bekletildi. Daha sonra medyum içerisine alınan epididimisin kauda kısımları insülin enjektör uçları ile parçalara ayrıldı. Bu işlem sonrası kanallar içerisindeki sperm hücreleri medyum içerisine dağıldı. Spermiumları içeren medyum konik dipli steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve 2230 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından dibe çökmüş olan pellet ile süpernatant arasında spermlerin yer aldığı kısımdan 100 µl sıvı alındı ve tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Tekrar santrifüj yapılarak %10 FBS içeren DMEM/ F12 solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı. Kalan pellet miktarı kadar tekrar %10 FBS içeren DMEM/ F12 solüsyonu eklendi ve 1:1 oranında seyreltme yapılarak karıştırıldı. Spermiumları içeren çözeltiliden mikropipet yardımıyla 10 µl alınarak lama yayıldı. Spermium örnekleri, Makler kamarasında faz-kontrast mikroskop altında incelenerek sperm sayımı yapıldı ve bulunan sayı  $2 \times 10^6$  ile çarpıldı. Ayrıca spermium örnekleri motilite açısından morfolojik olarak değerlendirildi.

Daha sonra elde edilemeyen sperm örneklerinden 0,5 ml alınarak Eppendorflara konuldu ve fiksasyon için 1 ml Carnoy'un solüsyonu (metanol+asetik asit, 3:1 oranında) eklendi ve



4 °C'de 5 dk bekletildi. Fiksasyon süresi tamamlanınca örnekler santrifüj edildi, süpernatant atılarak elde edilen pelletlerden yayma preparat hazırlandı ve havada kurutuldu (Avcı 2006). Daha sonra %0,05'lik Toluidin blue boyası ile boyama yapıldı (Kim ve diğ. 2013) ve sperm morfolojisi için ışık mikroskobunda 200 sperm seçilerek değerlendirme yapıldı. Spermatozoa boyayı tamamen alıyorsa decondanse olarak kabul edildi. Dekondanse spermler DNA'da hasara sahiptirler (Aksoy ve diğ. 2009).

### **3.2.Histolojik Boyama Yöntemleri İle Testis Dokusunun İncelenmesi**

Sıçanlardan alınan sol testisler (her grupta 8 adet), Bouin solüsyonuna alınarak 24-48 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrasında testis dokuları kasetlere alınarak çeşme suyunda yıkandı ve artan dereceli etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24 saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dakika süreyle tutuldu ve toluol içerisinde 30 dk süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56 °C'deki etüvde ilk olarak yumuşak daha sonra sert sıvı parafin içerisinde 45'er dk bekletilen testis dokuları parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan mikrotom aracılığıyla lamlara 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her bir testisten 10 kesit aralıklarla alınan 10'ar kesit üzerinde hematoksilin-eozin (H+E) ve PAS boyaması yapılarak testis dokuları Olympus BH 50 ışık mikroskobu ile incelendi. Her bir gruba ait testis dokusu örnekleri seminifer tübül çapı ve yapısı, bazal membran yapısı, hücrelerin yoğunluğu, vakuol varlığı gibi parametreler açısından değerlendirildi (Narayana ve diğ. 2009; Bancroft ve Stevens 1990).

#### **3.2.1.Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme**

Testis dokusuna ait parafin bloklardan lamlara alınan kesitler, 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra 2 saat toluol içerisinde bekletilerek kesitlerin üzerinde yer alan parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve saf suya alındı. Saf suda 10 dk bekletildikten sonra Harris Hematoksilin'de 5 dk bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyayı gidermek için akan çeşme suyunda 10 dk yıkanan kesitler asit-alkol solüsyonunda 10-15 saniye (sn) bekletilerek tekrar akan çeşme suyu altına alındı. 5 dakikalık bir yıkamadan sonra kesitler sitoplazmik boyanma için Eozin Y solüsyonunda 3 dk tutuldu ve daha sonra artan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96, %100) geçirildi. Son olarak kesitler toluolde iki kez 15'er dk bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Preparatlar, Olympus BH 50 ışık mikroskobu ile incelendi.

#### **3.2.2.PAS (Periyodik Asit Schiff) Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme**

Testis dokusuna ait parafin bloklardan lamlara alınan kesitler, 1 gece boyunca

56°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra 2 saat toluol içerisinde bekletilerek kesitlerin üzerinde yer alan parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve saf suya alındı. Kesitler periyodik asit çözeltisi içinde 5 dk bekletildi ve birçok kez değiştirilen saf su içerisinde yıkandı. Yıkamadan sonra kesitler, Schiff reaktifi içinde 15 dakika süre ile tutuldu ve bunun ardından akan çeşme suyunda 5 dakika yıkandı. Hematoksilen Gill 3 çözeltisi içerisinde 90 sn. süre ile ters boyama yapıldıktan sonra akan çeşme suyunda 15-30 sn. süre ile yıkanarak artan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96, %100) geçirildi. Son olarak ise kesitler toluolde iki kez 15'er dk bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Preparatlar, Olympus BH 50 ışık mikroskobu ile incelendi.

### **3.2.3.Seminifer Tübül Çapı Ölçümü**

Herbir grupta yer alan sıçanlardan rastgele 10 seminifer tübül seçildi. Seçilen tübüllerde enine olacak şekilde paralel çizgi çekilerek 20'lik objektif ile mikroskopta ölçüm yapıldı ve ortalamaları alındı. Daha sonra herbir grup için istatistiksel olarak hesaplama yapıldı.

### **3.2.4.İmmünohistokimyasal Uygulamalar**

Parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan seri kesitlerde, testis dokusunda bulunan PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), CD71/ Transferrin Receptor ve Dmc1/ Lim15 (DNA meiotic recombinase 1) proteinlerinin miktarlarını tayin etmek için Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Ayrıca testis dokusundaki apoptotik hücreler, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt] mediated deoxyuridine triphosphate [dUTP]-biotin nick end-labeling) yöntemi kullanılarak işaretlendi.

#### **3.2.4.1.Anti-PCNA İmmünohistokimyası**

Parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler, parafini gidermek amacıyla 1 gece boyunca 56 °C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra toluolde 3 kez 5'er dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve 2 kez 5'er dk saf su içerisinde bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra kesitler, membran permeabilizasyonu için PBS (Sigma, pH:7.4) ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (Sigma, pH:6) içerisine alınarak mikrodalga fırında 700 Watt'ta 10 dk kaynatıldı ve soğuması için oda ısısında 20 dk bekletildi. Kesitler soğuduktan sonra 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve lam üzerindeki doku kesitlerinin

etrafı hidrofobik kalem (PAP-Pen) ile çevrilerek endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanan %0,3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit, abcam) solüsyonunda 10 dk bekletildi. 2 kez 5'er dk PBS ile yıkamanın ardından, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 10 dk protein bloklama solüsyonu (abcam) uygulandı. Ardından kesitlere 1/500 dilüsyon oranında hazırlanan PCNA primer antikoru uygulandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama sonrasında kesitler, 15 dk biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda tutuldu ve tekrar 3 kez 5'er dk PBS'de yıkandı. Daha sonra kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu uygulandı. Son yıkama işlemi yapıldıktan sonra kesitlere 5 dk kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (abcam) solüsyonu uygulandı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) ile muamele edildi. Daha sonra kesitler akan çeşme suyu altında 3-4 dakika yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek (%70-%80-%90-%100), toluolde 20 dk bekletildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solüsyon (abcam) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

Sıçan testisinde Anti-PCNA pozitif boyanma esas olarak nükleusta yoğunlaşmıştır. Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile tüm gruplara ait hayvanların testislerindeki her bir tubuli seminiferi contorti'de yer alan hücrelerin immünohistokimyasal olarak hücre nükleusunda gözlenen Anti-PCNA boyanmasının şiddeti 0'dan +3'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi (Çizelge 3.1) ve H-skor yöntemi ile değerlendirilerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. H-skor hesaplamak için aşağıda yer alan formül kullanıldı.

$$H\text{-Skor} = \sum P_i(I+1).$$

I: Boyanma yoğunluğunun derecesini (0,1,2 ya da 3), P<sub>i</sub> ise her yoğunluk için boyanan hücre yüzdesini (%0-100) göstermektedir (Kilic ve diğ. 2009).

Çizelge 3.1. İmmunohistokimyasal Boyanma Yoğunluğunun Derecelendirilmesi

Derece	Anlamı
0	Ekspresyon Yok
+ 1	Zayıf
+ 2	Orta
+ 3	Güçlü

### 3.2.4.2. Anti-Dmc1/ Lim15 İmmünohistokimyası

Parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler, parafini gidermek amacıyla 1 gece boyunca 56 °C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra toluolde 3 kez 5'er dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve 2 kez 5'er dk saf su içerisinde bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra kesitler, membran permeabilizasyonu için PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, Sigma, pH:7.4) ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (Sigma, pH:6) içerisine alınarak mikrodalga fırında 700 Watt'ta 10 dk kaynatıldı ve soğuması için oda ısısında 20 dk bekletildi. Kesitler soğuduktan sonra 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve lam üzerindeki doku kesitlerinin etrafı hidrofobik kalem (PAP-Pen) ile çevrilerek endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanan %0,3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit, abcam) solüsyonunda 10 dk bekletildi. 2 kez 5'er dk PBS ile yıkamanın ardından, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 10 dk protein bloklama solüsyonu (abcam) uygulandı. Ardından kesitlere 1/500 dilüsyon oranında hazırlanan Dmc1/ Lim15 primer antikoru uygulandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama sonrasında kesitler, 15 dk biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda tutuldu ve tekrar 3 kez 5'er dk PBS'de yıkandı. Daha sonra kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu uygulandı. Son yıkama işlemi yapıldıktan sonra kesitlere 5 dk kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (abcam) solüsyonu uygulandı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) ile muamele edildi. Daha sonra kesitler akan çeşme suyu altında 3-4 dakika yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek (%70-%80-%90-%100), toluolde 20 dk bekletildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solüsyon (abcam) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

Sıçan testisinde Anti-Dmc1/Lim15 pozitif boyanma esas olarak nukleusta yoğunlaşmıştır. Leica DM 1000 ışık mikroskopu ile tüm gruplara ait hayvanların testislerindeki her bir tubuli seminiferi contorti'de yer alan hücrelerin immünohistokimyasal olarak hücre nukleusunda gözlenen Anti-Dmc1/Lim15 boyanmasının şiddeti 0'dan +3'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi ile değerlendirilerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

### 3.2.4.3. Anti-CD71/ Transferrin Reseptör İmmünohistokimyası

Parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler, parafini gidermek amacıyla 1 gece boyunca 56 °C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra toluolde 3 kez 5'er dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve 2 kez 5'er dk saf su içerisinde bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra kesitler, membran permeabilizasyonu için PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, Sigma, pH:7.4) ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (Sigma, pH:6) içerisine alınarak mikrodalga fırında 700 Watt'ta 10 dk kaynatıldı ve soğuması için oda ısısında 20 dk bekletildi. Kesitler soğuduktan sonra 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve lam üzerindeki doku kesitlerinin etrafı hidrofobik kalem (PAP-Pen) ile çevrilerek endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanan %0,3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit, abcam) solüsyonunda 10 dk bekletildi. 2 kez 5'er dk PBS ile yıkamanın ardından, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 10 dk protein bloklama solüsyonu (abcam) uygulandı. Ardından kesitlere 1/500 dilüsyon oranında hazırlanan CD71/ Transferrin Receptor primer antikorunu uygulandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama sonrasında kesitler, 15 dk biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda tutuldu ve tekrar 3 kez 5'er dk PBS'de yıkandı. Daha sonra kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu uygulandı. Son yıkama işlemi yapıldıktan sonra kesitlere 5 dk kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (abcam) solüsyonu uygulandı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) ile muamele edildi. Daha sonra kesitler akan çeşme suyu altında 3-4 dakika yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek (%70-%80-%90-%100), toluolde 20 dk bekletildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solüsyon (abcam) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

Sıçan testisinde Anti-CD71/ Transferrin reseptör pozitif boyanma esas olarak nukleusta yoğunlaşmıştır. Leica DM 1000 ışık mikroskopu ile tüm gruplara ait hayvanların testislerindeki her bir tubuli seminiferi contorti'de yer alan hücrelerin immünohistokimyasal olarak hücre nukleusunda gözlenen Anti-CD71/ Transferrin reseptör boyanmasının şiddeti 0'dan +3'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi ile değerlendirilerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

### 3.2.5.TUNEL Boyaması

Bu çalışmada, apoptozis sonucu gelişen DNA kırıklarının tanınmasını sağlamak amacıyla Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit kullanıldı (Millipore, S7101). Bu amaçla, elde edilen parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler, parafini gidermek amacıyla 1 gece boyunca 56 °C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra toluolde 3 kez 10'ar dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirildi ve 5 dk PBS içerisinde yıkandı. Daha sonra dokuların etrafı hidrofobik kalem (PAP-Pen) ile çevrilerek, membran permeabilizasyonu için PBS içerisinde 20µg/ml olacak şekilde dilüe edilen Proteinaz-K (Millipore) solüsyonunda 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 2 kez 2'şer dakika distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanol ile hazırlanan %0,3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 5 dk karanlıkta bekletildi. 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkamadan sonra kesitlere 10 dakika oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enziminde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler durdurma tamponuyla 15 sn. çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. 3 kez 1'er dk PBS'de yıkanan kesitlere oda ısısında 30 dk anti-digoksinenin-peroksidaz konjügatı uygulandı ve tekrar PBS ile yıkanarak 7 dk DAB kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Reaksiyonu durdurmak için kesitler 3 kez 1'er dk saf su ile yıkandı ve 10 dakika % 0.5 Metil green ile zıt boyama yapıldı. Boyamanın ardından 2X10 dip + 1X30 sn. saf su ile yıkama yapıldı ve N-butanolle 2X10 dip + 1X30 sn. yıkandı. Daha sonra kesitler toluole alındı ve kesitlerin üzeri kapatma medyumunu ile kapatıldı.

Tüm testis dokuları Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile incelendi. Her bir sıçana ait apoptotik indeks (Aİ) oranı, hazırlanan bir kesitte rastgele olarak seçilen 10 ayrı seminifer tübülün değerlendirilmesi ile elde edildi. Her bir tübüldeki apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle ortaya çıkan oranların ortalaması alındı ve bu oran 100 ile çarpılarak % Aİ değeri hesaplandı.

### 3.3.Ultrastrüktürel Yöntemler

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM=Transmission Electron Microscope) incelemeleri için sıçanlardan alınan sol testisler (her grupta 4 adet) Millonig tamponlu %4'lük soğuk gluteraldehit solüsyonu içerisine konuldu ve +4 °C'de 2 gün tespit edildi. İki gün boyunca sertleşen dokular, steril bistüri ucu yardımı ile 1mm<sup>3</sup>'lük parçalar haline getirildi. Daha sonra dokular Millonig tamponu ile yıkandı ve 1,5 saat aynı tampon ile hazırlanmış olan %1'lik Osmiyum tetraoksit (OsO<sub>4</sub>) ile ikinci tespit yapıldı. 3 kez 15'er dk

Millonig tamponu ile tekrar yıkanan dokular dehidratasyon için 10'ar dk sırasıyla %30, %50, %70, %80, %96'lık etanollerden ve 15 dk %100 etanolden geçirildi. Bir sonraki aşamada dokular 15 dk propilen oksitte bekletildi. Bunun ardından sırasıyla 1:1 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dk, 1:3 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dk ve saf aralditte 1 gece bekletildikten sonra yuvarlak plastik kalıplara dökülmüş saf araldit içerisine gömüldü. Kalıplar 24 saat boyunca 45°C'lik etüvde ve 48 saat boyunca 60°C'lik etüvde bırakılarak blokların polimerizasyonu sağlandı. Araldit bloklardan, önce Reichert UM2 mikrotomla 0,5 µm. kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyanarak istenilen bölgenin tespit edilmesi sağlandı. Reichert UM3 mikrotomu ile de 40-50 nm. kalınlığında ince kesitler alınarak bakır grid üzerine yapıştırıldı. Bakır gridlerdeki kesitler %70 etanol ile hazırlanmış olan doymuş uranil asetat solüsyonu ile 45 dk, bunun ardından da Reynol'un kurşun sitratı ile 15 dk boyandı. Jeol Jem-1011 model elektron mikroskopunda incelen kesitlerin fotoğrafları Olympus Veleta TEM CCD kamera ile çekildi. Deney gruplarındaki her bir sıçanın testis dokularında bulunan hücrelerin ultrastrüktürel özellikleri araştırıldı.

Tubuli seminiferi contorti'lerin yapısı, bazal membrane yapısı, sperm hücrelerindeki nükleus ve organel morfolojisi; kromatin düzeni; sentriyol yapısı, aksonem yapısı, mitokondrionların sayısı, bütünlüğü, boyutu, membran yapısı ve krista sayısı; granüllü ve düz endoplazmik retikulum yapısı; hücreler arası alanın özelliği; sekonder lizozom, lipid damlacıklarının ve vakuollerin varlığı; apoptotik ve otofajik hücreler değerlendirildi.

### **3.4. Western Blot Tekniği İle İnceleme**

Western blot tekniği ve biyokimyasal analizler için öncelikle -80 °C'de saklanan testis dokuları buz içerisinde çözdürülerek proteinleri izole edildi. İzole edilen proteinler eşit şekilde iki eppendorfa bölünerek, birisi Western blot ile inceleme yapmak için diğeri de biyokimyasal analizler için kullanıldı. Western blot için izole edilen proteinlerin total konsantrasyonu hesaplandı. Sonraki aşamalarda SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ile proteinler ayrıştırılarak nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer sonrası PCNA (PC10, Santa Cruz, sc-56), CD71/ Transferrin Receptor (H68.4, Santa Cruz, sc-65882), Dmc1/ Lim15 (2H12/4, Santa Cruz, sc-53269) ve β-aktin (Beta aktin) antikorları ile blotlama yapıldı (Narayana ve diğ. 2013).

### **3.4.1. Dokulardan proteinlerin izole edilmesi ve protein konsantrasyonunun hesaplanması**

Donmuş testis dokusu örnekleri 1X PBS ile yıkandı. Axygen 1,5 ml Eppendorf tüpleri içerisine dokular ve yaklaşık 200 µl Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) ve 25X proteaz inhibitörü (Roche) eklendi. Bu karışıma yeteri miktarda zirkonyum bead eklenerek +4 °C'de, hızı 8'e ayarlanmış Bullet Blender içerisinde 4 dakika homojenize edildi. Homojenat elde edildikten sonra eşit şekilde iki eppendorfa bölünerek, birisi Western blot ile inceleme yapmak için diğeri de biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Western blot için homojenat +4 °C'de 14000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice temiz Axygen tüplere alındı ve +4 °C'de 15000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Tekrar süpernatant dikkatlice temiz Axygen tüplere alınarak total protein konsantrasyonunu belirlemek için, eppendorfa 1 mL Bradford çözeltisi koyularak üzerine 1 µL örnek ekleyerek mavileşmesine bakıldı ve 1/20 dilüsyon yapılmasına karar verildi. Buna göre her protein örneği için, eppendorfa 9 µL 2D diluent ve 1 µL mL protein örneği eklendi. Karışım vortekslendikten sonra bu karışımdan 1 µL alındı ve başka eppendorfta hazırlanan 1 mL Bradford çözeltisi ve 19 µL 2D diluent karışımı üzerine eklendi. 5 dakika karanlıkta bekletildi ve Bradford metodu kullanılarak Nanodrop cihazında (BioRAD) okutuldu (Narayana ve diğ. 2012). Analiz edilecek parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak verildi. Daha sonra her grup için o grupta yer alan tüm sıçanların izole edilen proteinleri birleştirilerek havuz oluşturuldu ve jele yüklemeye önce her grubun pool'u Bradford metodu kullanılarak Nanodrop cihazında tekrar okutuldu.

### **3.4.2. Protein Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

İki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasına önce ayırma jeli üstten 5 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeyine 2 mm yüksekliğe kadar su ile doyurulmuş n-butanol pipet ile eklendi. Jel polimerize olduktan sonra n-butanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdı ile cam plakalar arası temizlendi ve ayırma jeli eklenerek yükleme tarağı yerleştirildi. Jel polimerize olduktan sonra tanka yerleştirildi. Yüklenmek istenen protein çözeltilerinin hacimlerine göre 6X yükleme tamponu 1X olacak şekilde eklendi. Protein çözeltileri 95 °C'de 5 dakika kaynatılarak buz üzerine alındı ve kısa bir santrifüjden sonra mikropipet yardımıyla jelde yer alan yükleme kuyucuklarına yüklenerek, yürütme tamponu içerisinde 180 V'da 60 dakika yürütüldü. Yürütme sonunda jel cam plakalardan çıkarıldı ve 1 saat fiksatifte shaker'da bekletildi. Daha sonra jel, Coomassie mavisi içeren boyama solüsyonuyla boyanarak bantlar görüntüldü. Uygun bant görünüşleri elde edildikten sonra jeller distile suda yıkanarak boyadan arındırıldı ve genel olarak bantlar



değerlendirildikten sonra antikorları uygulamak üzere tekrar jel döküldü. Bunun için her bir jelin ilk kuyucuğuna 2,5 µl prestained marker yüklendi ve sonraki kuyucuklara da her bir gruptan elde edilen pool'lar her bir kuyucukta 15 µg protein olacak şekilde yüklendi ve yürütme tamponu içerisinde 180 V'da 60 dakika yürütüldü.

#### **3.4.3. Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi**

Elektroforez tamamlandıktan sonra proteinleri jelden nitroselüloz membrana aktarmak için semi-dry bir yöntemi kullanan Trans-Blot Turbo transfer sistemi (BioRad) kullanıldı. Transfer için özel tampon hazırlanması gerekmektedir. Jeller yürütüldükten sonra transfer tamponu içerisinde yıkandı. Uygun filtre kağıtları kullanılarak jelden membrana transfer için uygun ortam hazırlandı. Transfer işleminin doğru bir şekilde gerçekleşmesi için sıralama filtre kağıdı-membran-jel-filtre kağıdı olacak şekilde yapıldı. Hazırlık aşaması esnasında kullanılan her materyal transfer tamponu ile yıkandı. Bu sistem için hazır olan uygun program kullanılarak transfer işlemi başlatıldı ve yaklaşık olarak 15 Volt'ta 20 dakika sürdü. Transferin gerçekleştiğini görebilmek için Ponceau-S boyası ile membranlar 1 dakika boyanarak bantlar gözlemlendi. Daha sonra membranlar distile su ile Ponceau-S boyasından arındırıldı.

#### **3.4.4. Proteinlerin özel antikorlar ile membran üzerinde gözlenmesi**

Nitroselüloz membran üzerinde spesifik olmayan boyamaları saf dışı etmek için 37 °C'de 1 saat %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (% 0,1 Tween 20 içeren Tris buffer saline) tamponunda inkübe edildi. Bu bloklama işlemi sonrası membranlar, TBS-T tamponuyla bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez yıkandı. Daha sonra membranlar PCNA (dilüsyon oranı: 1/750), CD71/ Transferrin Receptor (dilüsyon oranı: 1/500), ve Dmc1/ Lim15 (dilüsyon oranı: 1/500) primer antikorları kullanılarak gece boyunca +4 °C'de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası primer antikor uzaklaştırmak için membranlar, bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez TBS-T tamponuyla yıkandı. Yıkama işlemi biten membranlar, HRP konjuge sekonder antikor (m-IgGκ BP-HRP, Santa Cruz, sc-516102, dilüsyon oranı: 1/20000) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sekonder antikor uzaklaştırmak için membranlar, bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez TBS-T tamponuyla yıkandı. Membran üzerine sinyal oluşumunu sağlayacak ECL-Kemilüminesans substrat eklenerek PDQuest Advanced 2-D Analysis (BioRad) Software'de ışımlar gözlemlendi ve kaydedildi. PDQuest Advanced 2-D Analysis Software'den elde edilen protein band yoğunlukları Image J programında BioRad jel görüntüleme sisteminde ölçüldü (Ozgul ve diğ. 2015).

İstenen primer antikorlar ile görüntü elde edildikten sonra membranlar, stripping solüsyonu içerisinde oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda membranlar, bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez TBS-T tamponuyla yıkandı. Yıkama sonrası membranlar, üzerinde spesifik olmayan boyamaları saf dışı etmek için 37 °C'de 1 saat %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (% 0,1 Tween 20 içeren Tris buffer saline) tamponunda inkübe edildi. Bu bloklama işlemi sonrası membranlar, TBS-T tamponuyla bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez yıkandı. Daha sonra membranlar,  $\beta$ -aktin primer antikoru (dilüsyon oranı: 1/2000) kullanılarak gece boyunca +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası primer antikoru uzaklaştırmak için membranlar, bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez TBS-T tamponuyla yıkandı. Yıkama işlemi biten membranlar, HRP konjuge sekonder antikoru ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sekonder antikoru uzaklaştırmak için membranlar, bir kez 15 dakika iki kez 5'er dakika olmak üzere üç kez TBS-T tamponuyla yıkandı. Membran üzerine sinyal oluşumunu sağlayacak ECL-Kemilüminesans substrat eklenerek PDQuest Advanced 2-D Analysis (BioRad) Software'de ışımlar gözlemlendi. PDQuest Advanced 2-D Analysis (BioRad) Software'den elde edilen protein band yoğunlukları Image J programında BioRad jel görüntüleme sisteminde ölçüldü (Ozgul ve diğ. 2015).

Bu işlemler üç kez tekrarlanarak her bir antikoru için üç ayrı sonuç elde edildi ve bu sonuçların ortalaması alınarak grafik elde edildi.

### **3.5.Biyokimyasal İnceleme**

Deney sonunda intrakardiyak infüzyonla EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)'lı tüplere alınan kan örnekleri, KOÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. Elde edilen plazmalar -40 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Daha sonra plazmalar çözdürülerek Testosteron, FSH ve LH hormonlarının seviyesi biyokimyasal olarak ELISA kitleri ile ölçüldü. Ayrıca testis dokusundan elde edilen homojenatlarda biyokimyasal olarak MDA (Malondialdehit), SOD (Super Oksit Dismutaz), GSH (Glutasyon), TAS (Total Antioksidant Status), TOS (Total Oksidant Status) ölçümleri yapıldı. Deney sonunda intrakardiyak infüzyonla kırmızı kapaklı düz tüplere alınan kan örnekleri, KOÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serumlar -40 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Daha sonra serumlar çözdürülerek MDA, SOD, GSH, TAS ve TOS ölçümleri yapıldı.

### **3.5.1. Doku homojenizasyonu**

Donmuş testis dokusu örnekleri çözdürülerek 1X PBS ile yıkandı. 1,5 ml safelock Eppendorf tüpleri içerisine dokular ve yaklaşık 200 µl Tissue-PER tamponu (T-PER) solüsyonu ile 25X proteaz inhibitörü (Roche) eklendi. Bu karışıma yeterli miktarda zirkonyum bead eklenerek +4 °C'de, hızı 8'e ayarlanmış Bullet Blender içerisinde 4 dakika homojenize edildi. Homojenat elde edildikten sonra eşit şekilde iki eppendorfa bölünerek, birisi Western blot ile inceleme yapmak için diğeri de biyokimyasal analizler için kullanıldı. Biyokimyasal analizler için kullanılan homojenatlar, 15 dk 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı ve eppendorflara alınarak -80 °C'de analiz edilecekleri zamana kadar saklandı.

### **3.5.2. Doku protein tayini**

Total protein tayini Lowry modifiye metodu kullanılarak yapıldı (Hartree 1972). Analiz edilen parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak tayin edildi.

### **3.5.3. Dokuda MDA, GSH, SOD, TAS ve TOS Tayini**

#### **3.5.3.1. Doku MDA düzeylerinin tayini**

Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 535 nm'de maksimum absorbanı veren pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleksin verdiği renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülerek, örnek içindeki MDA konsantrasyonu tayin edildi (Buege ve Aust 1978).

#### **3.5.3.2. Doku GSH düzeylerinin tayini**

Non-protein sülfidril gruplarının tümü redükte glutatyon formundadır. DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit), Ellman's ayracı), disülfid bir kromojendir ve sülfidril grubu içeren bileşiklerle kolayca redükte olarak koyu sarı renkli bir bileşik oluşturur. Bu redükte kromojenin 412 nm'de ölçülen absorbanı GSH konsantrasyonu ile direkt olarak orantılıdır (Ellman 1959). Doku GSH düzeyleri doku protein miktarına, eritrosit GSH düzeyleri ise eritrosit hücresi sayısına oranlanarak verildi.

#### **3.5.3.3. Doku SOD aktivite tayini**

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenmekte ve

% inhibisyon hesaplanmaktadır. CuZn-SOD aktivitesi doku için U/g protein olarak ifade edildi (Sun ve diğ. 1988).

#### **3.5.3.4. Doku TAS Ölçümü**

Rel Assay Diagnostic “Total Antioxidant Status Assay Kit” (Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Homojenize edilmiş testis dokusu örneğinde bulunan antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit]) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemektedir. 660 nm'deki absorbans değişikliği, doku örneğinin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Analiz, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan dengeli bir antioksidan standart solüsyonu ile kalibre edildi.

#### **3.5.3.5. Doku TOS Ölçümü**

Rel Assay Diagnostic “Total Oxidant Status Assay Kit” (Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Homojenize edilmiş testis dokusu örneğinde bulunan oksidanlar, ferröz iyon-şelatlayıcı kompleksini ferrik iyonla oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan arttırıcı (enhancer) moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, doku örneğinde bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilgilidir. Doku örneği, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edildi ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L).

### **3.5.4. Plazmada Testosteron, FSH ve LH Tayini**

#### **3.5.4.1. Testosteron Hormonu Ölçümü**

-40 °C'de saklanan plazmalar çözdürülerek, Elabscience (Wuhan, China) Rat T (Testosterone) ELISA Kit (E-EL-R0033) kullanılarak çalışıldı.

#### **3.5.4.2. FSH Ölçümü**

-40 °C'de saklanan plazmalar çözdürülerek, Elabscience (Wuhan, China) Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone) ELISA Kit (E-EL-R0391) kullanılarak çalışıldı.

#### **3.5.4.3. LH Ölçümü**

-40 °C'de saklanan plazmalar çözdürülerek, Elabscience (Wuhan, China) Rat LH (Luteinizing Hormone) ELISA Kit (E-EL-R0026) kullanılarak çalışıldı.

### 3.5.5. Serumda MDA, SOD, GSH, TAS ve TOS Tayini

#### 3.5.5.1. Serum MDA düzeylerinin tayini

##### Ayıracılar:

##### 1- Stok Standard (10mM):

Standard çözeltisi 1,1,3,3 tetra etoksipropan (TEP) maddesinden hazırlandı. 10 mM'lık TEP stok standardından 0,1 mL alındı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

##### 2- Stok TBA-TCA-HCl ayıracı:

%100 (w/v)'lük TCA (trikloroasetik asit) çözeltisinden 15 mL alınarak 100 mL'lik balon jöjeye konuldu. 0,375 g. TBA tartılarak balon jöjeye konuldu. 2,083 mL HCl eklendi. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

##### Çalışma yöntemi:

##### Çizelge 3.2. Serum MDA düzeyini ölçmek için kullanılan madde miktarları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
KCl	1	0,75	0,75
Distile H <sub>2</sub> O	-	-	-
Standart	-	0,25	-
Homojenat	-	-	0,25
Ayıraç	2	2	2

Tüplere belirtilen oranlarda maddeler eklenerek vorteksilendi (Çizelge 3.2). 15 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantların 535 nm'de absorbansları okutuldu.

#### 3.5.5.2. Serum GSH düzeylerinin tayini

##### Ayıracılar:

##### 1- Proteinsizleştirme çözeltisi:

1,67 g. glasiyel metafosforik asit,  
0,20 g. disodyum EDTA,  
30 g NaCl, 100 mL'lik balon jöje içerisinde distile su ile çözüldü.

##### 2- Disodyum fosfat çözeltisi (0,3 M):

42,59 g. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1000mL'lik balon jöje içerisinde distile su ile hazırlandı.

##### 3- Ellman renk ayıracı:

100 mL'lik balon jöje içerisinde, 40 mg. DTNB %1'lik sodyum sitrat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

#### 4- GSH standartı (0,1 mg/mL):

1 mg. glutatyon 10 mL distile su ile çözülerek taze olarak hazırlandı.

#### 5- KCl (0,15 M):

2,8 g. KCl, 250 mL'lik balon jofede distile su ile çözülerek hazırlandı.

### Çalışma Yöntemi:

**Çizelge 3.3.** Serum GSH düzeyini ölçmek için kullanılan madde miktarları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
KCL	2	1,5	1,5
Homojenat	-	-	0,5
GSH standartı	-	0,5	-
Proteinsizleştirme	3	3	3

Tüplere belirtilen oranlarda maddeler eklenerek vorteksilendi ve bütün tüpler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi (Çizelge 3.3). Tüplerin üst kısmındaki süpernatantlar alınarak bundan sonraki aşamalarda kullanıldı.

**Çizelge 3.4.** Serum GSH düzeyini ölçmek için supernatan aşamasından sonra kullanılan madde miktarları

Çözelti	Kör (mL)	Standart(mL)	Örnek(mL)
Süpernatant	0,5	0,5	0,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	2	2
Ellman	0,5	0,5	0,5

Tüplere belirtilen oranlarda maddeler eklenerek vorteksilendi ve bütün tüplerin 412 nm'de absorbans tayinleri yapıldı (Çizelge 3.4).

#### 3.5.5.3. Serum SOD aktivite tayini:

Eritrosit hemolizati 10 mM fosfat tamponu (pH:7.00) ile dilüe edilir. 25 µL dilüsyonlu hemolizat, 50 mmol/L CAPS (3-(sikloheksilaminol)-1-propansülfonik asit) ve 0,094 mmol/L EDTA (pH:10.2) içeren bir tampon solüsyonunda 0,05 mmol/L ksantin sodyum ve 0,025 mmol/L INT içeren 850 µL substrat solüsyonu ile karıştırıldı. 125 µL ksantin

oksidaz (80 U/mL) karışıma eklenerek absorbans artışı 505 nm'de 3 dakika izlendi. Serum SOD aktivitesi U/g Hb olarak ifade edildi (Sun ve diğ. 1988).

#### **3.5.5.4. Serum TAS Ölçümü:**

-40 °C'de saklanan serumlar çözdürüldü ve Rel Assay Diagnostic “Total Antioxidant Status Assay Kit” (Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Serumda bulunan antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit]) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemektedir. 660 nm'deki absorbans değişikliği, serum örneğinin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Analiz, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan dengeli bir antioksidan standart solüsyonu ile kalibre edildi.

#### **3.5.5.5. Serum TOS Ölçümü:**

-40 °C'de saklanan serumlar çözdürüldü ve Rel Assay Diagnostic “Total Oxidant Status Assay Kit” (Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Serumda bulunan oksidanlar, ferröz iyon-şelatlayıcı kompleksini ferrik iyonla oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan arttırıcı (enhancer) moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, serum örneğinde bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilgilidir. Serum örneği, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edildi ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L).

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testini değerlendirmek için Kolmogorov-Smirnov Testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren nümerik (sayısal) değişkenler ortalama +/- standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler ise medyan (25. persantil - 75. persantil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık; normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Kruskal Wallis Testi ile gösterildi. Çoklu karşılaştırmalar Tukey, Dunn ve Dunnett testleri kullanılarak yapıldı. Tekrarlayan ölçümler arasındaki farklılıkları belirlerken normal dağılım varsayımı sağlandığı için eşleştirilmiş t-testi kullanıldı.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlılık için yeterli olarak kabul edildi.

### 3.7. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

#### 3.7.1. Kimyasal Malzemeler

Xylazine (50 ml)

Ketamin (500 mg) (Pfizer: 150086)

Bouin (Sigma, HT10132)

Absolute Ethanol (Merck Millipore: 100983)

Etanol %96 (Tekkim)

Toluol (Merck Millipore: 108327)

Parafin (Merck Millipore: 107151)

Entellan (Merck Millipore: 107961)

Su bazlı şeffaştırıcı solüsyon (abcam)

Metanol (Sigma: 24229)

Proteinaz K (Merck Millipore: 21627)

Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit (Millipore: S7101)

PCNA antikoru (PC10) (Santa Cruz, sc-56)

CD71/ Transferrin Receptor antikoru (H68.4) (Santa Cruz, sc-65882)

Dmc1/ Lim15 antikoru (2H12/4) (Santa Cruz, sc-53269)

$\beta$ -aktin antikoru (C4, Santa Cruz, sc-47778)

Metilen green (TM of Trevigen)

Hidrojen Peroksit (Merck Millipore: 107298)

Mouse specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Abcam, [ab64259](#))

Mayer's Hematoxylin (Labvision: TA-125-MH)

Araldite M (Fluka Analytical: 10951)

Araldite M 960 (Fluka Analytical: 10952)

Araldite M 964 (Fluka Analytical: 10953)

Gluteraldehit (Merck Millipore: 104239)

Osmium tetroxide (EMS: 19134)

Propilen oksit (Merck: 8.07027.1000)

NaOH / sodyum hidroksit (Sigma 06203)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ sodyum karbonat (Sigma S7795)

CuSO<sub>4</sub>/ bakır (II) sülfat (merck A810587 504)

KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O / potasyum sodyum tartarat (merck A655285)

BSA / sığır serum albümin ( sigma A4563)

Folin&Ciocalteu's Fenol Reaktifi 2N (sigma F9252)



PBS / fosfat tamponu (sigma P 4417)  
CAPS / (3-(sikloheksilaminol)-1-propan sülfonik asit) (sigma C2632)  
INT / 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium klorit (sigma I-10406)  
EDTA / Etilendiamin tetraasetik asit ( sigma E9884)  
Ksantin / (sigma X-2502)  
Ksantin Oksidaz / (sigma X-1875)  
TEP / 1,1,3,3 tetra etoksipropan (sigma T-9889)  
TCA / trikloro asetik asit ( merck k45499307 432)  
TBA / Tiyobarbitürik asit 8sigma T-5500)  
HCl / hidroklorik asit Redei-de Haen 30721)  
KCl/ potasyum klorür (sigma P-9333)  
Glasiyel metafosforik asit ( merck K45762146 444)  
NaCl / sodyum klorür Riedel-de Haen 13423)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / disodyum fosfat (merck A335874 223)

### **3.7.2. Cihazlar**

pH metre (İnolab wtw)  
Buzdolabı (Arçelik)  
Hassas terazi (Scaltec-STB31)  
Vorteks (LMS)  
Mikrodalga (Regal)  
Etüv (Elektro-mag)  
Mikrotom (Leica SM 200R)  
Işık mikroskobu (Leica DM 1000) ve Kamera (Leica DMC 2900)  
Ultramikrotom (Reichert UM2 - Reichert UM3)  
Transmisyon elektron mikroskopu (Jeol Jem-1011) ve kamera Olympus Veleta TEM CCD  
IKA T18 Digital ULTRA TURRAX homojenizatör  
Alisei Quality System Seac Radim Company analyser (Italy/Rome)-ELISA READER  
UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer- SHIMADZU  
BECKMAN COULTER DXI-600 otoanalizörü

## 4.BULGULAR

### 4.1.Vücut ve Organ Ağırlıkları

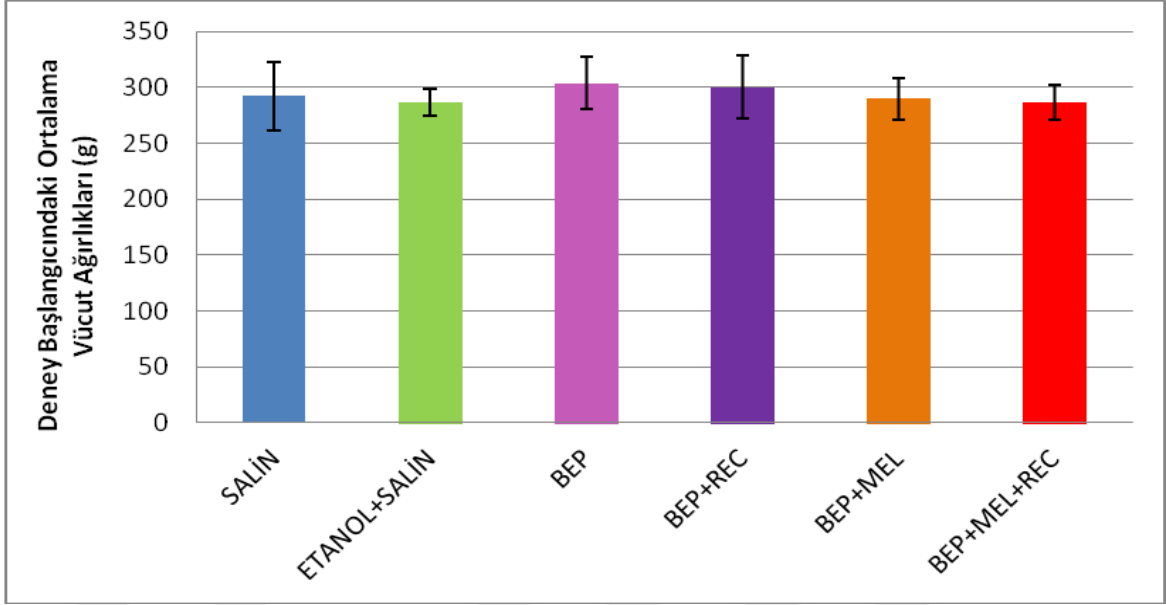
#### 4.1.1. Deney Başlangıcı Vücut Ağırlıkları

Kontrol (Salin) grubu, Melatonin'in çözücü kontrol (Etanol+Salin) grubu, BEP uygulanan grup, BEP uygulanan ve 9 haftalık iyileşme (recovery) sürecine bırakılan grup (BEP+REC), BEP+Melatonin uygulanan grup (BEP+MEL), BEP+Melatonin uygulanan ve 9 haftalık iyileşme (recovery) sürecine bırakılan gruplara (BEP+MEL+REC) ait sıçanların, deney başlangıcındaki vücut ağırlıklarına ilişkin bulguları çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Sıçanların, deney başlangıcındaki vücut ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0,267$ ) (Çizim 4.1).

Çizelge 4.1. Gruplara göre sıçanların deney başlangıcındaki ortalama vücut ağırlıkları (g)

Gruplar	Ortalama Ağırlık (g) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	292,1667±30,33700	0,267
Melatonin'in çözücü kontrolü (Etanol+Salin)	286,3333±11,92654	
BEP	303,9167±22,88890	
BEP + Recovery	300,3333±28,60494	
BEP + Melatonin	289,5833±18,03259	
BEP + Melatonin + Recovery	286,4167±15,79677	



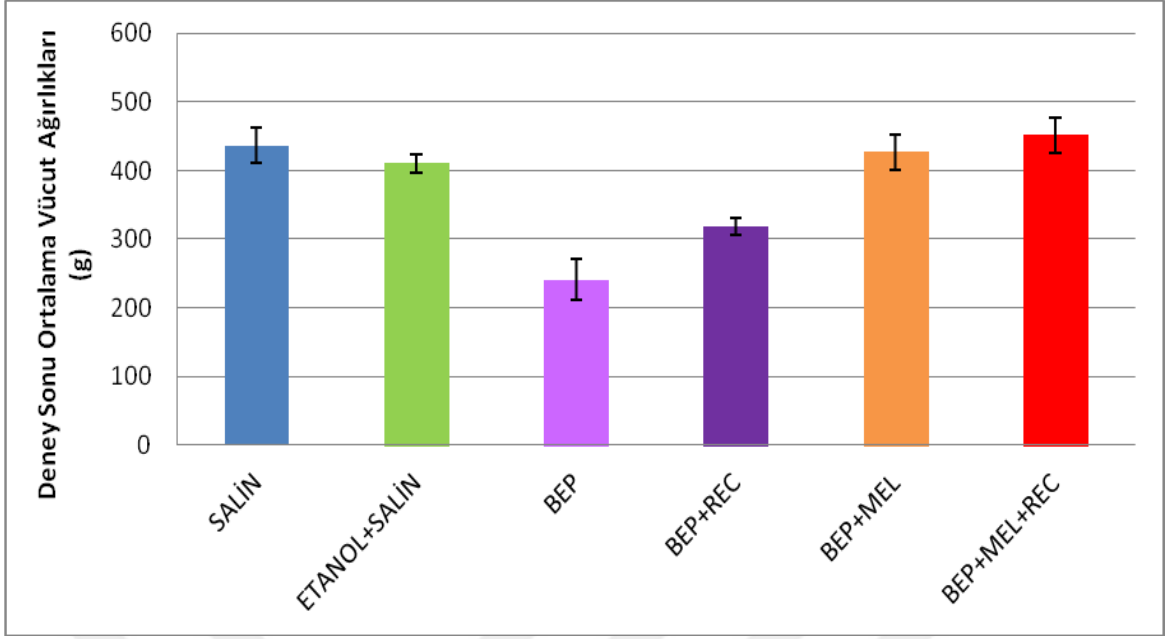
Çizim 4.1. Sıçanların deney başlangıcındaki ortalama vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması ( $p=0,267$ ). Gruplardaki değerler ortalama ( $X$ )±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.1.2. Deney Sonu Vücut Ağırlıkları

Sıçanların deney sonu vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında; salin grubu ile etanol+salin grubu, BEP + Melatonin ve BEP + Melatonin + Recovery grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ). BEP ve BEP + Recovery grupları, Salin grubu ile karşılaştırıldığında görülen azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,000$ ) (Çizelge 4.2, Çizim 4.2).

Çizelge 4.2. Gruplara göre sıçanların deney sonu ortalama vücut ağırlıkları (g)

Gruplar	Ortalama Ağırlık (g) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	436,6667±26,32777	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (Etanol+Salin)	410,0833±13,02067	
BEP	240,8000±29,36665	
BEP + Recovery	318,4000±12,65087	
BEP + Melatonin	426,9167±25,43605	
BEP + Melatonin + Recovery	451,3333±26,41740	



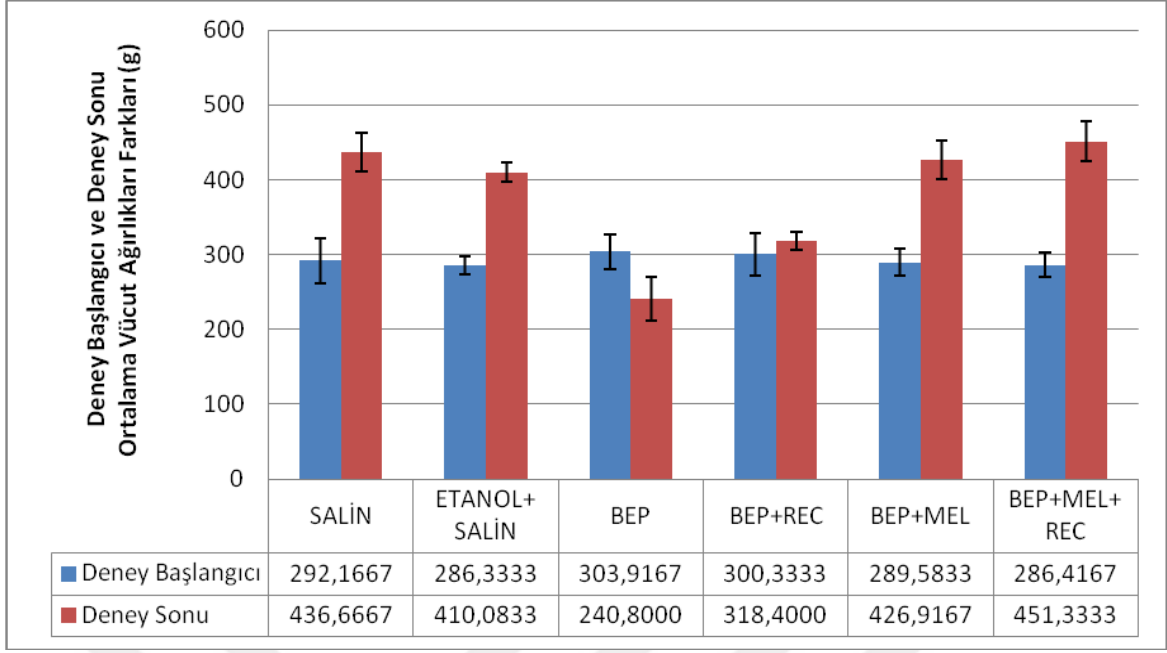
Çizim 4.2. Sıçanların deney sonu ortalama vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.1.3. Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Deney başlangıcı ve deney sonu gruplar arası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,080$ ). Ancak gruplar kendi içerisinde incelendiğinde; salin grubunda deney sonunda deney başlangıcına göre vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p=0,009$ ). Etanol+salin grubunda da deney sonunda deney başlangıcına göre vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p=0,000$ ). BEP grubuna bakıldığında vücut ağırlığında anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p=0,000$ ). BEP+Recovery grubunda ise anlamlı bir vücut ağırlığı artışı görülmemiştir ( $p=0,150$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında, deney sonunda deney başlangıcına göre vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p=0,000$ ). (Çizelge 4.3, Çizim 4.3).

Çizelge 4.3. Gruplara göre sıçanların deney başlangıcı ve sonundaki ortalama vücut ağırlıkları (g)

Gruplar		Ortalama Ağırlık (g) ± Standart Sapma	Eşleştirilmiş t testi	Gruplar arası P değeri
Kontrol (Salin)	Deney başlangıcı	292,1667±30,33700	p=0,009	p=0,080
	Deney sonu	436,6667±26,32777		
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	Deney başlangıcı	286,3333±11,92654	p=0,000	
	Deney sonu	410,0833±13,02067		
BEP	Deney başlangıcı	303,9167±22,88890	p=0,000	
	Deney sonu	240,8000±29,36665		
BEP + Recovery	Deney başlangıcı	300,3333±28,60494	p=0,150	
	Deney sonu	318,4000±12,65087		
BEP + Melatonin	Deney başlangıcı	289,5833±18,03259	p=0,000	
	Deney sonu	426,9167±25,43605		
BEP + Melatonin + Recovery	Deney başlangıcı	286,4167±15,79677	p=0,000	
	Deney sonu	451,3333±26,41740		



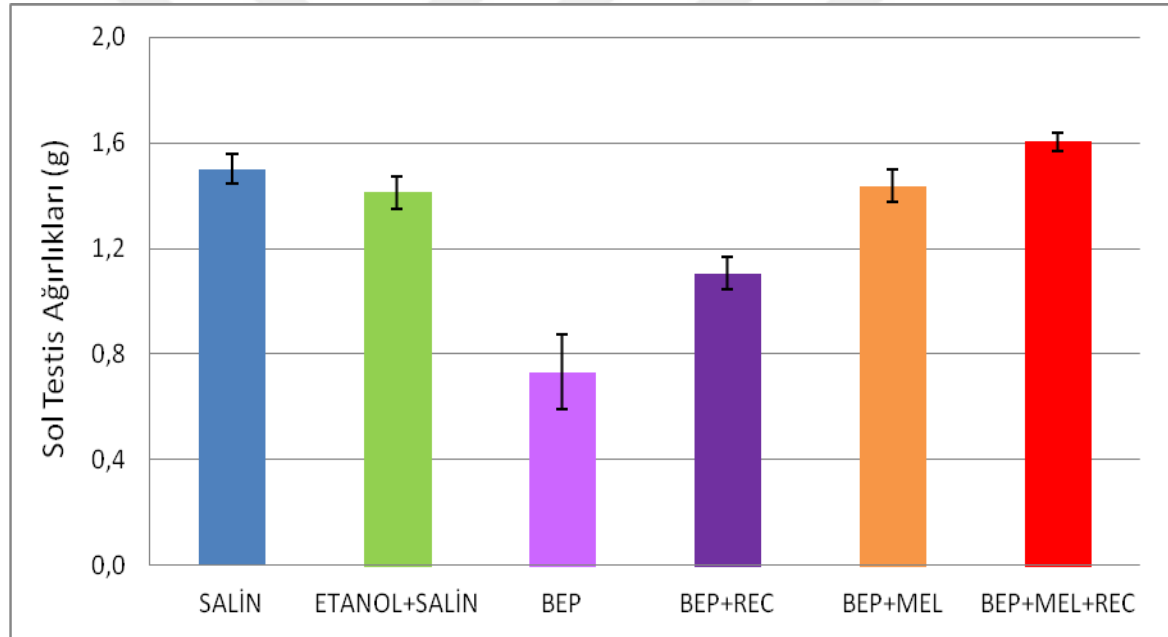
Çizim 4.3. Sıçanların deney başlangıcı ve deney sonu ortalama vücut ağırlıkları arasındaki farkların gruplara göre karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.1.4. Testis Ağırlıkları

Gruplar arasında sol testis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek sol testis ağırlığı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük sol testis ağırlığı ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,054$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,291$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,015$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p<0,01$ ). BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre sol testis ağırlığında anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p<0,01$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,01$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,01$ ) (Çizelge 4.4, Çizim 4.4).

Çizelge 4.4. Gruplara göre sıçanların sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması (g)

Gruplar	Ortalama Testis Ağırlığı (g) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	1,5012±0,05518	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	1,4127±0,06060	
BEP	0,7327±0,14151	
BEP + Recovery	1,1055±0,06066	
BEP + Melatonin	1,4367±0,06311	
BEP + Melatonin + Recovery	1,6040±0,03504	



Çizim 4.4. Sıçanların ortalama sol testis ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

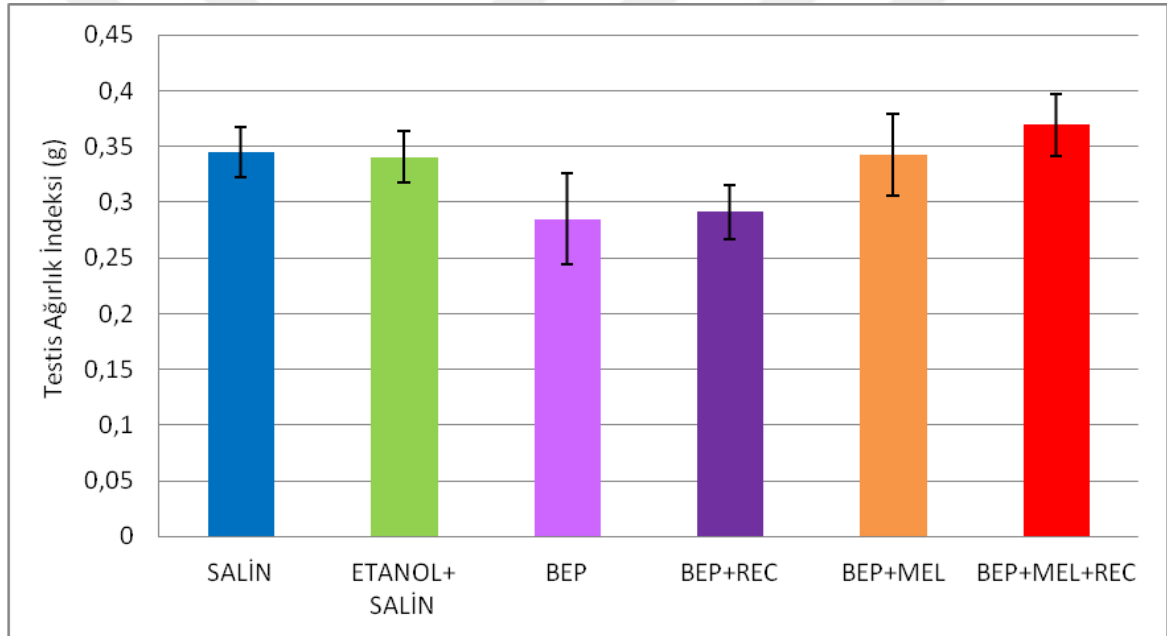
#### 4.1.4.1. Testis ağırlık indeksi (TAİ)

Göreceli olarak  $TAİ = (\text{sol testis ağırlıkları toplamı} / \text{vücut ağırlığı}) \times 100$  formülü ile hesaplandı (Şahintürk ve diğ. 2007).

Grupların testis ağırlık indeksleri (TAİ) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre TAİ'de anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p=0,000$ ) (Çizelge 4.5, Çizim 4.5).

Çizelge 4.5. Gruplara göre sıçanların testis ağırlık indekslerinin karşılaştırılması (g)

Gruplar	TAİ (g) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	0,3448±0,02235	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,3406±0,02330	
BEP	0,2849±0,04040	
BEP + Recovery	0,2912±0,02400	
BEP + Melatonin	0,3424±0,03650	
BEP + Melatonin + Recovery	0,3696±0,02770	



Çizim 4.5. Gruplara göre sıçanların testis ağırlık indekslerinin karşılaştırılması (g). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.1.5. Epididimis Ağırlıkları

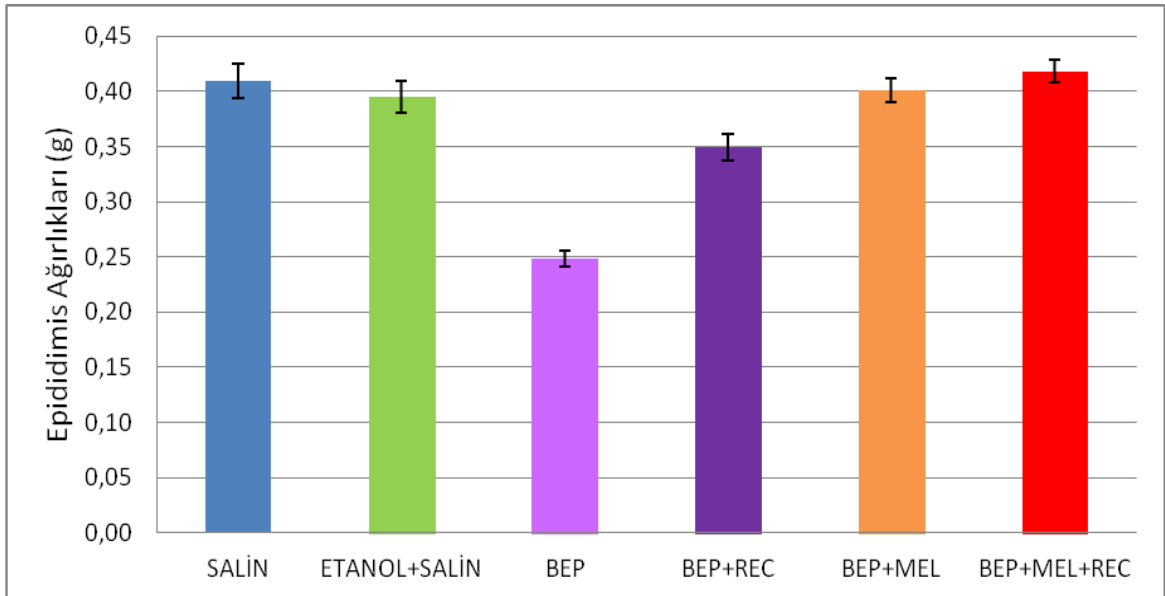
Gruplar arasında epididimis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek epididimis ağırlığı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük epididimis ağırlığı ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,079$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,588$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,491$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre epididimis ağırlığında



anlamli bir azalış söz konusudur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,15$ ) (Çizelge 4.6, Çizim 4.6).

Çizelge 4.6. Gruplara göre sıçanların epididimis ağırlıklarının karşılaştırılması (g)

Gruplar	Ortalama Epididimis Ağırlığı (g) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	0,4090±0,01541	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,3955±0,01440	
BEP	0,2484±0,00702	
BEP + Recovery	0,3493±0,01198	
BEP + Melatonin	0,4010±0,01074	
BEP + Melatonin + Recovery	0,4177±0,01020	



Çizim 4.6. Sıçanların ortalama epididimis ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama ( $\bar{X}$ )±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

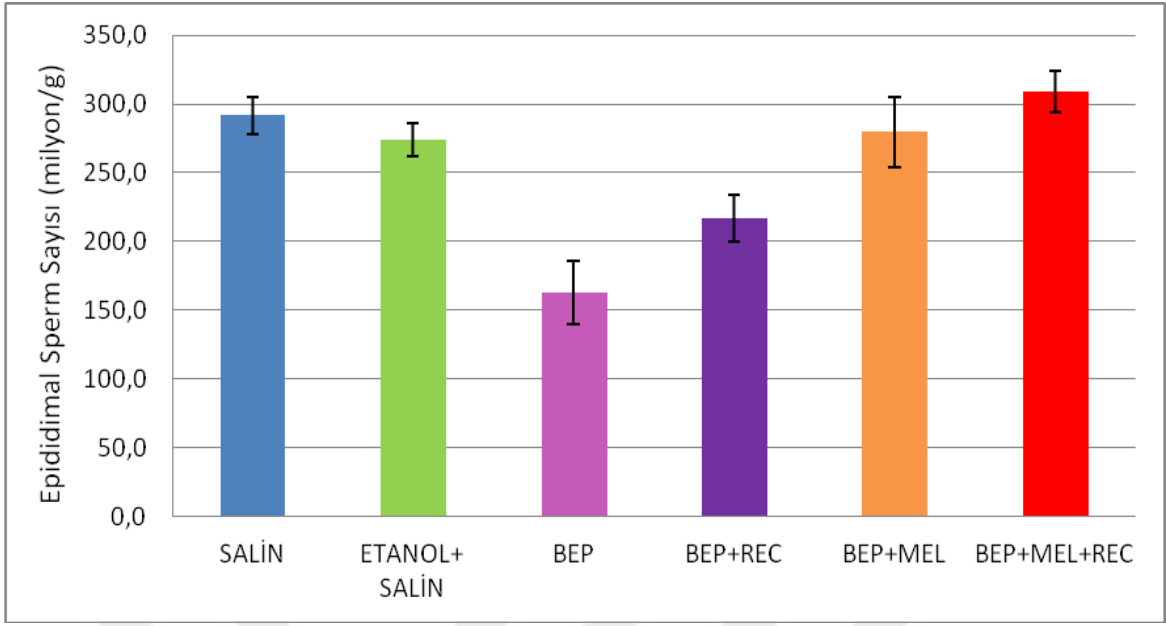
## 4.2. Epididimal Sperm Sayımı ve Morfolojik İnceleme Bulguları

### 4.2.1. Epididimal Sperm Sayımı

Grupların epididimal sperm sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek epididimal sperm sayısı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük epididimal sperm sayısı ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,174$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,573$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,170$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre epididimal sperm sayısında anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre epididimal sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,02$ ) (Çizelge 4.7, Çizim 4.7).

Çizelge 4.7. Gruplara göre sıçanların epididimal sperm sayısı (milyon/g)

Gruplar	Sperm sayısı (milyon/g) $\pm$ Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	291,583 $\pm$ 13,1181	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	274,000 $\pm$ 11,7473	
BEP	163,000 $\pm$ 23,0507	
BEP + Recovery	217,167 $\pm$ 16,9214	
BEP + Melatonin	279,500 $\pm$ 25,1197	
BEP + Melatonin + Recovery	309,250 $\pm$ 14,9248	



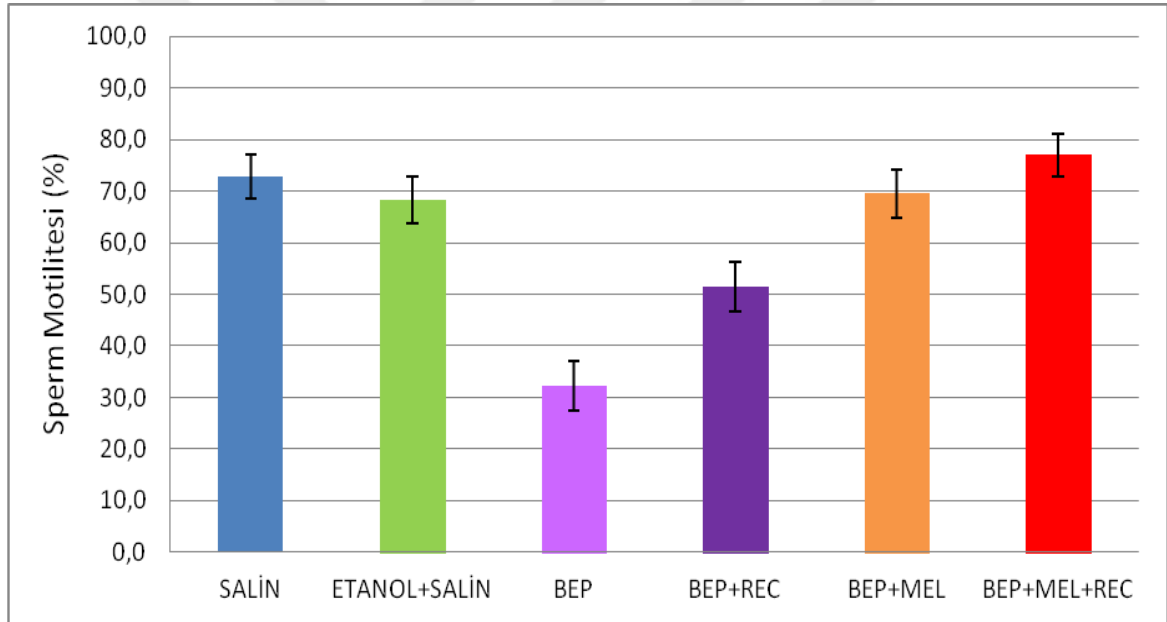
Çizim 4.7. Gruplara göre sıçanların epididimal sperm sayısı (milyon/g). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.2.2. Sperm Motilitesi

Grupların sperm motilitesi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek sperm motilitesi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük sperm motilitesi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,154$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,483$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,239$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre sperm motilitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre sperm motilitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,02$ ) (Çizelge 4.8, Çizim 4.8).

Çizelge 4.8. Gruplara göre sıçanların sperm motilitesi (%)

Gruplar	Sperm motilitesi (%) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	72,8333±4,28174	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	68,2500±4,59496	
BEP	32,2000±4,77959	
BEP + Recovery	51,5000±4,88194	
BEP + Melatonin	69,5000±4,77684	
BEP + Melatonin + Recovery	77,0000±4,17786	

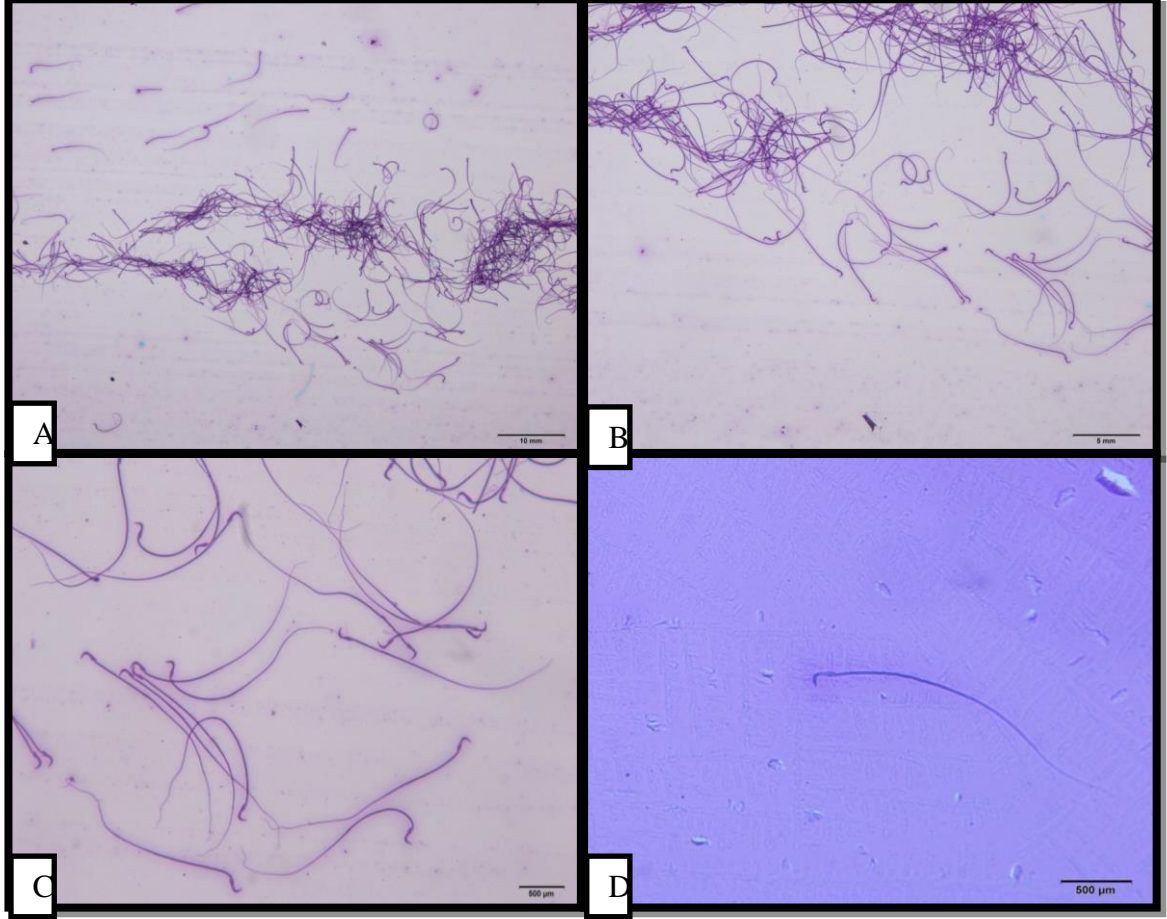


Çizim 4.8. Gruplara göre sıçanların sperm motilitesi (%). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

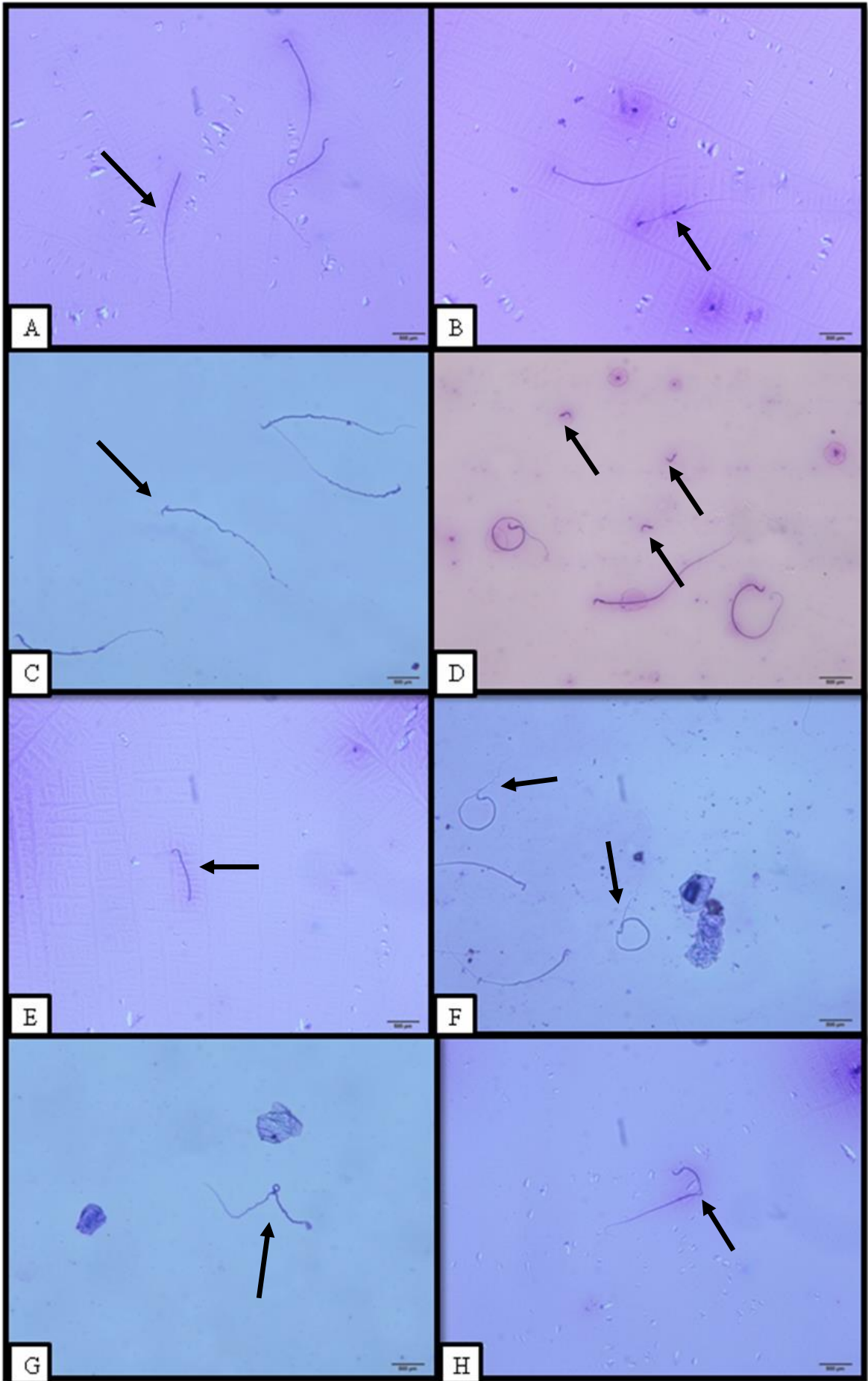
#### 4.2.3. Sperm Morfolojisi

Toluidin blue ile boyanan spermelerin morfolojilerine bakıldığında; salin grubu, etanol+salin grubu, BEP+Melatonin uygulanan grup ve BEP+Melatonin+Recovery grubunda sperm morfolojileri normaldir ve bu gruplar arasında fark yoktur (Çizim 4.9 ve Çizim 4.11). Ancak BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda başsız (pin-head), küçük ve yuvarlak başlı, çift başlı, kopuk başlı, kısa kuyruklu, orta parça hasarı olan, kement benzeri

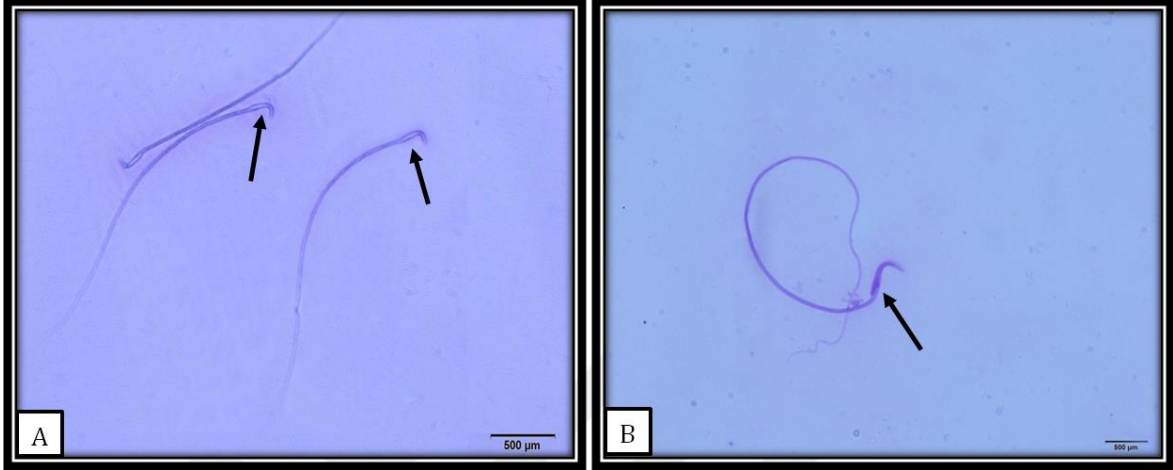
(lasso-like) olan anomalili spermiler görüldü ve toluidin blue boyasını alan DNA bütünlüğü bozulmuş olan spermiler tespit edildi (Çizim 4.10 ve Çizim 4.11).



**Çizim 4.9.** Salin, Etanol+Salin, BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait sıçanların normal sperm morfolojileri



Çizim 4.10. BEP ve BEP+Recovery gruplarına ait sıçanların sperm anomalileri. A. Başsız sperm, B. Küçük ve yuvarlak başlı sperm, C. Çift başlı sperm, D. Kopuk başlı sperm, E. Kısa kuyruklu sperm, F. Kement benzeri (lasso-like) sperm, G-H. Orta parça hasarı olan sperm.



**Çizim 4.11.** A. Salin, Etanol+Salin, BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait sıçan sperminde toluidin blue boyaması ile görülen normal kromatin yapısı B. BEP ve BEP+Recovery gruplarına ait sıçan sperminde toluidin blue boyaması ile görülen kromatin hasarı.

### 4.3. Işık Mikroskopi Bulguları

#### 4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Bulguları

Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların testis dokusu örneklerinin genel görünümünü saptamak amacıyla H&E boyaması uygulandı. Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların testis dokusu örnekleri seminifer tübül çapı ve yapısı, bazal membran yapısı, hücrelerin yapısı ve yoğunluğu, nekrozis, vakuol varlığı gibi parametreler açısından morfolojik olarak değerlendirildi.

Kontrol (salin) grubuna ait testis kesitlerine ışık mikroskopunda bakıldığında, normal histolojiye sahip oldukları görüldü. Seminifer tübül yapılarının normal olduğu saptandı. Tüm spermatogenik seri hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlemlendi. Spermatidlerin başının Sertoli hücresi sitoplazmasına gömülü bir şekilde olduğu ve kuyruklarının lümenine doğru uzanmış biçimde yerleştikleri görüldü. Sertoli hücreleri de normal yapıda gözlemlendi. Bu bulgular düzgün bir spermatogenez sürecinin varlığını göstermektedir. Tunika albuginea, bazal membran ve interstisyel alanda herhangi bir dejenerasyona rastlanmadı (Çizim 4.12).

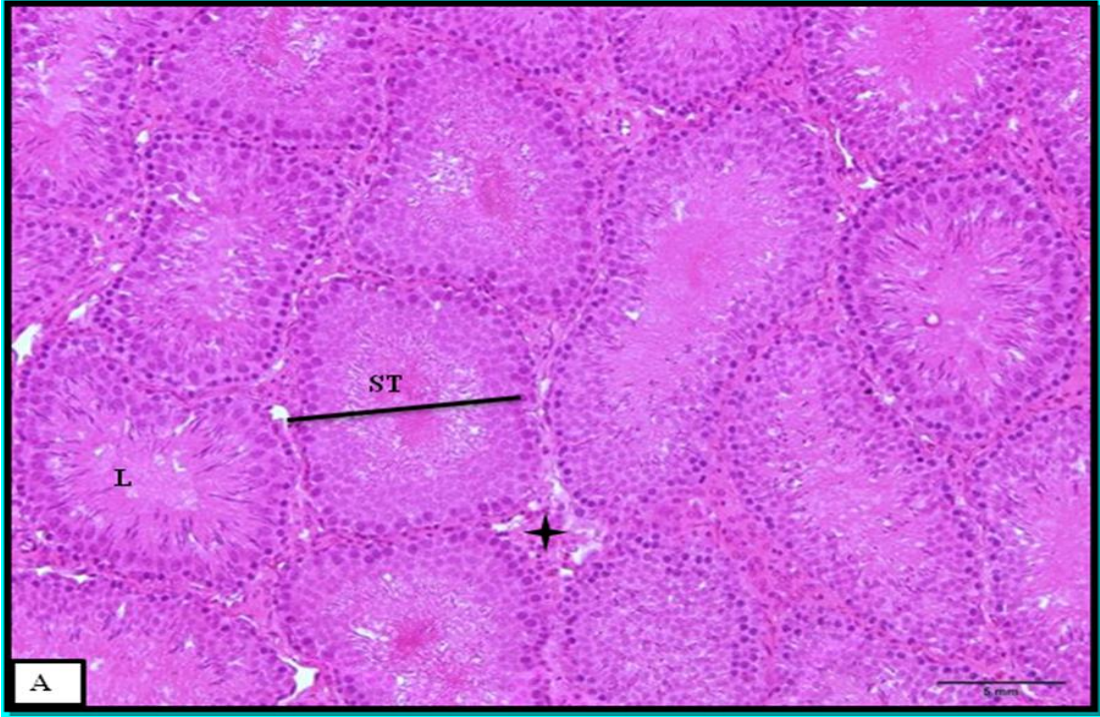
Etanol+Salin uygulaması yapılan gruba ait testis dokuları histomorfolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna eş değer görünüm izlendi (Çizim 4.13).

BEP uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, spermatogenik hücre serilerinin tübül duvarından ayrılması ve seminifer tübül lümeninde serbest hale gelen hücresel döküntüler birlikte izlendi. Düzenli bir interstisyel alan ve seminifer tübül histolojisine rastlanmamıştır. Bazı seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi görülmüştür. Ayrıca konjesyon ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Birçok nukleusun kaynaşmasıyla oluşmuş dev hücrelere sık olarak rastlandı. Bazı tübüllerde bu dev hücrelerin lümenine döküldüğü gözlemlendi (Çizim 4.14, Çizim 4.15).

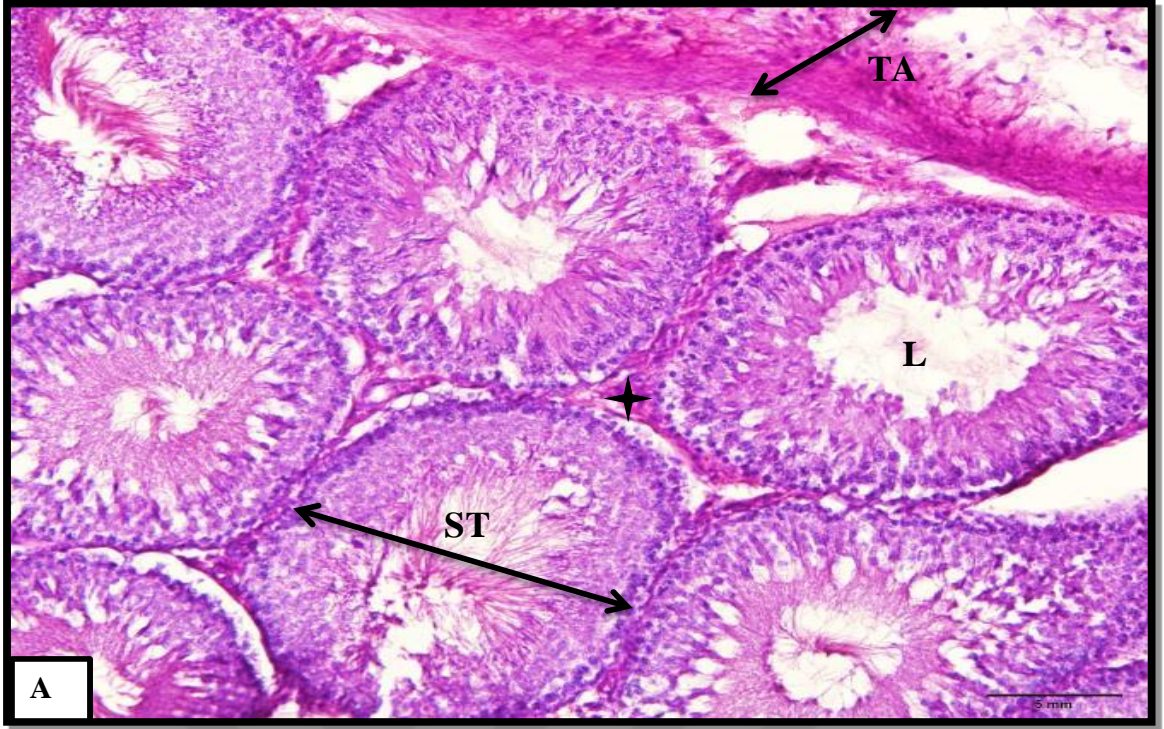
BEP+Recovery uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, BEP grubuna benzer özellikler gözlemlendi. Ancak dev hücrelere nadir olarak rastlandı (Çizim 4.16).

BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, Salin ve Etanol+Salin grubuna benzer şekilde normal testis dokusu yapısı gözlemlendi (Çizim 4.17, Çizim 4.18).

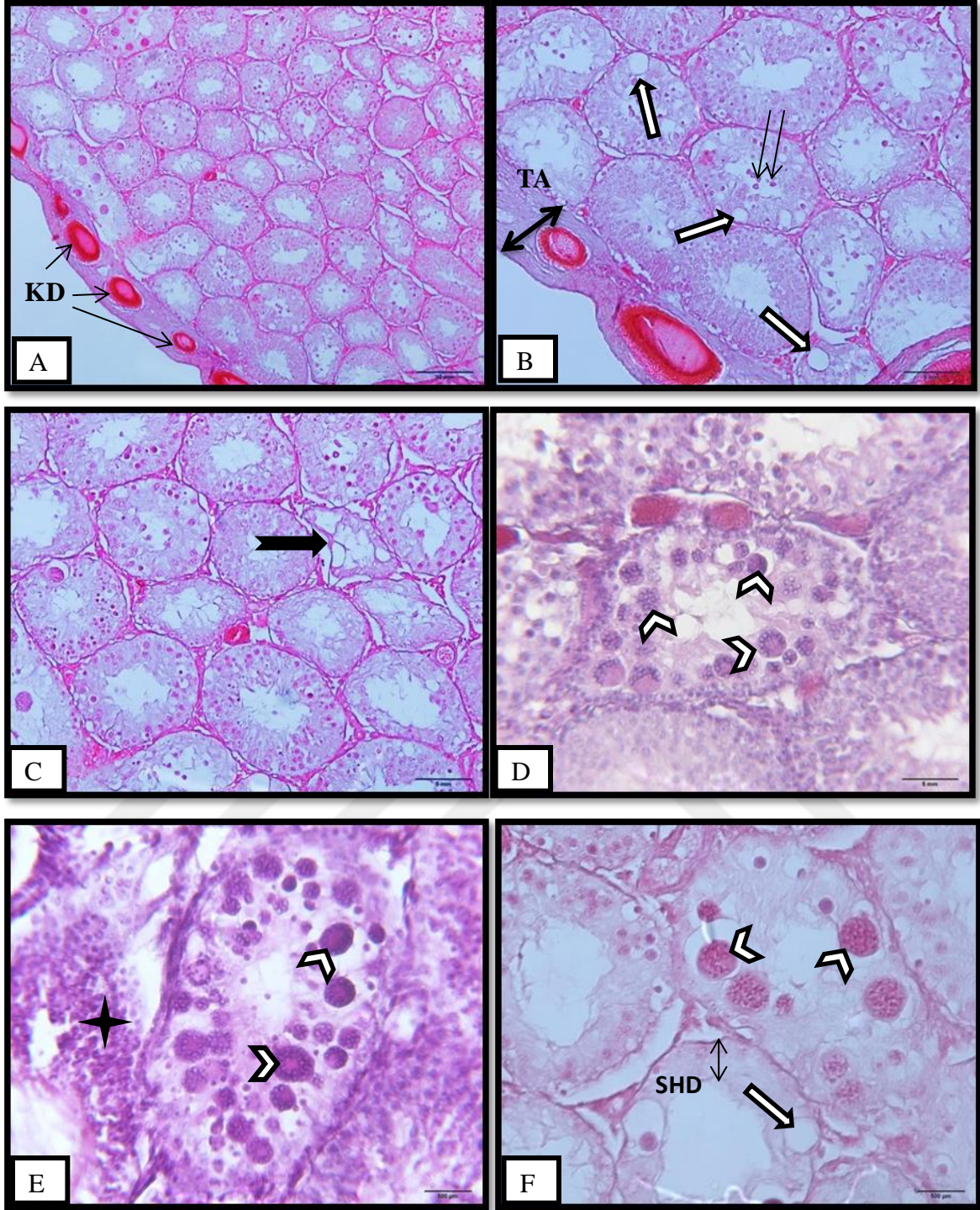




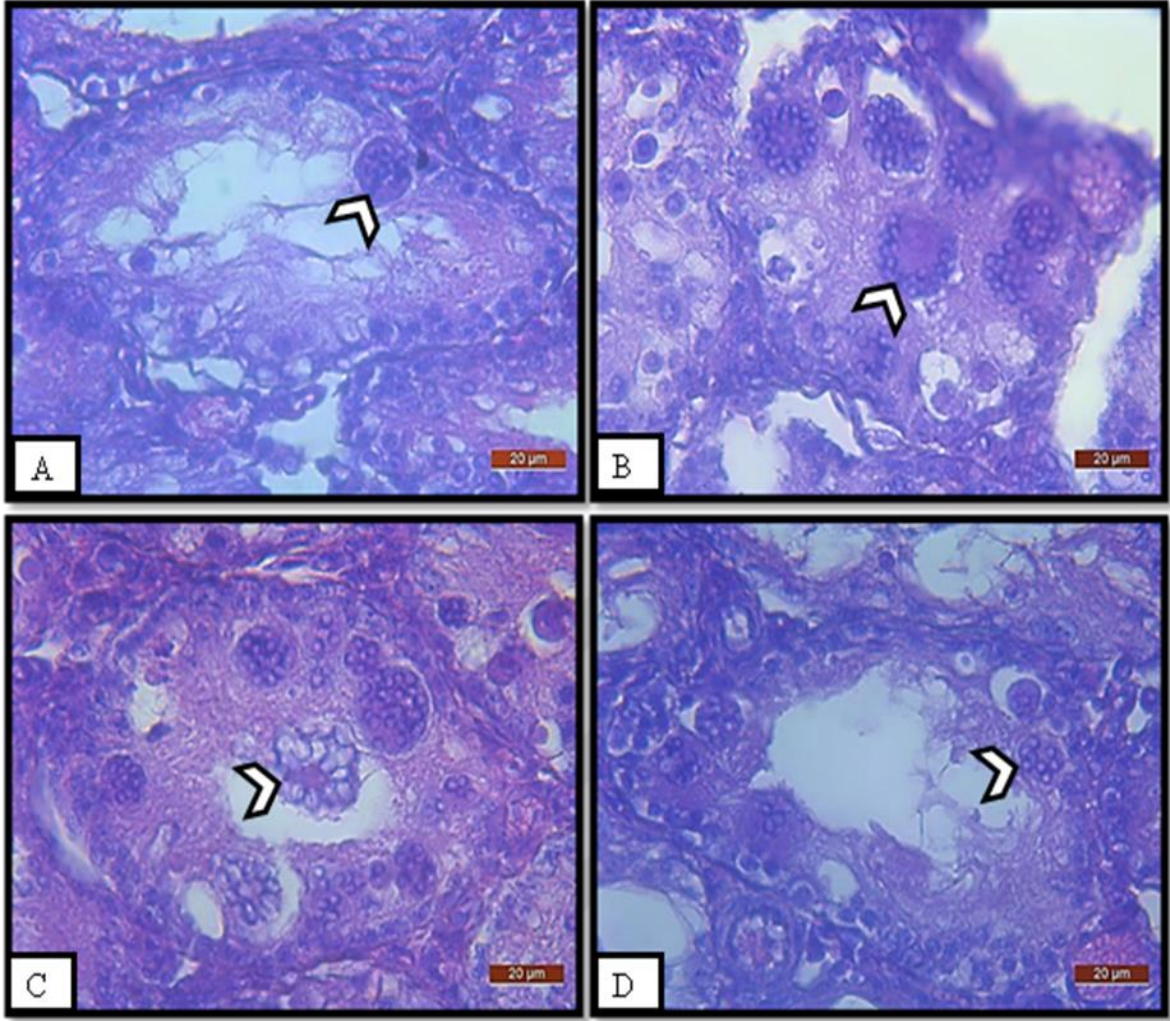
Çizim 4.12. Kontrol (Salin) grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A:10x, B: 20X.  
ST: seminifer tübül, L: lümen, ✦: interstisyel alan, →: spermatid,  
⋈ : spermatosit, ⇨: spermatogonyum.



Çizim 4.13. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A:10x, B: 20X. TA: tunika albuginea, ST: seminifer tübül, L: lümen, ✦ : interstisyel alan, → : spermatid başı, ⇨ : spermatid kuyruğu, ⇨ : spermatosit, ⇨ : spermatogonyum.

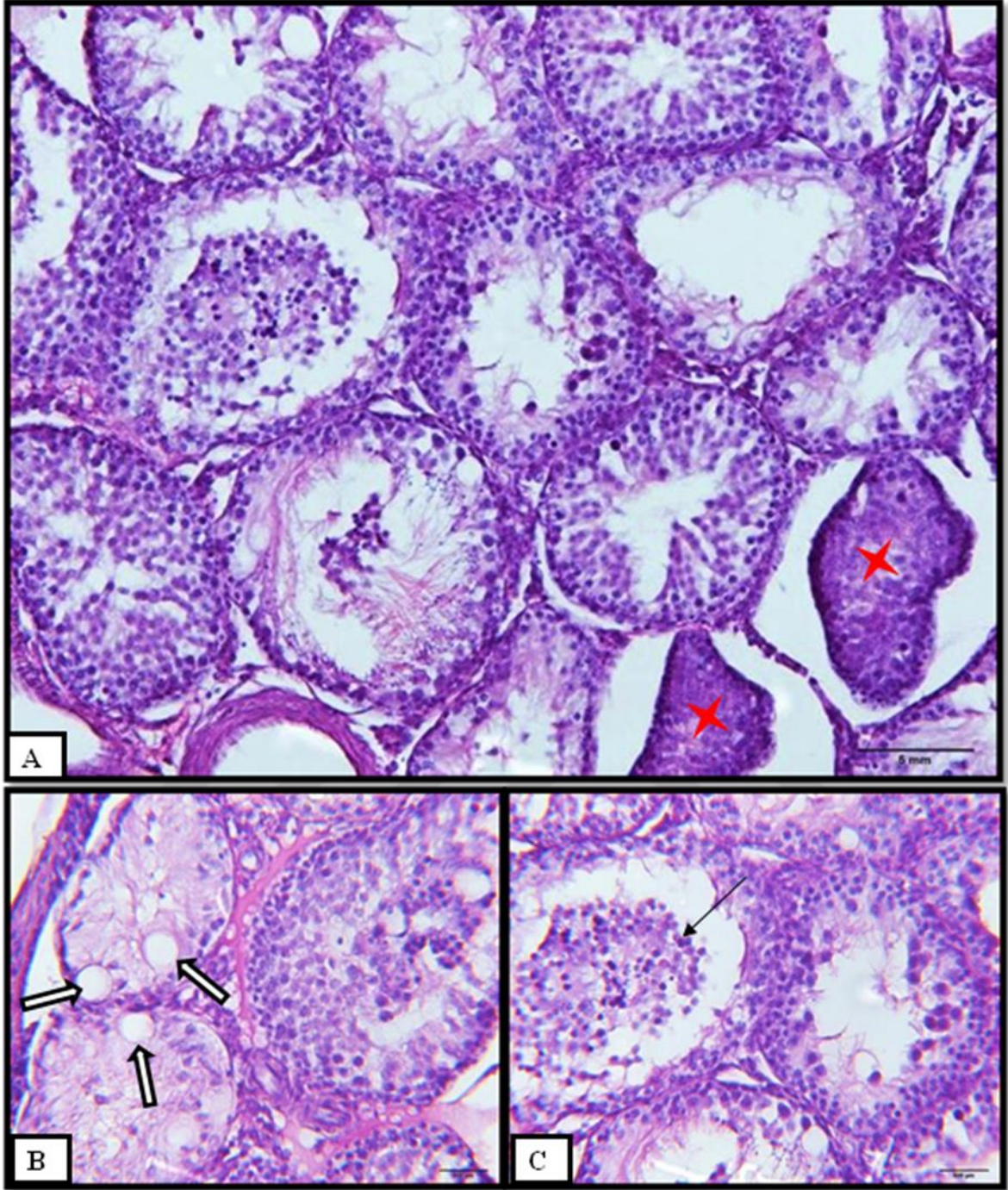


Çizim 4.14. BEP grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A: genel morfoloji (4x), B: 10X, C: 20X, D:40X. TA: tunika albuginea, KD: kan damarı, SHD: spermatogenik hücre dejenerasyonu,  $\Rightarrow$ : vakuol,  $\Rightarrow$ : lümeneye dökülen germ hücreleri,  $\Rightarrow$ : dev hücre,  $\Rightarrow$ : dejenere seminifer tübül,  $\star$ : seminifer tübülde germ hücre deskuamasyonu.

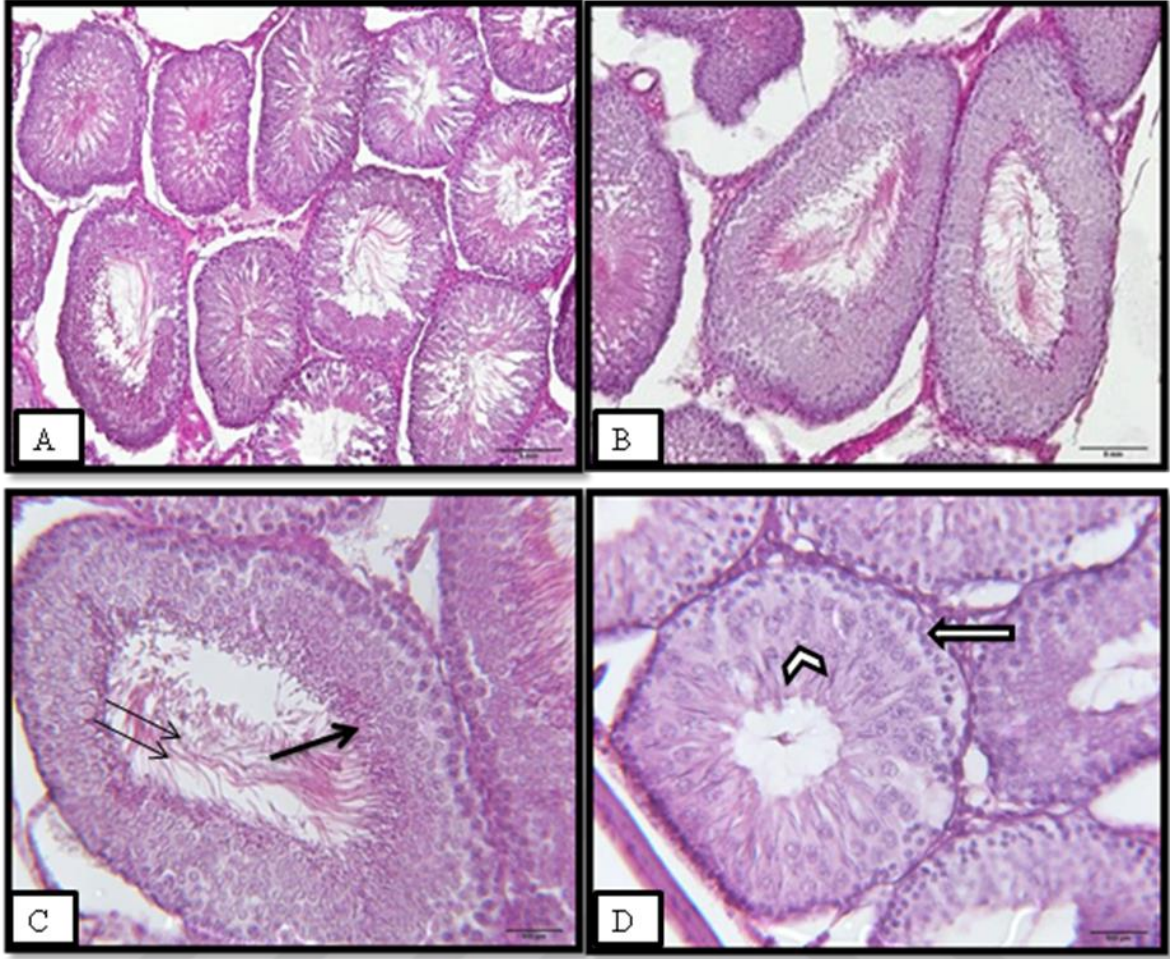


Çizim 4.15. BEP grubuna ait H&E boyaması mikrograflarında dev hücre yapıları (40X).

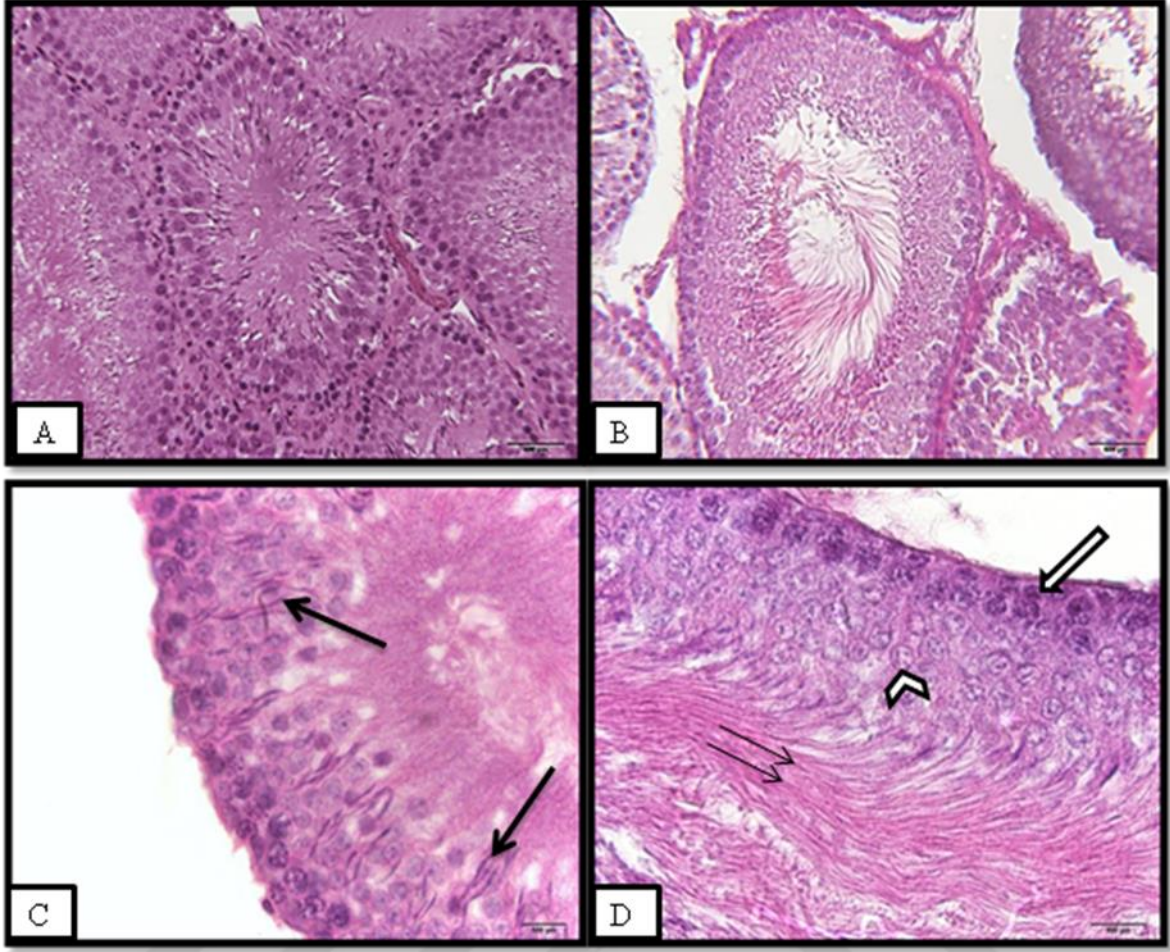
» : dev hücre.



Çizim 4.16. BEP + Recovery grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A, Genel görünüm (10X), B,  $\Rightarrow$ : Vakuol yapıları (20X), C,  $\rightarrow$ : lümeneye dökülen germ hücreleri,  $\star$ : atrofiye seminifer tübül (20X).



Çizim 4.17. BEP + Melatonin grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A, Genel görünüm (4X), B, 10X, C,  $\rightarrow$  : Kuyrukları lümene uzanmış şekilde yer alan spermatid başları (20X),  $\Rightarrow$  : spermatid kuyrukları, D,  $\Rightarrow$  : spermatogonyum,  $\gg$  : spermatosit (20X).



Çizim 4.18. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A, Genel görünüm (4X), B, 10X, C,  $\rightarrow$  : kuyrukları lümene uzanmış şekilde yer alan spermatid başları (20X), D,  $\Rightarrow$  : spermatid kuyrukları,  $\Rightarrow$  : spermatogonyum,  $\Rightarrow$  : spermatozoid (20X).

#### 4.3.2. PAS Boyaması Bulguları

Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların testis dokusu örneklerinin genel görünümünü saptamak amacıyla PAS boyaması uygulandı. Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların testis dokusu örnekleri seminifer tübül çapı ve yapısı, bazal membran yapısı, hücrelerin yoğunluğu, vakuol varlığı gibi parametreler açısından morfolojik olarak değerlendirildi.

Kontrol (salin) grubuna ait testis kesitlerine ışık mikroskopunda bakıldığında, normal histolojiye sahip oldukları görüldü. Tüm spermatogenik seri hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlemlendi. Spermatidlerin başının Sertoli hücresi sitoplazmasına gömülü bir şekilde olduğu ve kuyruklarının lümene doğru uzanmış biçimde yerleştikleri görüldü. Sertoli hücreleri de normal yapıda gözlemlendi. Bu bulgular düzgün bir spermatogenezis

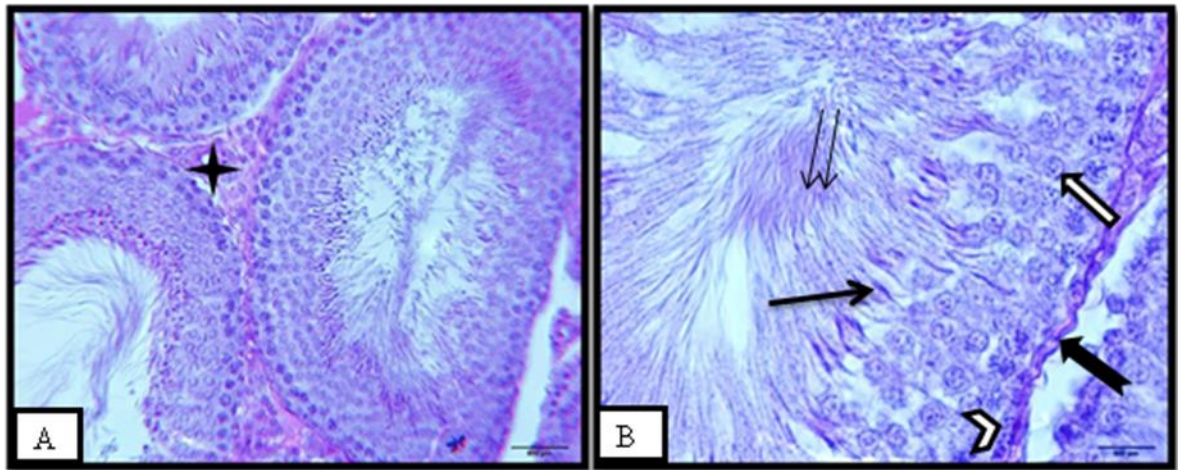
sürecinin varlığını göstermektedir. Seminifer tübül yapılarının normal olduğu saptandı. Tunika albuginea, bazal membran ve interstisyel alanda herhangi bir dejenerasyona rastlanmadı (Çizim 4.19).

Etanol+Salin uygulaması yapılan gruba ait testis dokuları histomorfolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna eş değer görünüm izlendi (Çizim 4.20).

BEP uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, periferde dejenerasyon ve spermatogenik hücre serilerinin tübül duvarından ayrıldığı ve seminifer tübül lümeninde serbest hale gelen hücresel döküntüler birlikte izlendi. Düzenli bir interstisyel alan ve seminifer tübül histolojisine rastlanmadı. Ayrıca konjesyon, vakuolizasyon ve dev hücreler gözlemlendi. Bazal membranın kalınlaştığı dikkati çekti (Çizim 4.21).

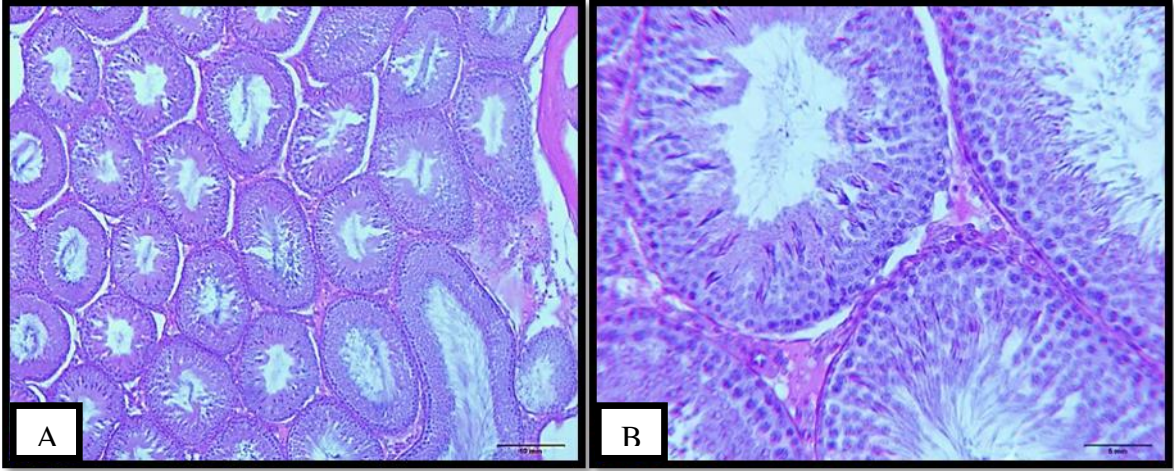
BEP+Recovery uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, testis yapısında düzelmeler görülse de BEP grubuna benzer özellikler gözlemlendi. Dejenere seminifer tübüller ve lümene dökülen germ hücreleri görüldü. Dev hücre sayısında azalma görülürken bazal membran kalınlaşmasının devam ettiği dikkati çekti (Çizim 4.22).

BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, Salin ve Etanol+Salin grubuna benzer şekilde normal testis dokusu yapısı gözlemlendi (Çizim 4.23, Çizim 4.24).

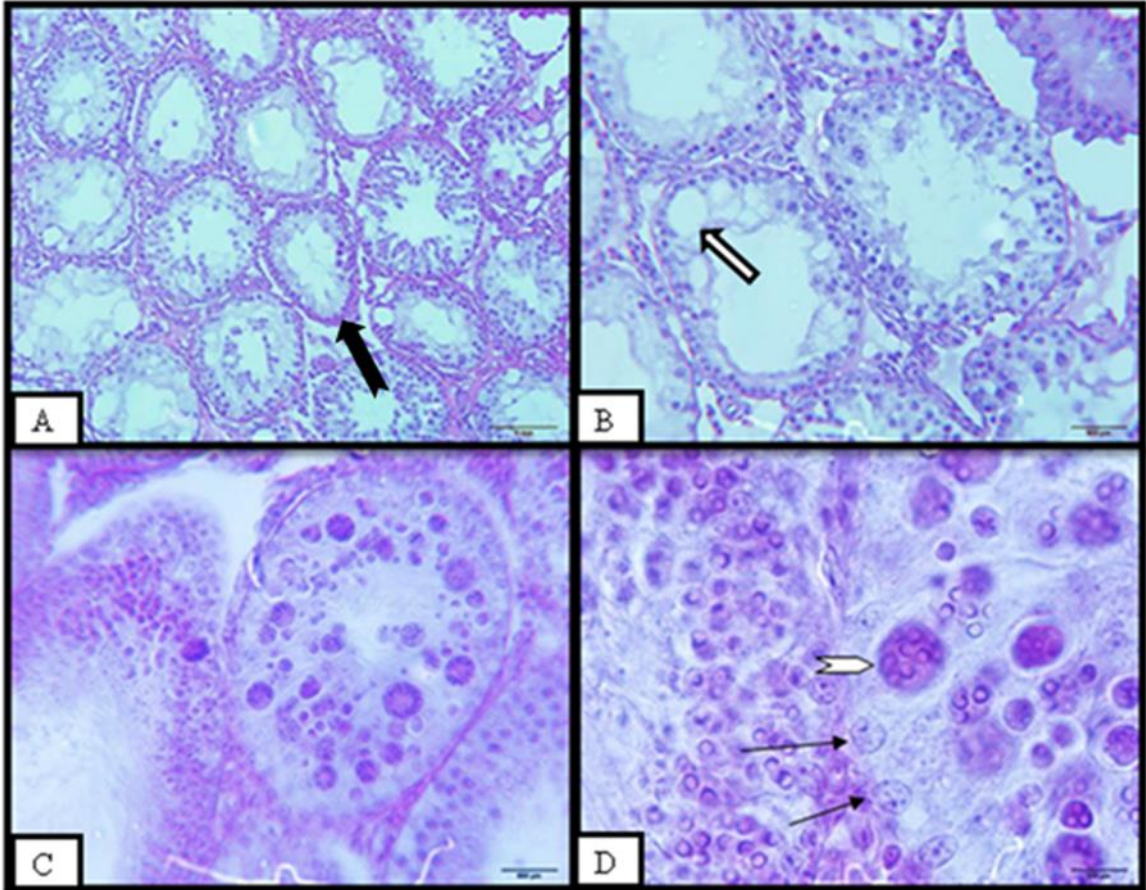


Çizim 4.19. Kontrol (Salin) grubuna ait H&E boyaması mikrografları. A, genel görünüm (20X), ✦: interstisyel alan, B, ➔: bazal membran, ➤: spermatogonyum, ➡: spermatozot, (40X), ➡: spermatid kuyrukları, ➡: spermatid başları (40X).



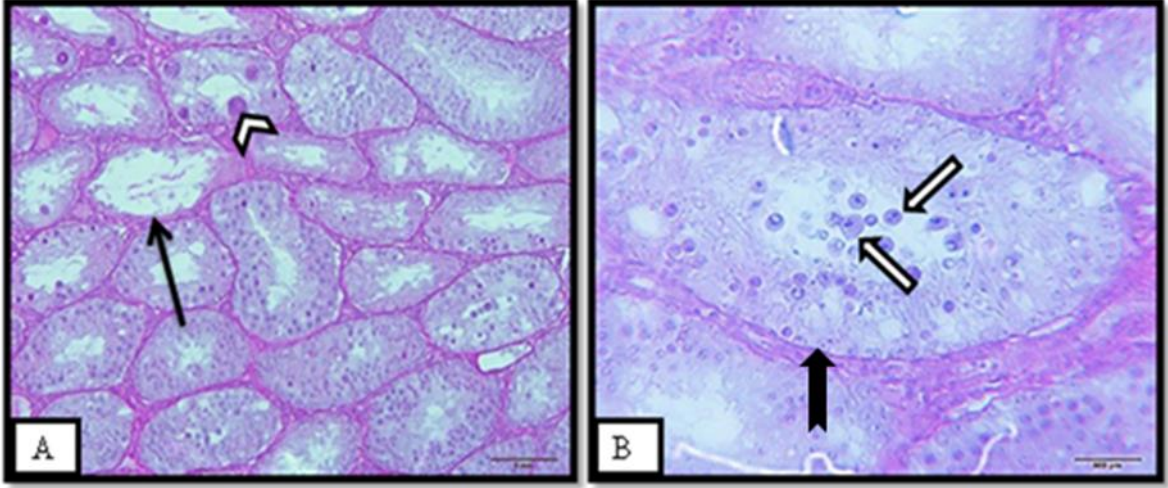


Çizim 4.20. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait PAS boyaması mikrografları. A:10X, B:20X.



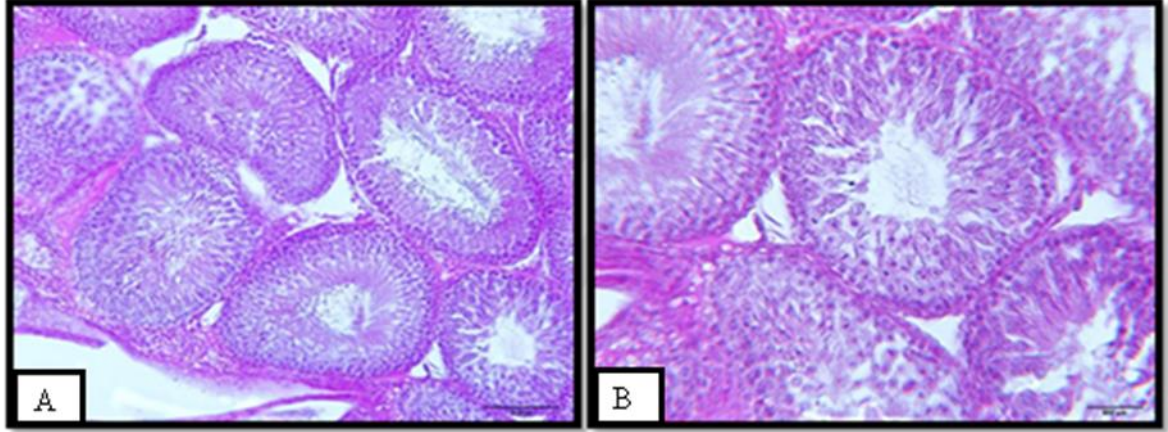
Çizim 4.21. BEP grubuna ait PAS boyaması mikrografları. A:4X, B:10X, C:20X, D:40X.

→ : Sertoli hücre nükleusları, ≧ : Dev hücre, ⇨ : Vakuol, ⇨ : Bazal membran.

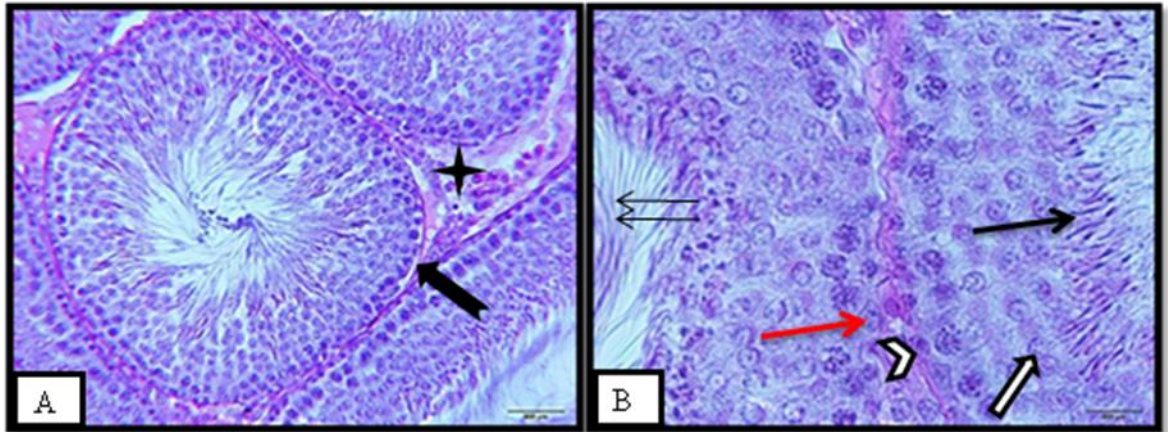


Çizim 4.22. BEP + Recovery grubuna ait PAS boyaması mikrografları. A:10X, B:20X.

→ : dejenere seminifer tübül, ⤵ : dev hücre, ⇨ : lümene dökülen germ hücreleri, → : bazal membran.



Çizim 4.23. BEP + Melatonin grubuna ait PAS boyaması mikrografları. A:10X, B:20X



Çizim 4.24. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait PAS boyaması mikrografları. A:20X, B:40X. → : bazal membran, ✦ : interstisyel alan, → : spermatis başları, ⇨ : spermatis kuyrukları, ⇨ : spermatisit, ⤵ : spermatisogonyum, → : Sertoli hücre nukleusu.

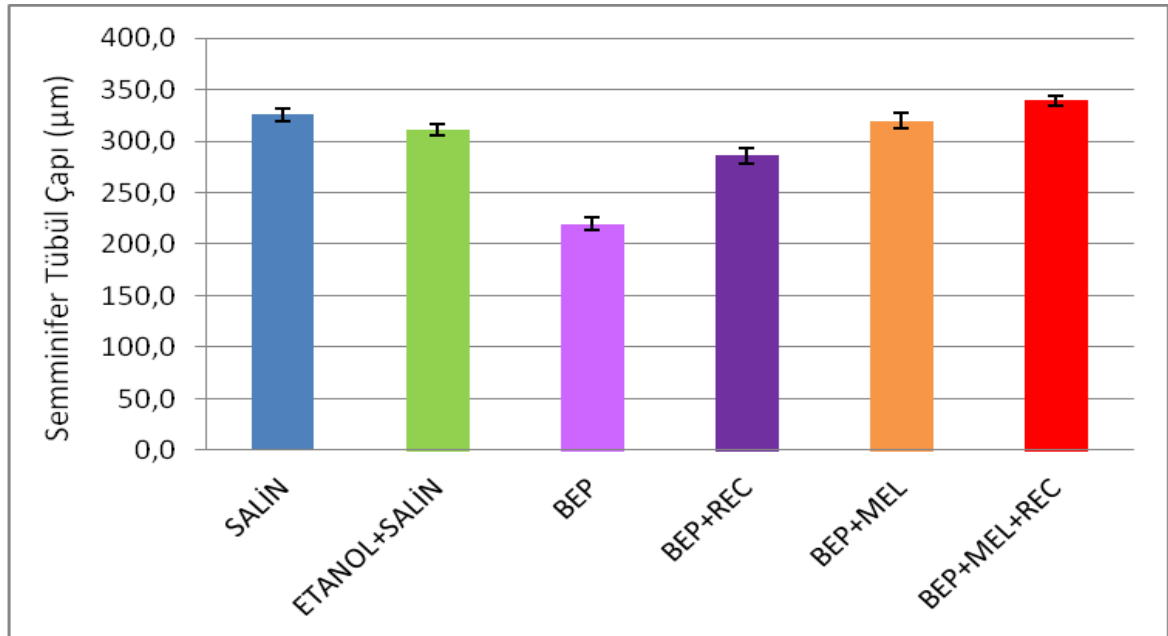
### 4.3.3. Morfometrik İnceleme

#### 4.3.3.1. Seminifer Tübül Çapı Ölçümü

Grupların seminifer tübül çapları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre seminifer tübül çaplarında anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p=0,000$ ) (Çizelge 4.9, Çizim 4.25).

Çizelge 4.9. Testis seminifer tübül çapı ölçümleri ( $\mu\text{m}$ )

Gruplar	Testis Seminifer Tübül Çapı ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	325,9167 $\pm$ 6,33114	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	310,8333 $\pm$ 5,71813	
BEP	219,6000 $\pm$ 6,04060	
BEP + Recovery	286,1000 $\pm$ 7,70930	
BEP + Melatonin	319,7500 $\pm$ 7,28791	
BEP + Melatonin + Recovery	339,4167 $\pm$ 4,83281	



Çizim 4.25. Testis seminifer tübül çapı ölçümleri ( $\mu\text{m}$ ). Gruplara göre sıçanların sperm motilitesi (%).Gruplardaki değerler ortalama ( $\bar{X}$ ) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

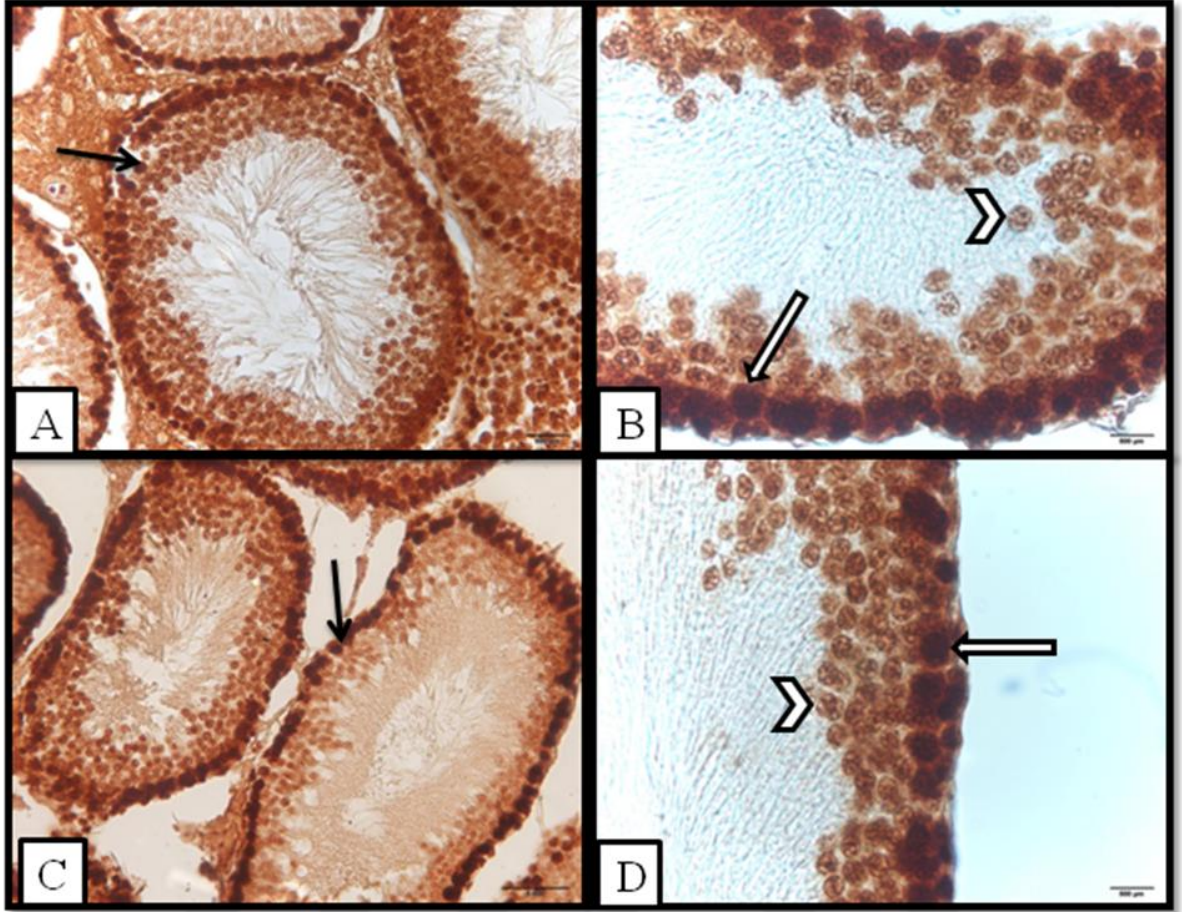
#### 4.3.4. İmmünohistokimyasal Uygulama Bulguları

##### 4.3.4.1. Anti-PCNA antikoru ile yapılan immünohistokimyasal uygulama bulguları

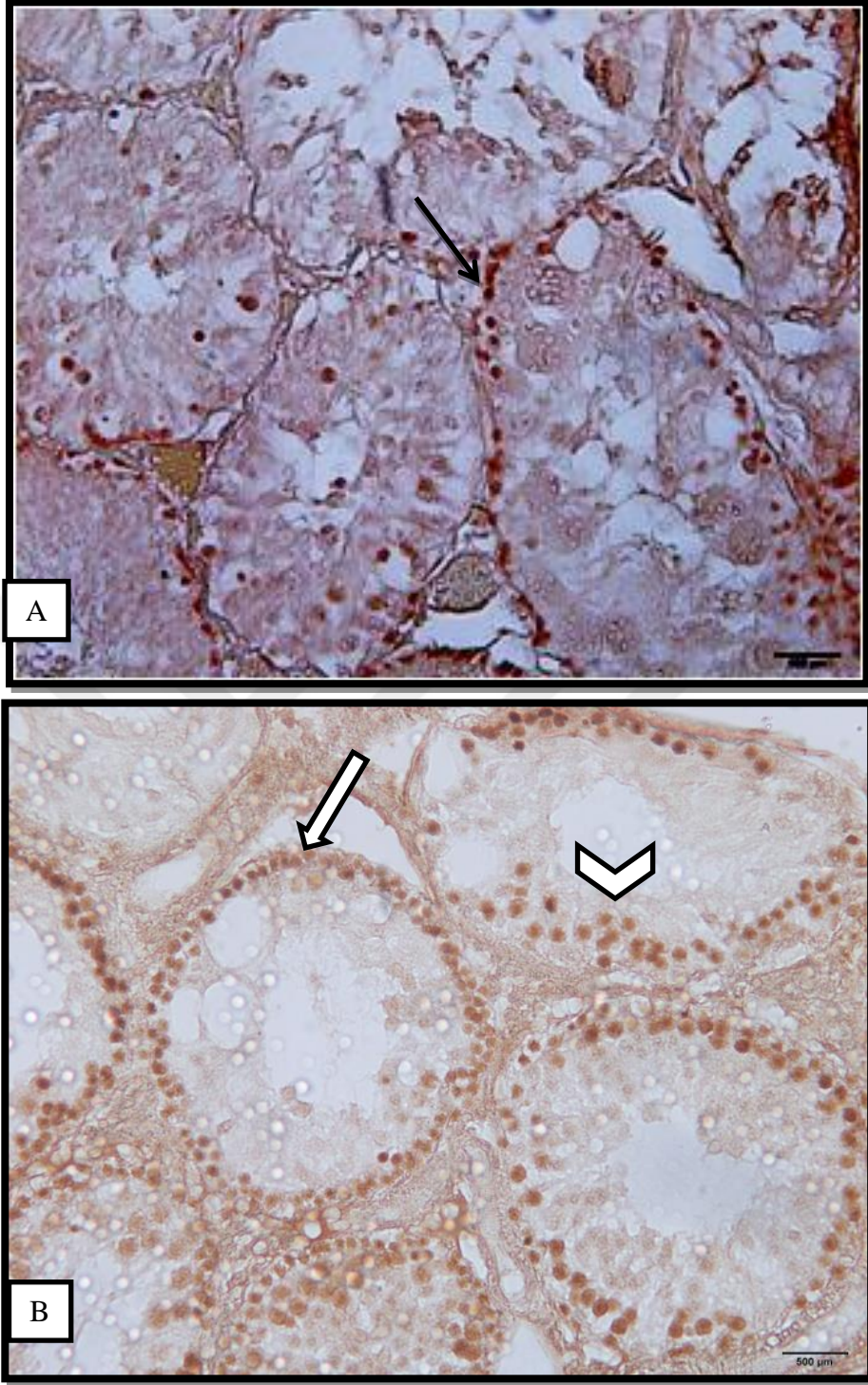
Salin kontrol grubu, Etanol+salin kontrol grubu (Çizim 4.26), BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait tüm hayvanların testislerindeki Anti-PCNA immünreaktivitesinin fazla olduğu görüldü (Çizim 4.28). Anti-PCNA tutulumunun daha çok spermatogonyumlar ve spermatozoid nükleuslarında olduğu dikkati çekti. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda yer alan seminifer tübüllerdeki hücrelerin nükleuslarındaki immünohistokimyasal Anti-PCNA tutulumu daha az hücrede ve boyanma şiddeti de daha az olarak izlendi (Çizim 4.27).

Tüm gruplara ait hayvanların testislerindeki immünohistokimyasal olarak hücre nükleusunda gözlenen Anti-PCNA boyanmasının yoğunluğu ve yaygınlığı semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

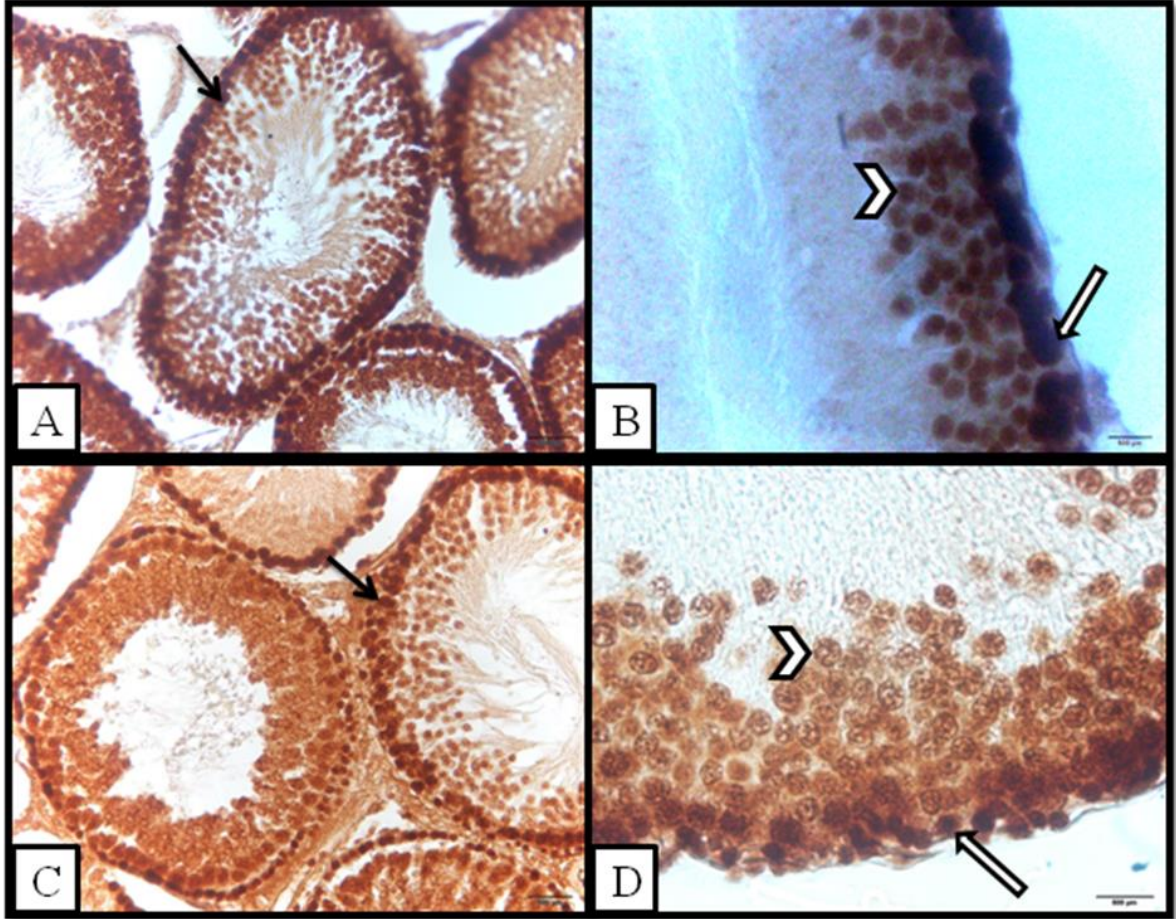
H-skor değerlerine göre; grupların anti-PCNA immünreaktiviteyi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek anti-PCNA immünreaktivitesi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük anti-PCNA immünreaktivitesi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,676$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,998$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu karşılaştırıldığında ise, BEP+Melatonin+Recovery grubunda salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,05$ ). BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre anti-PCNA immünreaktivitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre anti-PCNA immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.10, Çizim 4.29).



**Çizim 4.26.** A. Kontrol (Salin) grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X,  $\blackrightarrow$  : immünpozitif hücreler, B. Kontrol (Salin) grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 40X,  $\blackRightarrow$ : immünpozitif spermatogonyumlar,  $\blacktriangleright$  : immünpozitif spermatositler, C. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, D. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 40X.



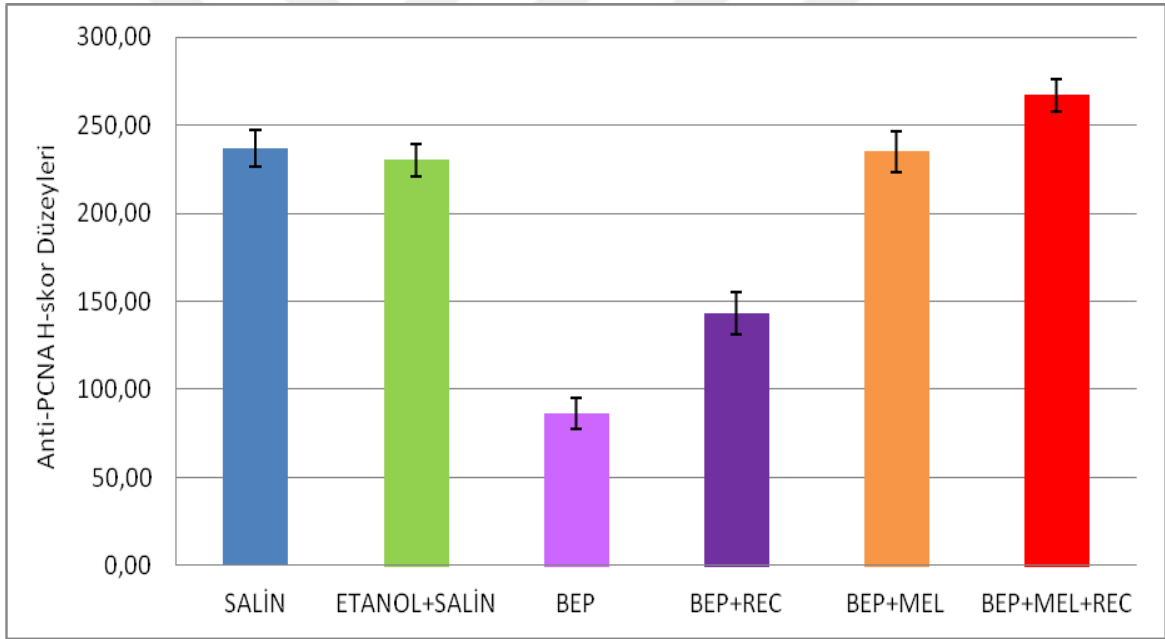
**Çizim 4.27.** A. BEP grubuna ait Anti-PCNA işaretlemeğini gösteren ışık mikrografları, 20X,  $\blackrightarrow$  : immünpozitif hücreler, B. BEP+Recovery grubuna ait Anti-PCNA işaretlemeğini gösteren ışık mikrografları, 20X,  $\Rightarrow$  : immünpozitif spermatogonyumlar,  $\triangleright$  : immünpozitif spermatositler.



**Çizim 4.28.** A. BEP+Melatonin grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X,  $\longrightarrow$  : immünpozitif hücreler, B. BEP+Melatonin grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 40X,  $\Rightarrow$  : immünpozitif spermatogonyumlar,  $\triangleright$  : immünpozitif spermatositler, C. BEP+Melatonin+Recovery grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, D. BEP+Melatonin+Recovery grubuna ait Anti-PCNA işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 40X.

**Çizelge 4.10.** Tüm grupların Anti-PCNA H-Skor Düzeyleri.

Gruplar	Anti-PCNA H-Skor Düzeyleri $\pm$ Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	236,6667 $\pm$ 10,37772	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	230,4167 $\pm$ 9,21913	
BEP	86,2000 $\pm$ 8,94179	
BEP + Recovery	143,3000 $\pm$ 12,08351	
BEP + Melatonin	234,9167 $\pm$ 11,59513	
BEP + Melatonin + Recovery	267,0000 $\pm$ 9,41952	



**Çizim 4.29.** Tüm grupların Anti-PCNA H-Skor Düzeyleri. Gruplardaki değerler ortalama (X) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

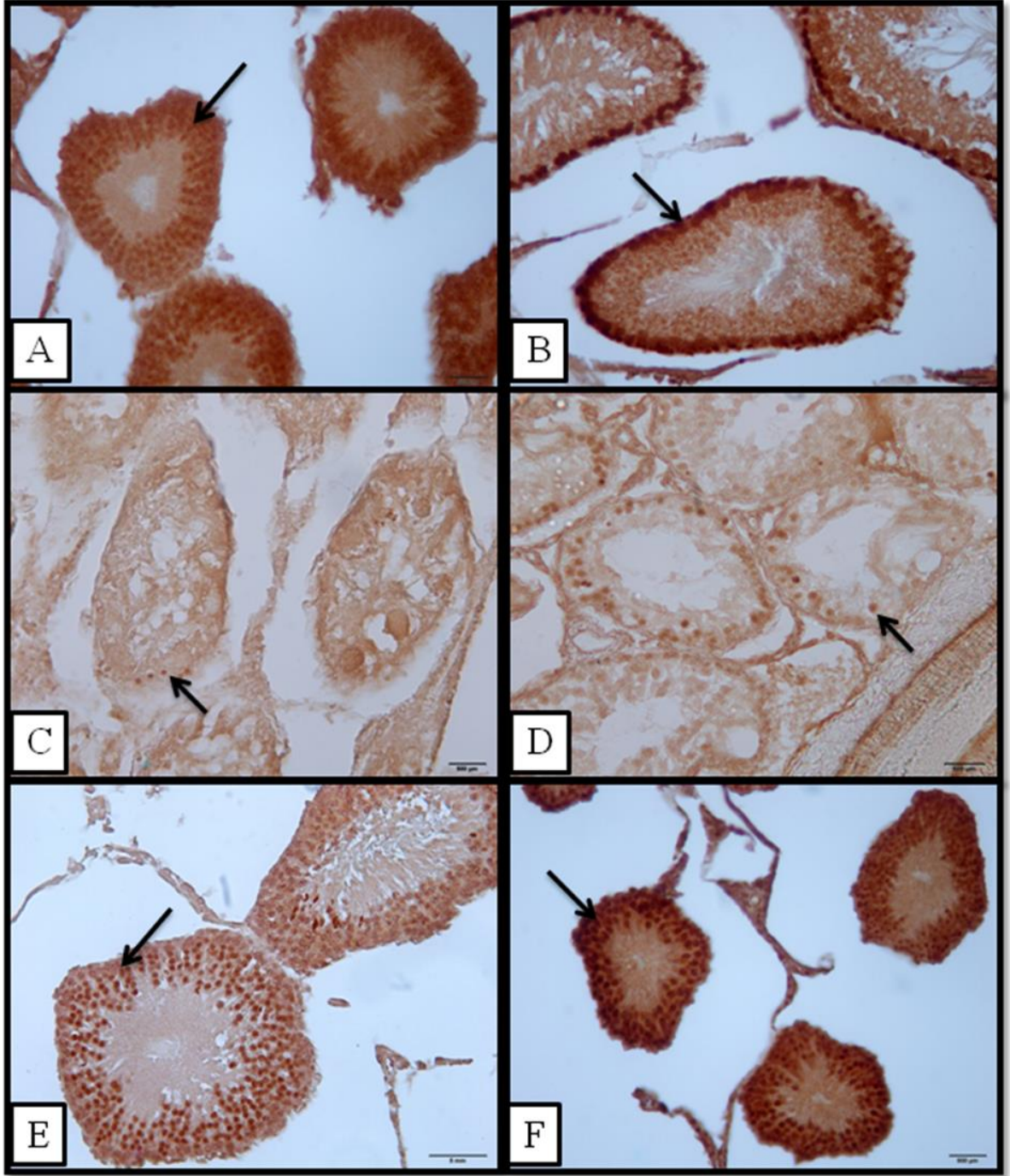


#### 4.3.4.2. Anti-Dmc1/ Lim15 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal uygulama bulguları

Salin kontrol grubu (Çizim 4.30A), Etanol+salin kontrol grubu (Çizim 4.30B), BEP+Melatonin grubu (Çizim 4.30E) ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına (Çizim 4.30F) ait tüm hayvanların testislerindeki Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinin fazla olduğu görüldü. Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinin daha çok spermatogonyumlar ve spermatosit nukleuslarında olduğu dikkati çekti. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda yer alan seminifer tübüllerdeki hücrelerin nukleuslarındaki immünohistokimyasal Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi daha az hücrede ve boyanma şiddeti de daha az olarak izlendi (Çizim 4.30C ve D).

Tüm gruplara ait hayvanların testislerindeki immünohistokimyasal olarak hücre nukleusunda gözlenen Anti-Dmc1/ Lim15 boyanmasının yoğunluğu ve yaygınlığı semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

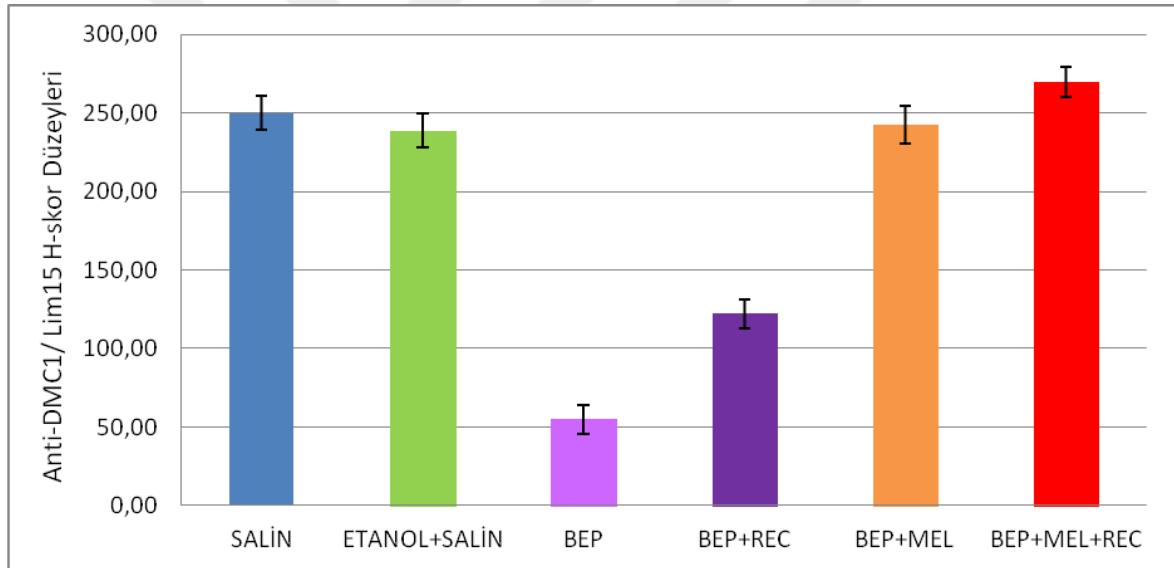
H-skor değerlerine göre; grupların Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktiviteyi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,104$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,468$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu karşılaştırıldığında ise, BEP+Melatonin+Recovery grubunda salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,05$ ). BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.11, Çizim 4.31).



**Çizim 4.30.** A. Kontrol (Salin) grubuna ait, B. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait, C. BEP grubuna ait, D. BEP + Recovery grubuna ait, E. BEP + Melatonin grubuna ait, F. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait Anti-Dmc1/ Lim15 işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, **→**: immünpozitif hücreler.

**Çizelge 4.11.** Tüm grupların Anti-DMC1/ Lim15 H-Skor Düzeyleri.

Gruplar	Anti-DMC1/ Lim15 H-Skor Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	249,8333±10,77736	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	238,6667±10,73934	
BEP	54,9000±9,39799	
BEP + Recovery	122,2000±9,23520	
BEP + Melatonin	242,1667±12,01388	
BEP + Melatonin + Recovery	269,6667±9,48044	



**Çizim 4.31.** Tüm grupların Anti-DMC1/ Lim15 H-Skor Düzeyleri. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

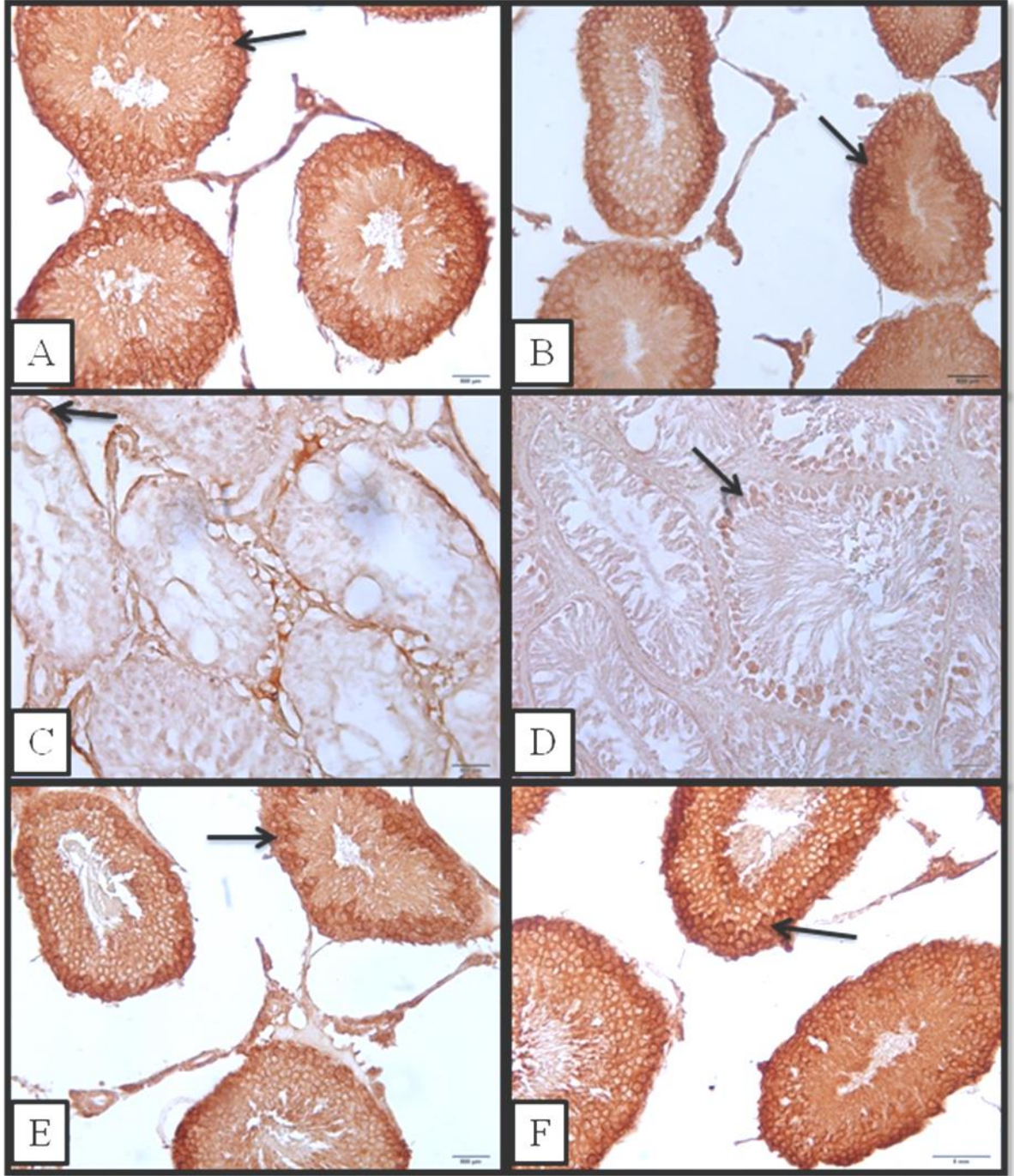
#### 4.3.4.3. Anti-CD71/ Transferrin Reseptör antikoru ile yapılan immünohistokimyasal uygulama bulguları

Salin kontrol grubu (Çizim 4.32A), Etanol+salin kontrol grubu (Çizim 4.32B), BEP+Melatonin grubu (Çizim 4.32E) ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına (Çizim 4.32F) ait tüm hayvanların testislerindeki Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesinin fazla olduğu görüldü. Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesinin daha çok spermatogonyumlar, spermatisitler ve spermatidlerin

sitoplazmalarında olduğu dikkati çekti. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda yer alan seminifer tübüllerdeki hücrelerin sitoplazmalarındaki Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi diğer gruplara göre çok daha az hücrede ve boyanma şiddeti de çok daha zayıf olarak izlendi (Çizim 4.32C ve D).

Tüm gruplara ait hayvanların testislerindeki immünohistokimyasal olarak hücre sitoplazmalarında gözlenen Anti-CD71/ Transferrin Reseptör boyanmasının yoğunluğu ve yaygınlığı semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

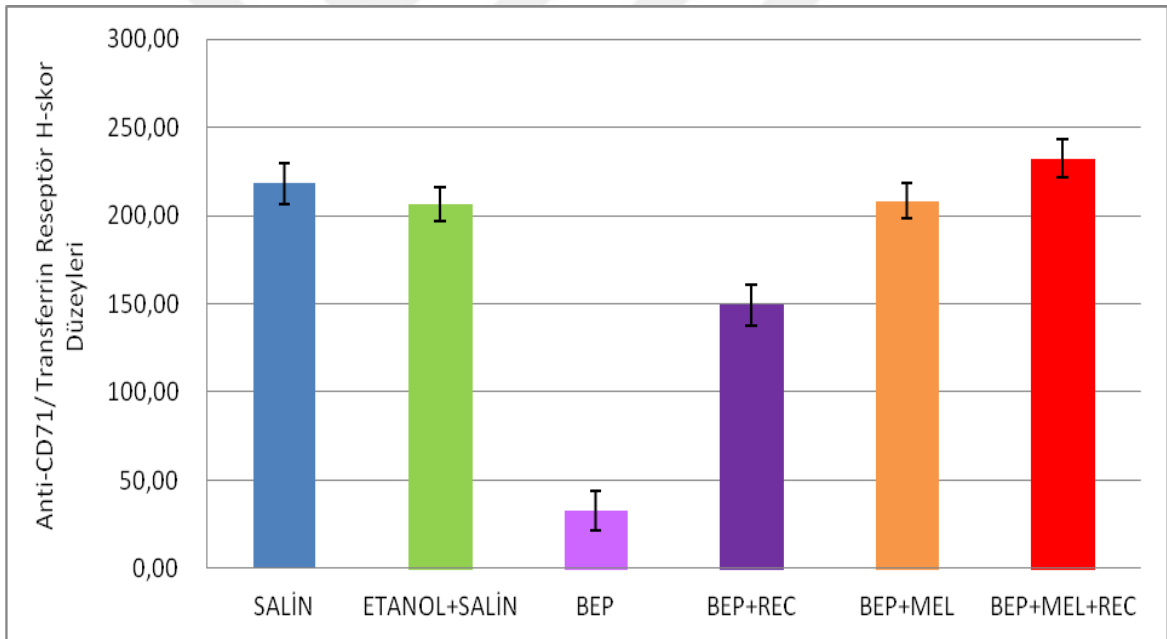
H-skor değerlerine göre; grupların Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktiviteleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,147$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,230$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu karşılaştırıldığında ise, BEP+Melatonin+Recovery grubunda salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,05$ ). BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.12, Çizim 4.33).



**Çizim 4.32.** A. Kontrol (Salin) grubuna ait, B. Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait, C. BEP grubuna ait, D. BEP + Recovery grubuna ait, E. BEP + Melatonin grubuna ait, F. BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait Anti-CD71/ Transferrin Reseptör işaretlemesini gösteren ışık mikrografları, 20X, **→**: immünpozitif hücreler.

**Çizelge 4.12.** Tüm grupların Anti-CD71/ Transferrin Reseptör H-Skor Düzeyleri.

Gruplar	Anti-CD71/ Transferrin Reseptör H-Skor Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	218,2500±11,50593	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	206,7000±9,51081	
BEP	32,7000±11,49928	
BEP + Recovery	149,2000±11,63138	
BEP + Melatonin	208,2500±10,22586	
BEP + Melatonin + Recovery	232,3333±10,75625	



**Çizim 4.33.** Tüm grupların Anti-CD71/ Transferrin Reseptör H-Skor Düzeyleri. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.3.5. TUNEL İşaretleme ile Apoptotik Hücre Tayini

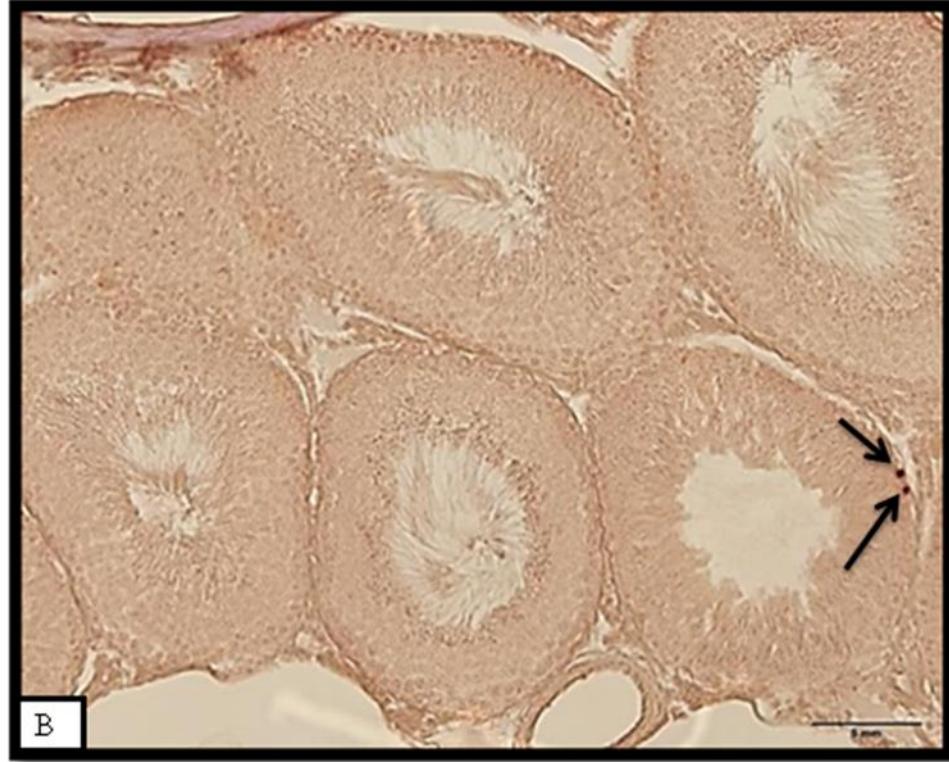
Tunel boyama yöntemiyle, apoptozis sonucu gelişen DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlamak amaçlandı. Bunun için, mikroskopta 40'lık objektif ile herbir gruptaki sıçanın testisinde yer alan rastgele 10 adet seminifer tübül değerlendirildi ve seminifer (germinal) epitelde pozitif olarak işaretlenen apoptotik hücreler sayıldı.

Apoptotik indeks değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirildi.

Apoptotik İndeks (Aİ) Değeri=Apoptotik hücre sayısı/ Toplam hücre sayısı x 100 (Tunçdemir ve Öztürk 2008).

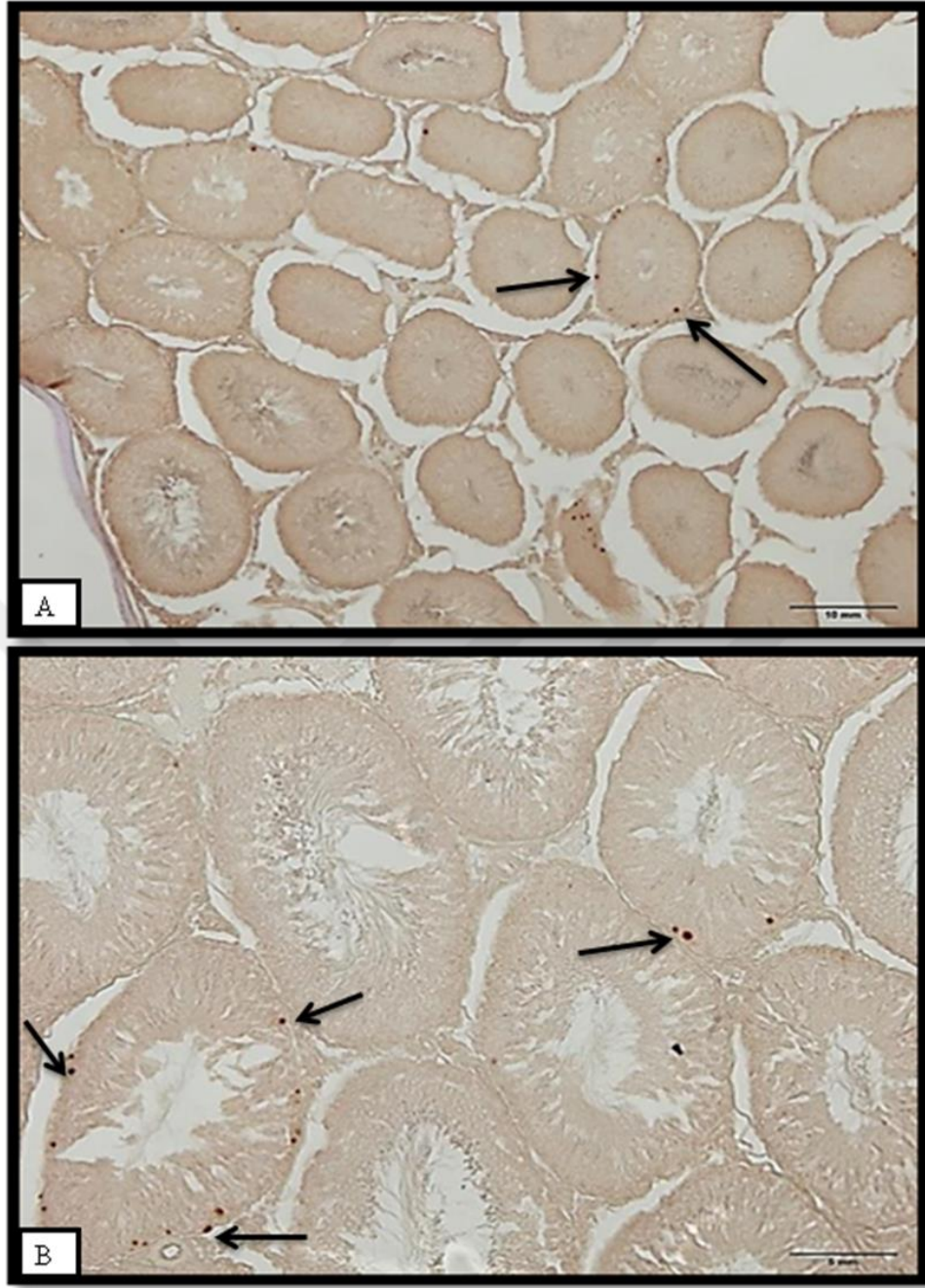
Salin kontrol grubu (Çizim 4.34), Etanol+salin kontrol grubu (Çizim 4.35), BEP+Melatonin grubu (Çizim 4.38) ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına (Çizim 4.39) ait tüm hayvanların testislerindeki TUNEL pozitif hücreler çok az sayıda ve yoğunluğu da az şekilde görülürken, BEP ve BEP+Recovery grubunda TUNEL pozitif hücreler çok fazla sayıda ve yoğunluğu da artmış şekilde görülmektedir (Çizim 4.36, Çizim 4.37).

Grupların Aİ'si karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,000). En yüksek Aİ, BEP grubunda görülürken; en düşük Aİ ise BEP+Melatonin+Recovery grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu (p=0,040), BEP+Melatonin grubu (p=1,000) ve BEP+Melatonin+Recovery (p=1,000) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p<0,01). BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Aİ'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur (p<0,01). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir (p<0,01). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0,01). BEP+Recovery grubundaki Aİ değeri, BEP grubuna göre daha düşük olarak bulunmuştur ancak diğer gruplara göre Aİ değeri hala yüksektir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında Aİ değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p=1,000) (Çizelge 4.13, Çizim 4.40).

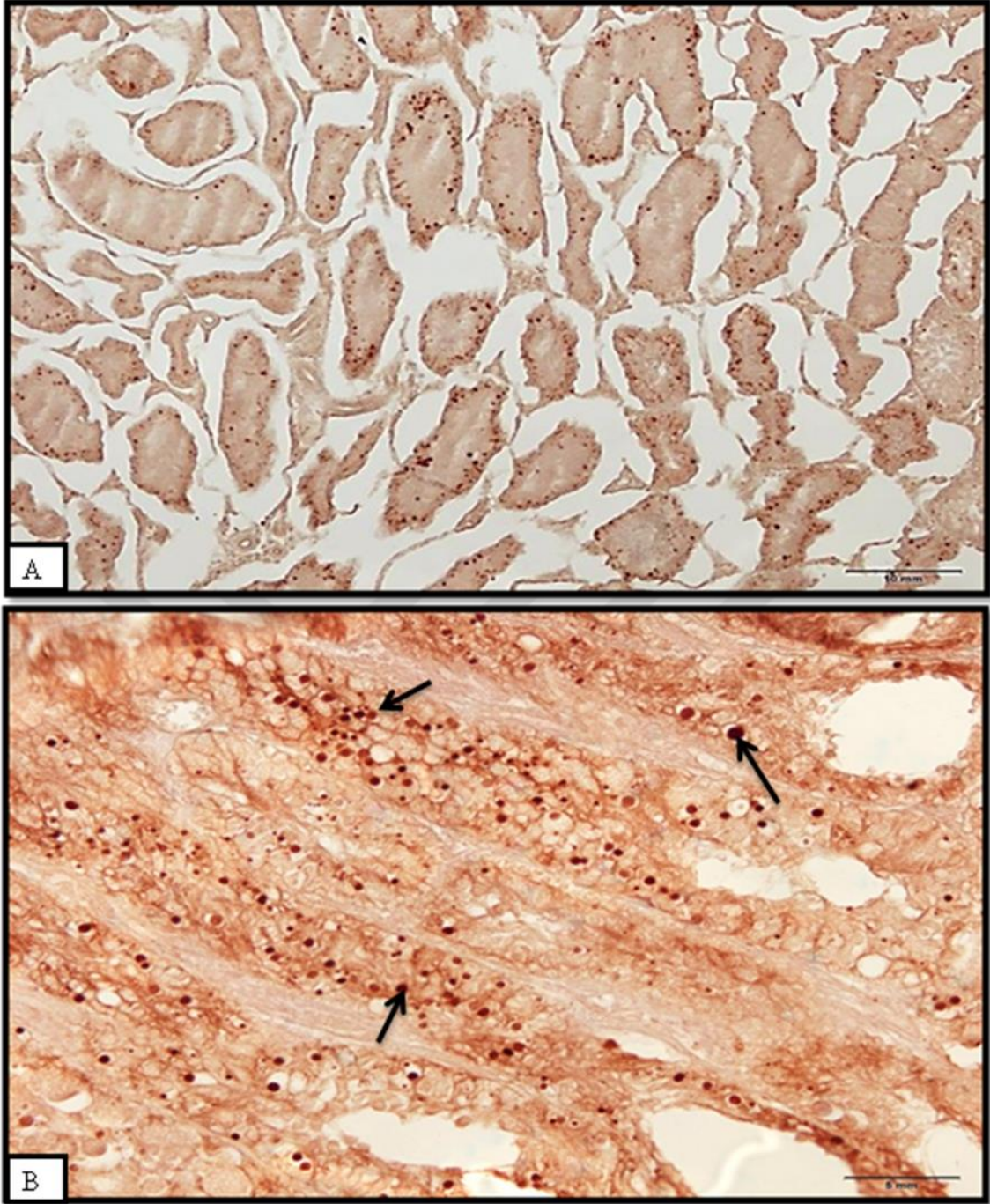


**Çizim 4.34.** Kontrol (Salin) grubuna ait TUNEL işaretlemeini gösteren ışık mikrografları.  
A:10X, B:20X, —→ : İmmünpozitif hücre

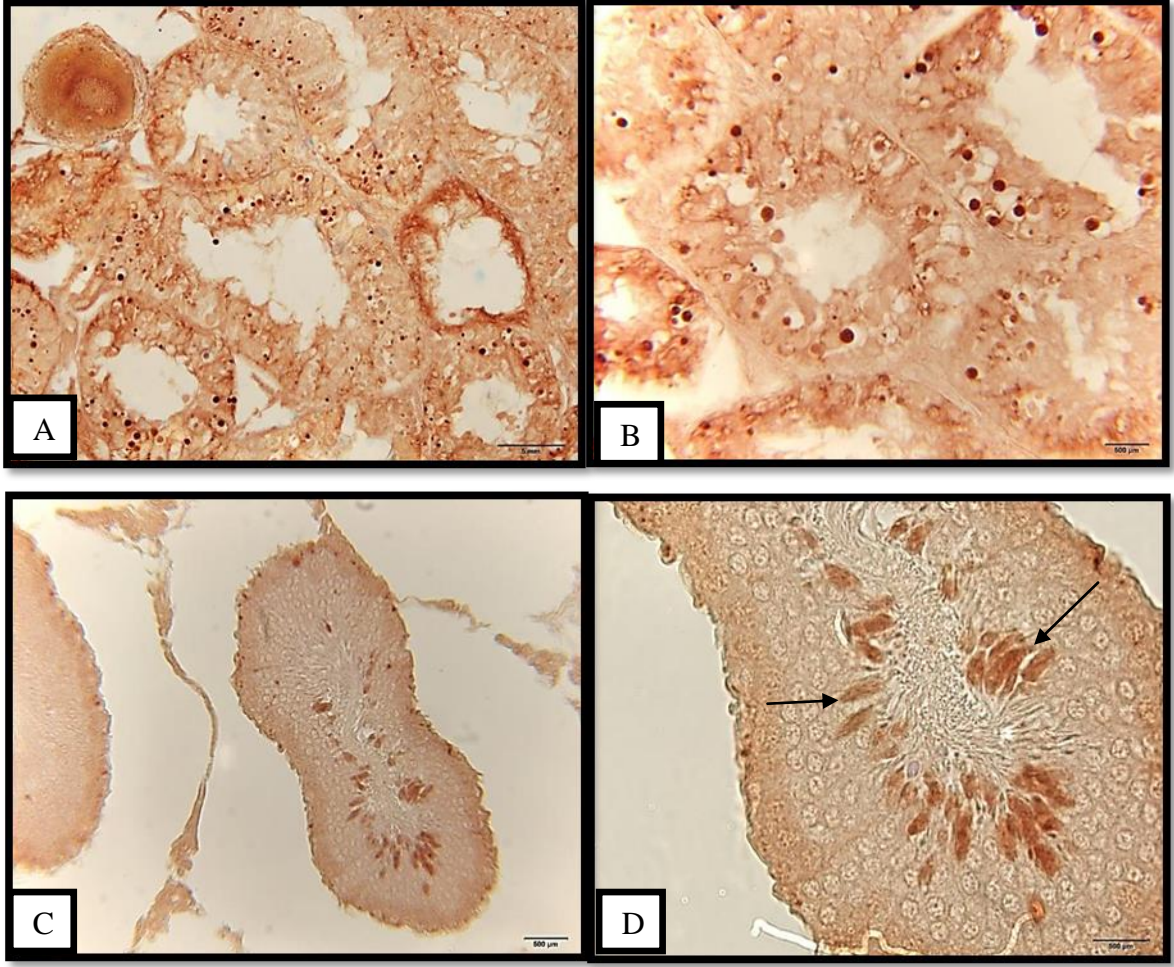




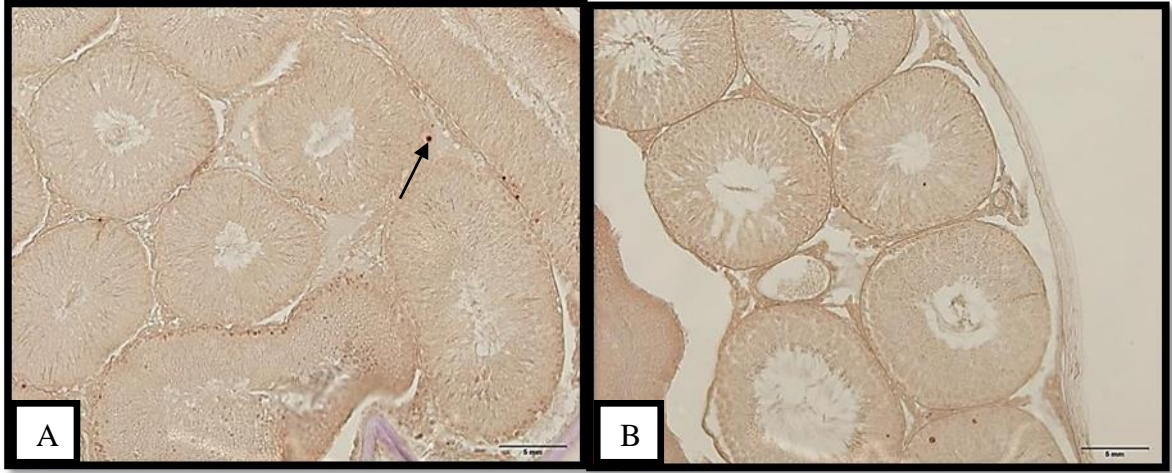
**Çizim 4.35.** Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A:4X, B:10X, —→: İmmünpozitif hücre



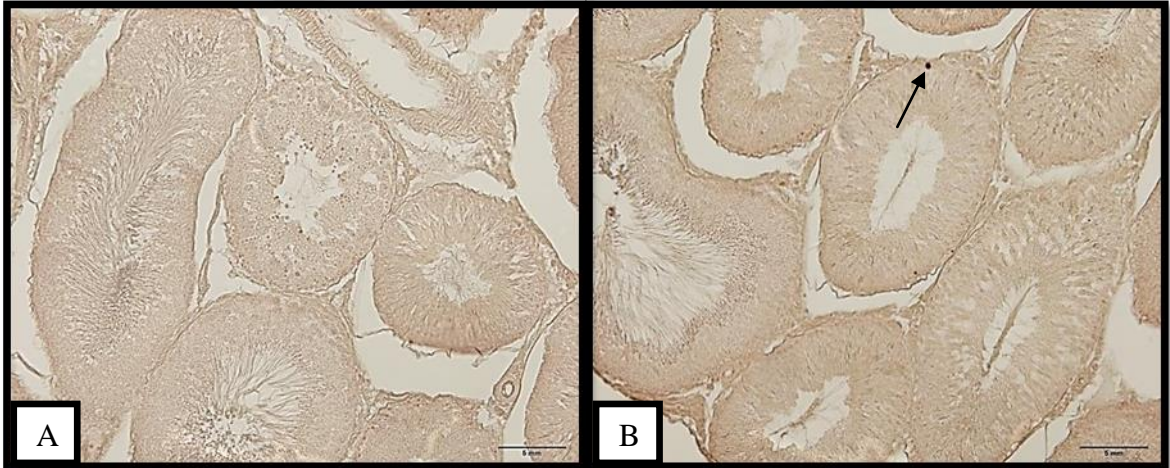
**Çizim 4.36.** BEP grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A:4X, B:20X, —→ : İmmünpozitif hücre



**Çizim 4.37.** BEP + Recovery grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A:4X, B:20X, C: 10X, D: 40X;  $\longrightarrow$  : İmmünpozitif boyanan spermatid hücreleri



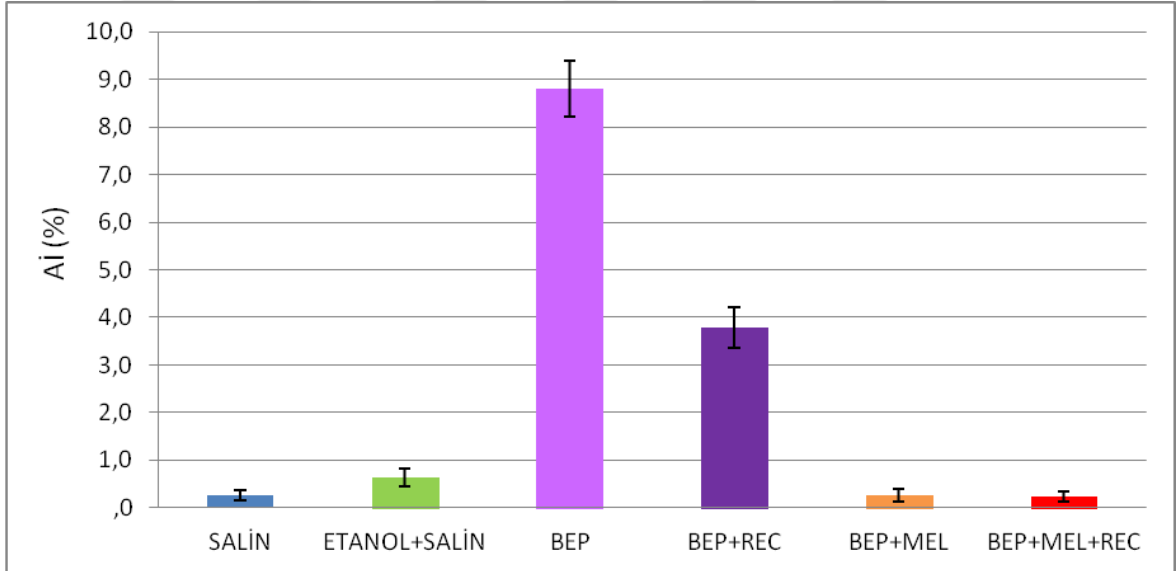
**Çizim 4.38.** BEP + Melatonin grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A ve B:10X, —→ : İmmünpozitif hücre



**Çizim 4.39.** BEP + Melatonin + Recovery grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A ve B: 10X, —→ : İmmünpozitif hücre.

**Çizelge 4.13.** Sıçan gruplarına ait testislerin TUNEL işaretlemesi ile elde edilen ortalama apoptotik indeks (AI) değerleri (%)

Gruplar	AI değeri (%) ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	0,2583±0,11645	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,6333±0,19228	
BEP	8,8000±0,59628	
BEP + Recovery	3,7900±0,42544	
BEP + Melatonin	0,2667±0,13707	
BEP + Melatonin + Recovery	0,2333±0,10731	



**Çizim 4.40.** Sıçan gruplarına ait testislerin TUNEL işaretlemesi ile elde edilen ortalama apoptotik indeks değerleri (%).Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.4. TEM ile Ultrastrüktürel İnceleme Bulguları

Salin grubuna ait testis kesitlerinin elektron mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübüller ve tübüller arasında bulunan Leydig hücreleri incelendi. Farklı gelişim evrelerindeki germ hücreleri, bazal lamina, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin normal bir yapı sergiledikleri görüldü. Spermatogenez sürecinin sürekliliğini koruduğu seminifer tübüllerde, spermatogonia hücrelerinin bazal lamina üzerinde düzenli olarak dizilmiş halde oldukları görüldü. Hücrelerde küre ya da oval şekilli nukleus, birkaç mitokondriyon ve az

miktarda endoplazmik retikulum gözlemlendi. Seminifer tübül bazal laminası üzerinde yerleşim gösteren Sertoli hücrelerinde ökromatinden zengin büyük bir nükleus, belirgin bir nükleolus, sitoplazmasında mitokondriyon, lizozom, lipit damlacıkları ve vakuollerin varlığı belirlendi. Yuvarlak spermatidlerde akrozomal veziküllerinin şekillendiği ve nüklear membranının kalınlaştığı, spermatid nükleusunun anterior kutubuna yayılmış halde akrozomal veziküllerin olduğu görüldü. Spermatogenezin ileri aşamalarında spermlerin akrozom tarafından sarılmış uzun, elektron yoğun nükleus içeren normal bir başa sahip oldukları gözlemlendi. Sperm hücre sınırlarının düzgün olduğu tespit edildi. Olgun spermlerin kuyruk kısımlarının enine geçmiş kesitlerinde, sperm kuyruklarında normal bir aksonem yapısı görüldü. Seminifer tübüllerin lümenleri açık ve bol miktarda sperm içermekte idi. İnterstisyel alandaki damarların ve damarlara yakın yerleşim gösteren Leydig hücrelerinin normal görünümde oldukları gözlemlendi. Leydig hücrelerinin eksantrik yerleşimli nükleus ve sitoplazmalarında mitokondriyon, elektron yoğun granüller, lipit damlacıkları ve düz endoplazmik retikulum içerdikleri gözlemlendi (Çizim 4.41).

Etanol ve salin uygulanan sıçanların testislerinin ultrastrüktürel incelemelerinde salin grubu ile benzer bulgular görüldü. Buna rağmen salin grubu ile kıyaslandığında, bazal laminada yer yer kalınlaşma olduğu ve spermatogenik hücrelerin vakuol miktarında artış olduğu saptandı (Çizim 4.42).

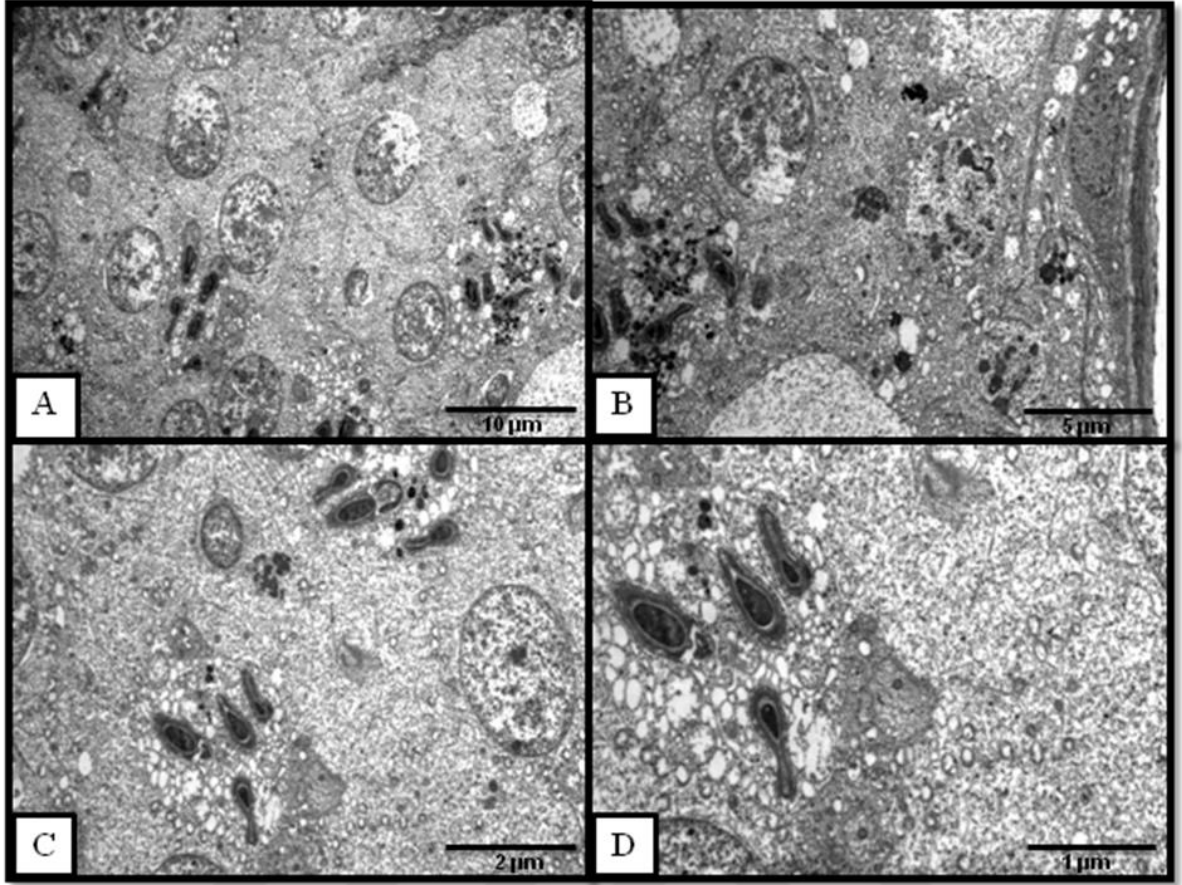
BEP uygulanan grubun testis dokuları incelendiğinde, çok miktarda seminifer tübülün germinal epitelindeki spermatogenik hücre sıralamasında bozukluk olduğu tespit edildi. Bazal laminanın homojen yapısını kaybettiği, yer yer parçalanma gösterdiği ve belirgin kollajen birikimi sonucu kalınlaştığı ayırt edildi. Sertoli ve spermatogonia hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı alanlar gözlemlendi. Ayrıca Sertoli ve spermatogonia hücreleri arasında boşlukların olduğu görüldü. Sertoli hücrelerinde üçgen şekilli nükleus, belirgin elektron yoğun nükleolus, dejeneratif mitokondriyon, genişlemiş endoplazmik retikulum, çok miktarda sitoplazmik otofajik vakuoller ve lipit damlacıkları görüldü. Primer spermatozoid ile yuvarlak spermatidlerin düzensiz sınırlara sahip olduğu ve hücreler arası boşlukların varlığı tespit edildi. Yuvarlak spermatidlerde yuvarlaklaşmış nükleus, şişmiş ve dejeneratif mitokondriyon, genişlemiş endoplazmik retikulum, çok miktarda lipit damlacıkları ve artan vakuolizasyon gözlemlendi. Spermatid ve spermatogenezin ileri aşamalarındaki hücrelerin düzensiz hücre sınırlarına sahip oldukları görüldü. Olgun spermlerin kuyruk kısımlarının enine geçmiş kesitlerindeki aksonem yapılarında dejenerasyon olduğu ve 9+2 yapısında bozulma olduğu görüldü. İnterstisyel alandaki damarlarda parçalanma ve endotel yapısında dejenerasyon saptandı. Leydig hücrelerinde

salin grubuna göre artan miktarda vakuolizasyon gözlemlendi (Çizim 4.43).

BEP+Recovery grubuna ait (BEP uygulandıktan sonra 9 haftalık iyileşme süresi verilen) sıçanların testislerinin ultrastrüktürel incelemelerinde, bazal laminanın salin grubuna hatta BEP grubuna göre oldukça kalın olduğu ve kollajen birikmesinin arttığı saptandı. Seminifer tübül yapılarında gözlenen hasarların BEP grubundakine benzer olduğu dikkati çekti. Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların bazal laminadan ayrıldığı alanlar görüldü. Spermatogenik hücrelerde BEP grubuna kıyasla artan miktarda vakuolizasyon olduğu saptandı. Spermilerin aksonem yapılarında oldukça fazla miktarda dejenerasyon olduğu, çoğunun 9+2 düzenlenme göstermediği ve akrozom yapılarının olmadığı gözlemlendi. Lümeninde olgun spermilerin görülmemesi dikkati çekti (Çizim 4.44).

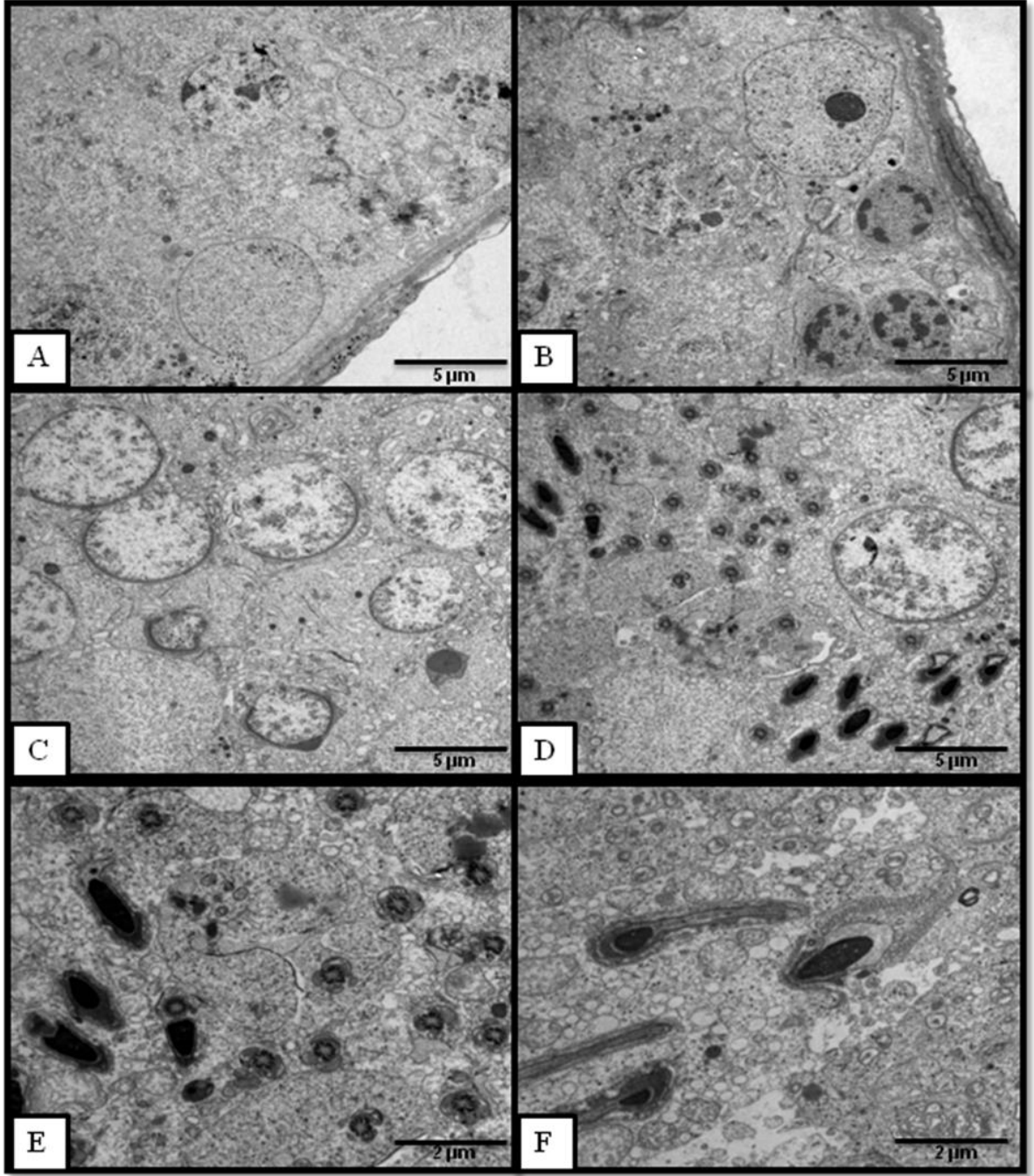
BEP+Melatonin deney grubuna ait testis dokularının incelemesinde, bazal lamina ve seminifer tübül yapılarında BEP grubunda gözlenen hasarların neredeyse tamamen düzeldiği ve normale yakın görünümlü hale geldiği görüldü. Bazal laminanın salin grubundakine benzer kalınlığa sahip olduğu ve hücreler ile arasında açılmaların çok az olduğu görüldü. Spermatogenik hücrelerin, Sertoli hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin salin grubundakilere benzer görünüme sahip olduğu ve BEP grubuna kıyasla daha az vakuol içerdiği saptandı. Spermatogenezisin normal olarak olaylandığı ve sperm üretiminin devam ettiği görüldü. Yuvarlak spermatidlerde akrozomal veziküllerin varlığı ve spermatid nükleusunun anterior kutbuna yayılmış halde düzenlenişleri dikkati çekti. Spermin kuyruk kısmının enine kesitlerinde aksonem yapısının ve düzenlenişinin salin grubundakilere benzer olduğu gözlemlendi. BEP grubundakiler ile kıyaslandığında, bu grupta görülen Leydig hücrelerinin daha fazla lipid damlacıkları içerdiği gözlemlendi (Çizim 4.45).

BEP+Melatonin+Recovery grubuna ait testis dokularındaki seminifer tübül elemanlarının, bazal laminanın, interstisyel alandaki damar ve Leydig hücrelerinin ultrastrüktürel özelliklerinin BEP+Melatonin grubu ile benzerlik göstermesi dikkati çekti ve salin grubuna göre önemli bir farklılık göstermedi (Çizim 4.46).

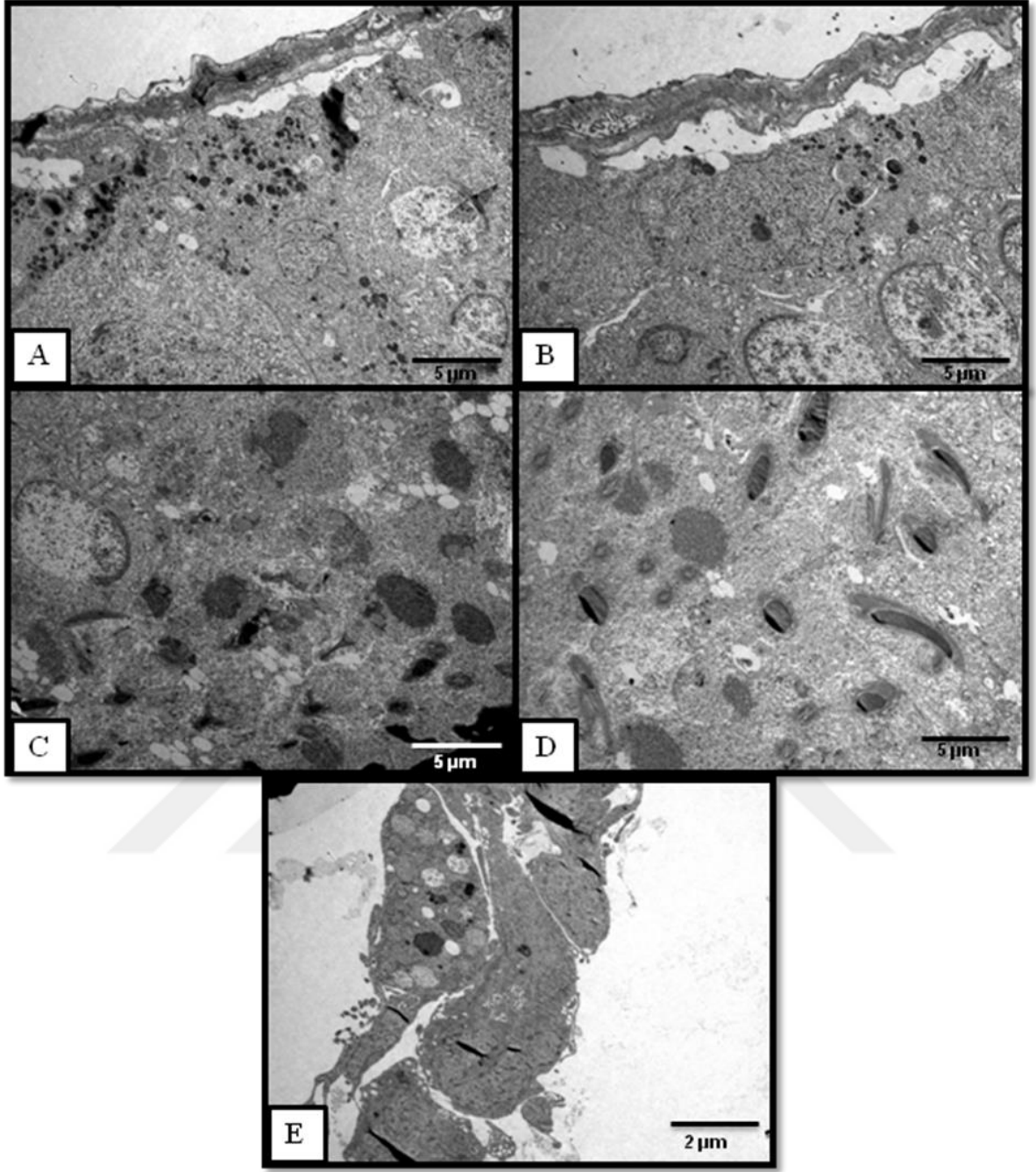


**Çizim 4.41.** Salin grubuna ait TEM mikrografları. A, (3000X). B, (5000X). C, (6000X). D, (10000X).

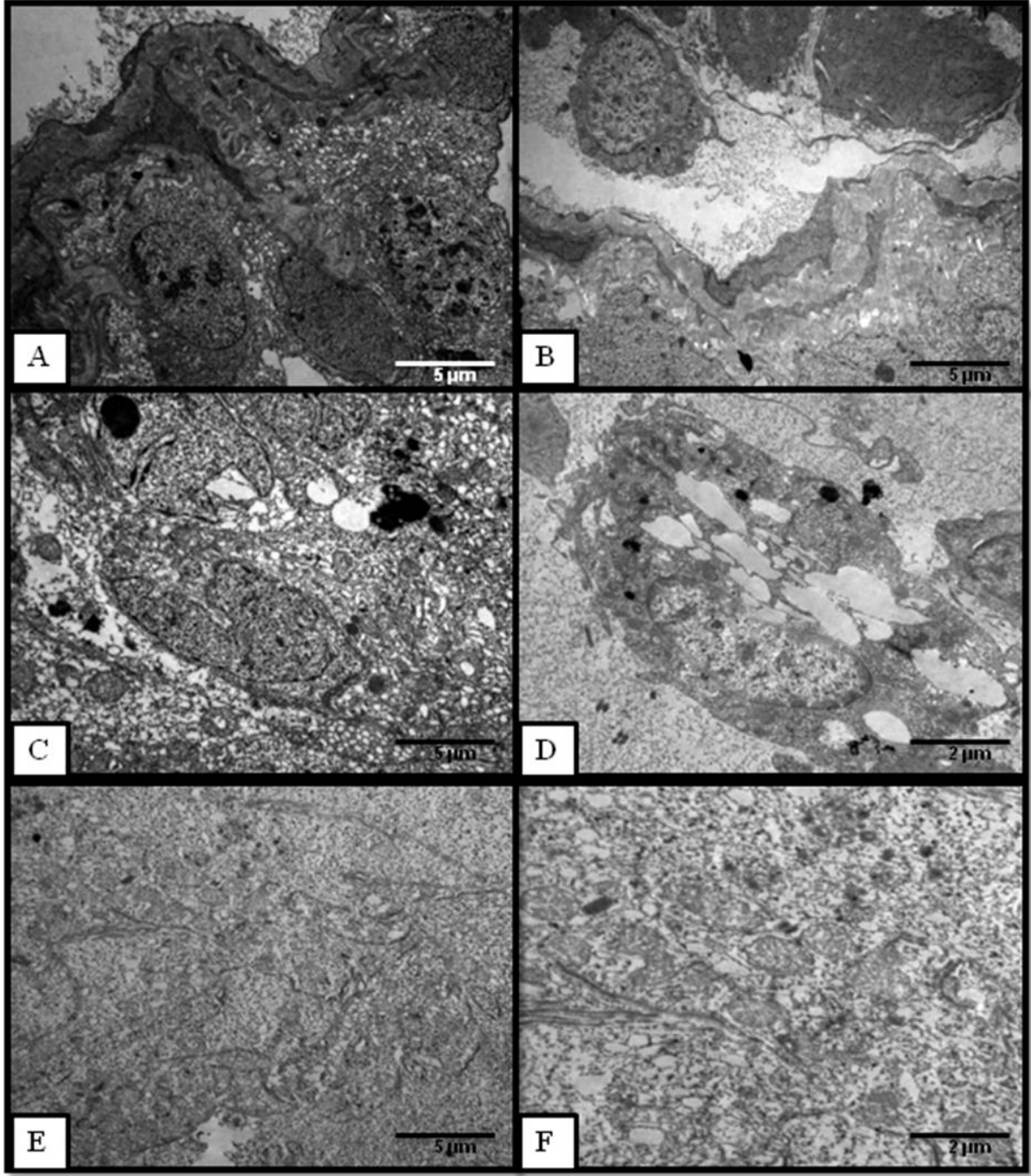




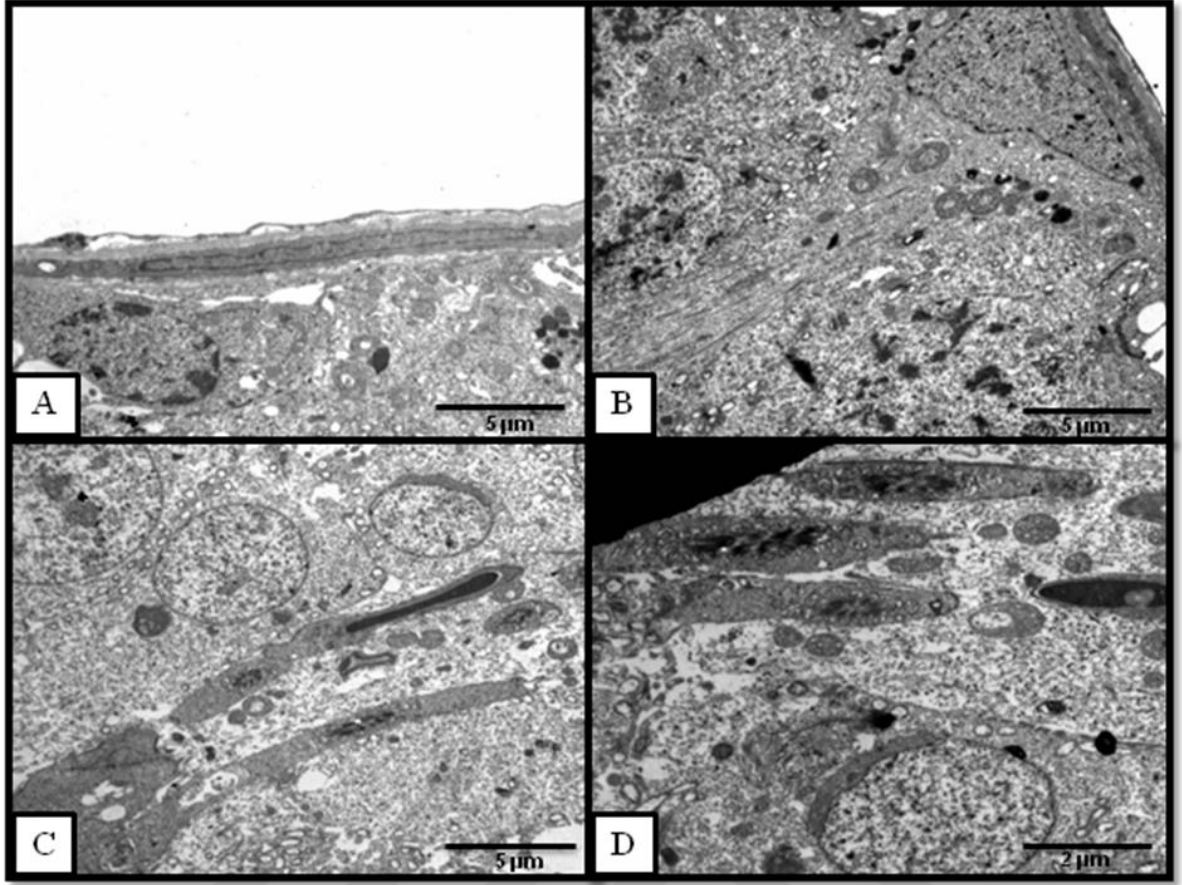
**Çizim 4.42.** Etanol+Salin grubuna ait TEM mikrografları. A, (4000X). B, (4000X). C, (4000X). D, (4000X). E, (5000X). F, (10000X).



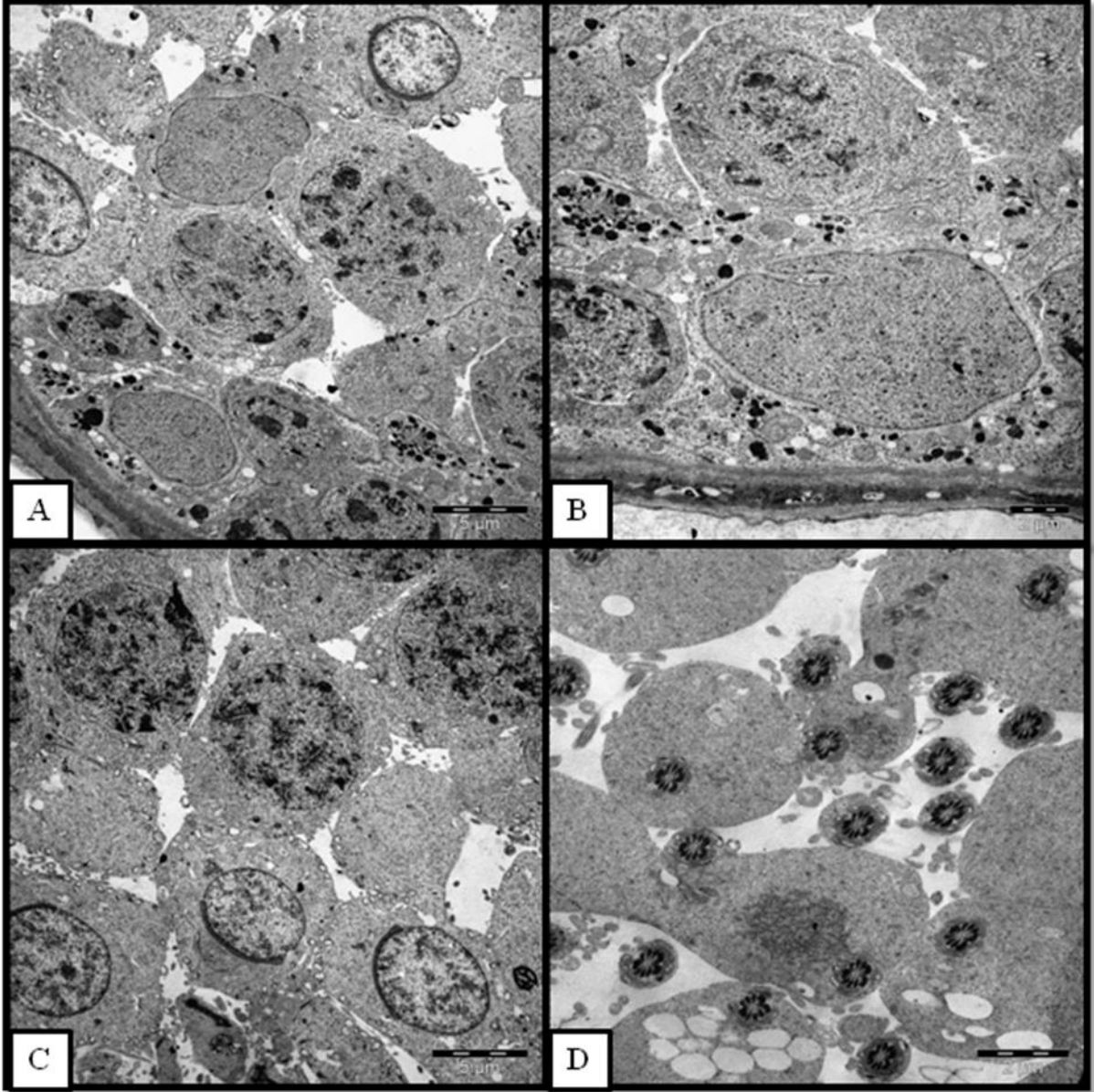
**Çizim 4.43.** BEP grubuna ait TEM mikrografları. A, (5000X). B, (5000X). C, (5000X). D, (5000X). E, (6000X).



**Çizim 4.44.** BEP+Recovery grubuna ait TEM mikrografları. A, (5000X). B, (5000X). C, (5000X). D, (10000X). E, (7500X). F, (10000X).



**Çizim 4.45.** BEP+Melatonin grubuna ait TEM mikrografları. A, (7500X). B, (7500X). C, (5000X). D, (10000X).



**Çizim 4.46.** BEP+Melatonin+Recovery grubuna ait TEM mikrografları. A, (5000X). B, (7500X). C, (5000X). D, (12000X).

## 4.5. Western Blot Bulguları

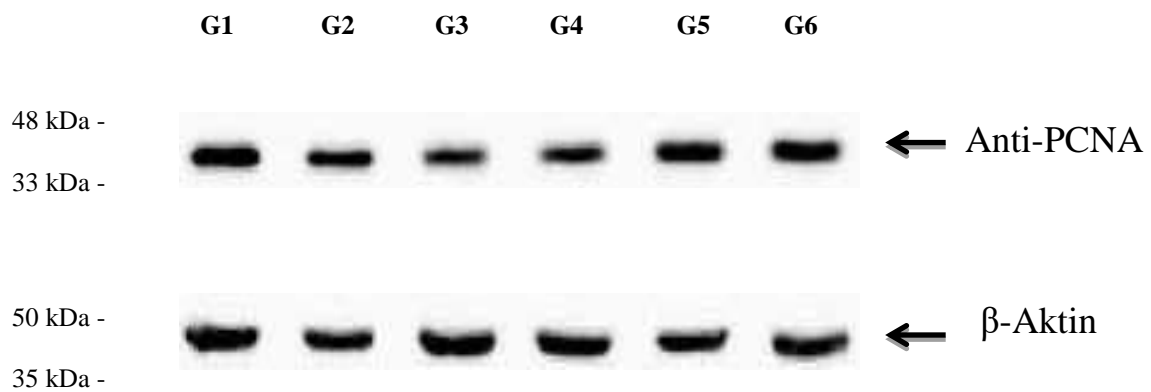
### 4.5.1. Anti-PCNA Western Blot Bulguları

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen= Çoğalan hücre çekirdek antijeni), genomik DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirinde önemli rolü olan 36 kDa ağırlığında temel bir proteindir (Kelman ve Hurwitz 1998, Tsurimoto 1999). PCNA, hücre döngüsünün G1 fazında sentezlenmeye başlar, S fazında en yüksek seviyesine ulaşır ve DNA polimeraz  $\sigma$ 'ya yardımcı (ko-faktör) olarak işlev görür. G2 evresinde ekspresyonu azalmaya başlar, M fazında ve interfazda ise en düşük düzeye ulaşır (Bravo ve diğ. 1987, Kurki ve diğ. 1986).

PCNA'nın düşük ya da yüksek konsantrasyonlu potasyum klorür ile ekstraksiyonuna göre, nukleoplazmada L ve H, sitoplazmada ise L ve P formlarının bulunduğu düşünülmektedir. Yeni sentezlenen P ve L formundaki PCNA'nın bir kısmı sitoplazmada kalırken, L formundaki PCNA'nın bir kısmı da nukleoplazmaya transfer olur ve DNA'ya bağlanarak H formuna çevrilir. Nukleusta yer alan PCNA'nın hücre çoğalmasındaki rolü kısmen anlaşılmış olmasına rağmen sitoplazmadaki PCNA işlevi yeterince anlaşılamamıştır (Tanno ve Taguchi 1999).

PCNA, spermatogenik hücre proliferasyonu için uygun bir işaretleyicidir. Oksidatif hücre hasarlarında kromatin-PCNA komplekslerinin oluşumunda aksaklıklar olduğuna dair bazı bulgular vardır (Balajee ve diğ. 1999).

Salin, Etanol+Salin, BEP, BEP+Recovery, BEP+Melatonin, BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait Anti-PCNA bantları Çizim 4.47'de gösterilmektedir.

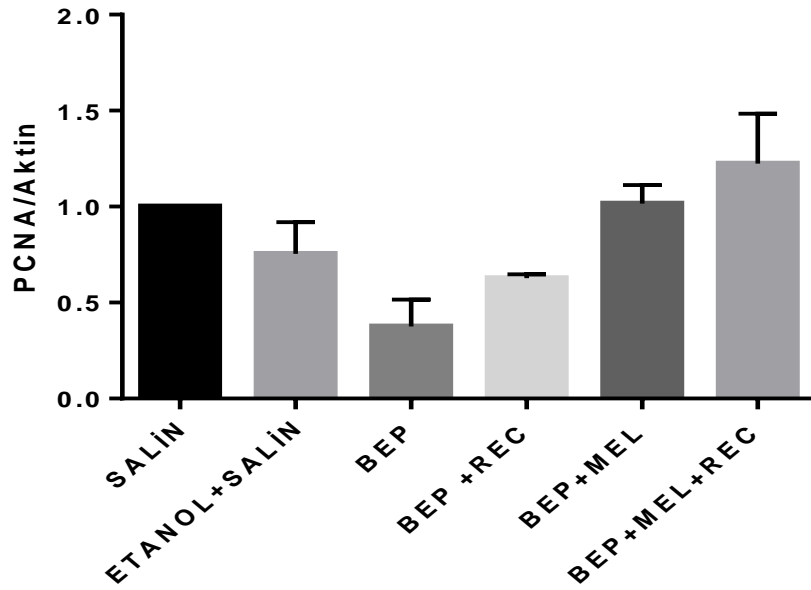


**Çizim 4.47.** G1: Salin, G2: Etanol+Salin, G3: BEP, G4: BEP+Recovery, G5: BEP+Melatonin, G6: BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait PCNA ve  $\beta$ -Aktin bantları

PCNA/  $\beta$ -Aktin bantları oranlarına bakıldığında, en yüksek PCNA/  $\beta$ -Aktin oranı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük PCNA/  $\beta$ -Aktin oranı ise BEP grubunda gözlemlendi. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının PCNA/  $\beta$ -Aktin oranı, salin grubuna yakın bir değerdedir (Çizelge 1.14 ve Çizim 4.48).

**Çizelge 4.14.** Gruplara göre PCNA/  $\beta$ -Aktin bant oranları

Gruplar	PCNA/ $\beta$ -Aktin Bant Oranları $\pm$ Standart Sapma
Kontrol (Salin)	1,000 $\pm$ 0,00
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,7534 $\pm$ 0,09577
BEP	0,3764 $\pm$ 0,08031
BEP + Recovery	0,6272 $\pm$ 0,01166
BEP + Melatonin	1,016 $\pm$ 0,05545
BEP + Melatonin + Recovery	1,225 $\pm$ 0,14980



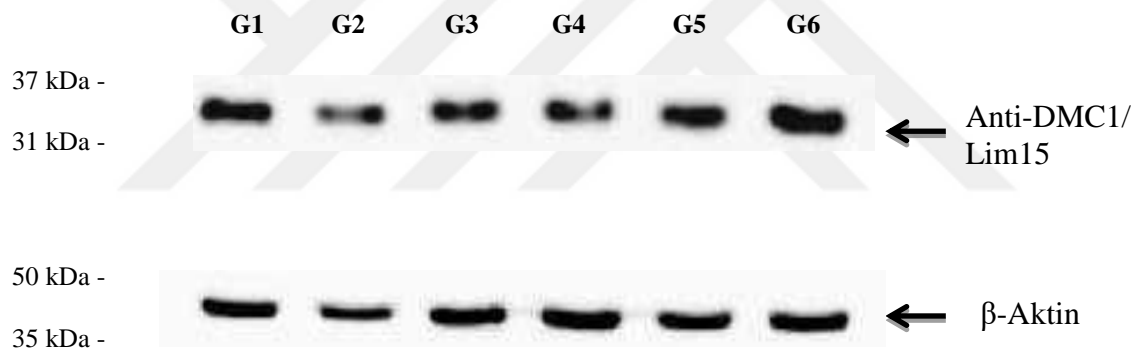
**Çizim 4.48.** PCNA/Aktin oranları. Gruplardaki değerler ortalama (X) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.5.2. Anti-DMC1/ Lim15 Western Blot Bulguları

DMC1/ Lim15 proteini mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alan bir proteindir. Yapılan çalışmalar DMC1/ Lim15 proteinin sadece mayozda spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve DMC1/ Lim15 proteinin PCNA proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya koymuştur. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir. Yeni çalışmalarda PCNA ve DMC1/ Lim15 ifadesi hastaların gonadotropin tedavisine cevap verip vermediğini tespit etmek için de kullanılmıştır. DMC1/ Lim15 ve PCNA ifadesi incelenerek hastaların gonadotropin tedavisine tepki verip vermediği hakkında bir kanıya varılabilir (Hamada ve diğ. 2007).

Söz konusu genin ekspresyonunun varlığı ile testis dokusunda spermatogenik aktivite hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.

Salin, Etanol+Salin, BEP, BEP+Recovery, BEP+Melatonin, BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait Anti-Dmc1/ Lim15 bantları Çizim 4.49'de gösterilmektedir.



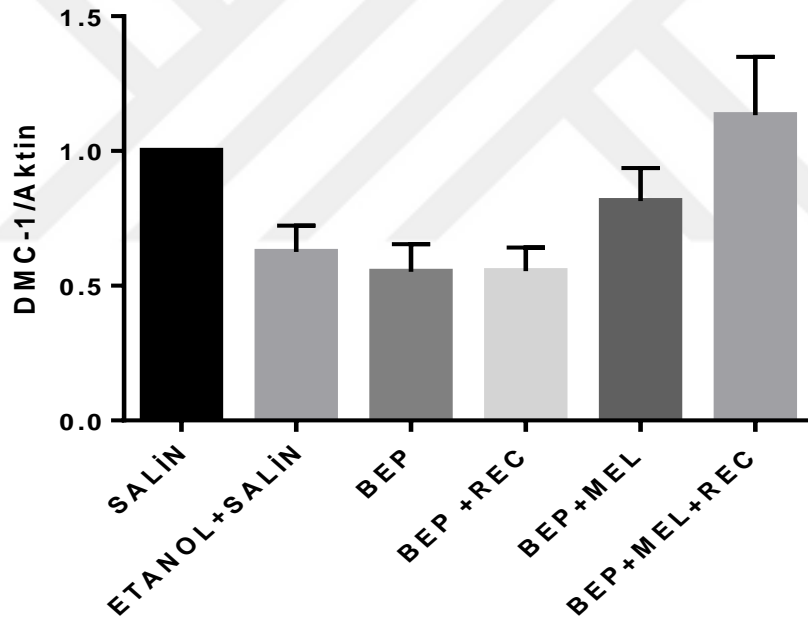
**Çizim 4.49.** G1: Salin, G2: Etanol+Salin, G3: BEP, G4: BEP+Recovery, G5: BEP+Melatonin, G6: BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait DMC1/Lim15 ve β-Aktin bantları

DMC1/ β-Aktin bantları oranlarına bakıldığında, en yüksek DMC1/ β-Aktin oranı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük DMC1/ β-Aktin oranı ise BEP grubunda gözlemlendi. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının DMC1/ β-Aktin oranı, salin grubuna yakın bir değere sahiptir (Çizelge 1.15 ve Çizim 4.50).



**Çizelge 4.15.** Gruplara göre DMC1/  $\beta$ -Aktin bant oranları

Gruplar	DMC1/ $\beta$ -Aktin Bant Oranları $\pm$ Standart Sapma
Kontrol (Salin)	1,000 $\pm$ 0,00
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,6251 $\pm$ 0,05681
BEP	0,5514 $\pm$ 0,05970
BEP + Recovery	0,5541 $\pm$ 0,05053
BEP + Melatonin	0,8138 $\pm$ 0,07101
BEP + Melatonin + Recovery	1,133 $\pm$ 0,1251

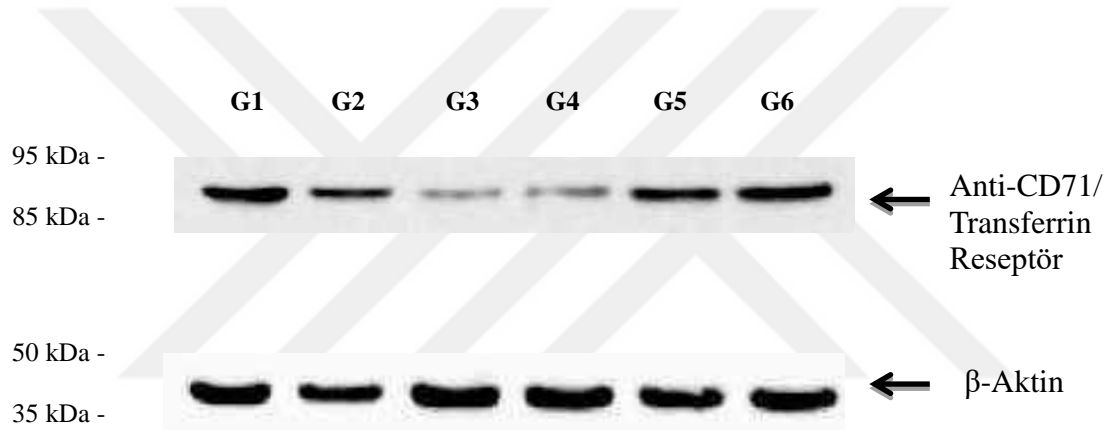


**Çizim 4.50.** Dmc1/Aktin oranı. Gruplardaki değerler ortalama ( $\bar{X}$ ) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

### 4.5.3. Anti-CD71/ Transferrin Reseptör Western Blot Bulguları

CD71/ Transferrin Reseptör hücre içine demir alımını düzenleyen, çoğunluğu eritroblast kaynaklı, kemik iliğinden hemoglobin sentezi için demir sağlayan, her biri 95 kDa iki eş polipeptid zincirinden oluşan 188 kDa bir transmembran glikoproteinidir. Hücre yüzeyindeki CD71/ Transferrin Reseptör konsantrasyonu hücrenin demir gereksinimini göstermektedir. Hücrenin metabolik gereksinimleri için hücre içindeki demir azaldığında hücre membranındaki CD71/ Transferrin Reseptör artar, hücre içinde demir fazla ise hücre membranındaki CD71/ Transferrin Reseptör azalır (Shih ve diğ. 1990, Uysal 2007).

Salin, Etanol+Salin, BEP, BEP+Recovery, BEP+Melatonin, BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait Anti-CD71/ Transferrin Reseptör bantları Çizim 4.51'da gösterilmektedir.

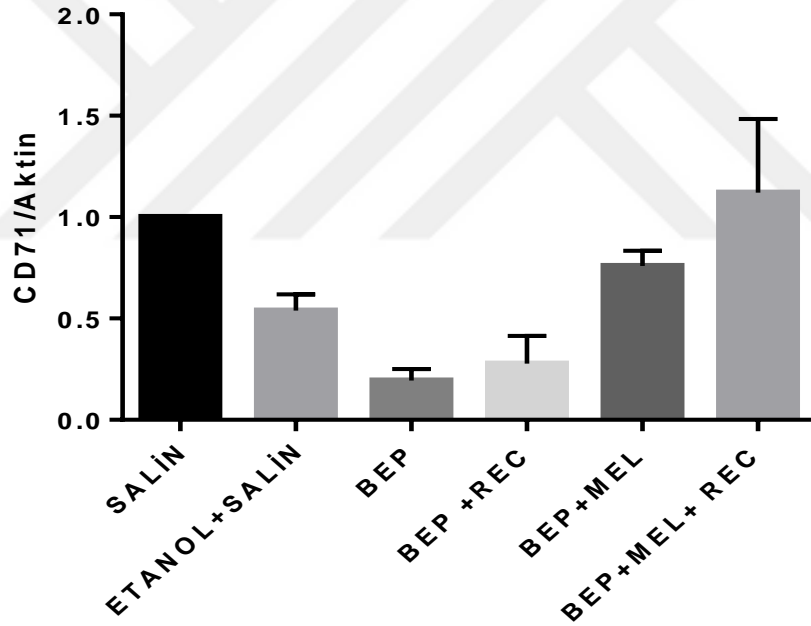


**Çizim 4.51.** G1: Salin, G2: Etanol+Salin, G3: BEP, G4: BEP+Recovery, G5: BEP+Melatonin, G6: BEP+Melatonin+ Recovery gruplarına ait CD71/ Transferrin reseptör ve β-Aktin bantları

CD71/ β-Aktin bantları oranlarına bakıldığında, en yüksek CD71/ β-Aktin oranı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük CD71/ β-Aktin oranı ise BEP grubunda gözlemlendi. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının CD71/ β-Aktin oranı, salin grubuna yakın bir değere sahiptir (Çizelge 1.16 ve Çizim 4.52).

**Çizelge 4.16.** Gruplara göre CD71/  $\beta$ -Aktin bant oranları

Gruplar	CD71/ $\beta$ -Aktin Bant Oranları $\pm$ Standart Sapma
Kontrol (Salin)	1,000 $\pm$ 0,00
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,5389 $\pm$ 0,04662
BEP	0,1938 $\pm$ 0,03308
BEP + Recovery	0,2773 $\pm$ 0,01371
BEP + Melatonin	0,7596 $\pm$ 0,04349
BEP + Melatonin + Recovery	1,121 $\pm$ 0,02098



**Çizim 4.92.** CD71/Aktin oranı. Gruplardaki değerler ortalama ( $X$ ) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

## 4.6. Biyokimya Bulguları

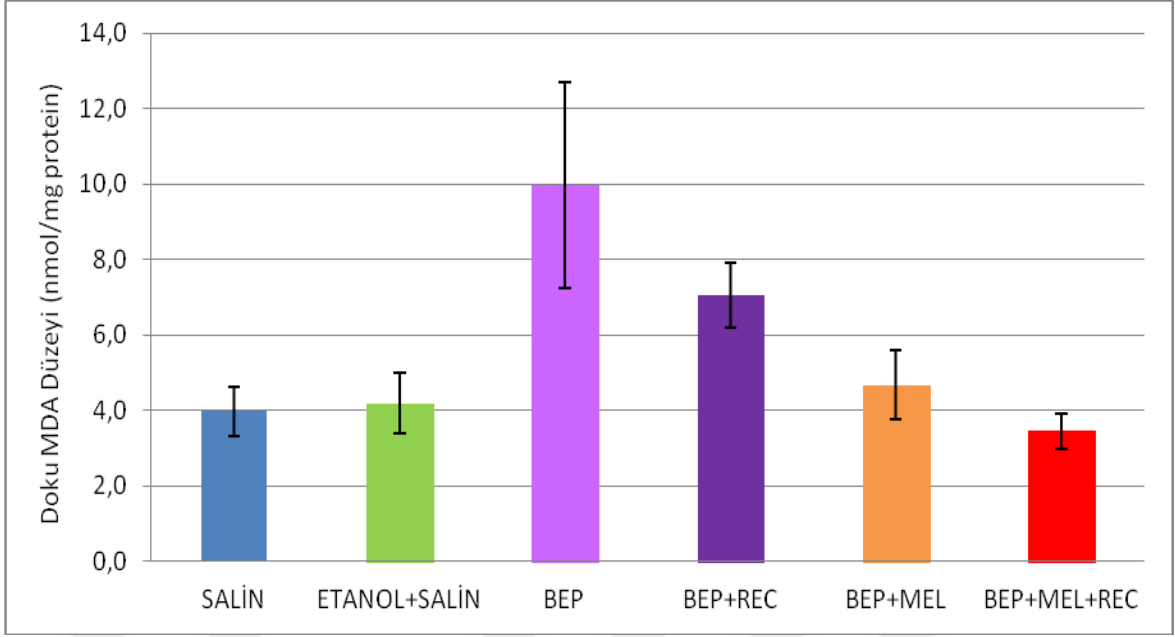
### 4.6.1. Testis dokusu MDA, GSH, SOD, TAS ve TOS düzey tayini bulguları

#### 4.6.1.1. Testis dokusu MDA düzey tayini bulguları

Grupların testis dokusu MDA düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek testis dokusu MDA düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük testis dokusu MDA düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,999$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,826$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,942$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu MDA düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,238$ ) (Çizelge 4.17, Çizim 4.53).

**Çizelge 4.17.** Gruplara göre testis dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

Gruplar	Testis Dokusu MDA Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	3,980621±0,66109	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	4,195666±0,79479	
BEP	9,972119±2,73209	
BEP + Recovery	7,054935±0,85004	
BEP + Melatonin	4,678612±0,90656	
BEP + Melatonin + Recovery	3,459276±0,46554	



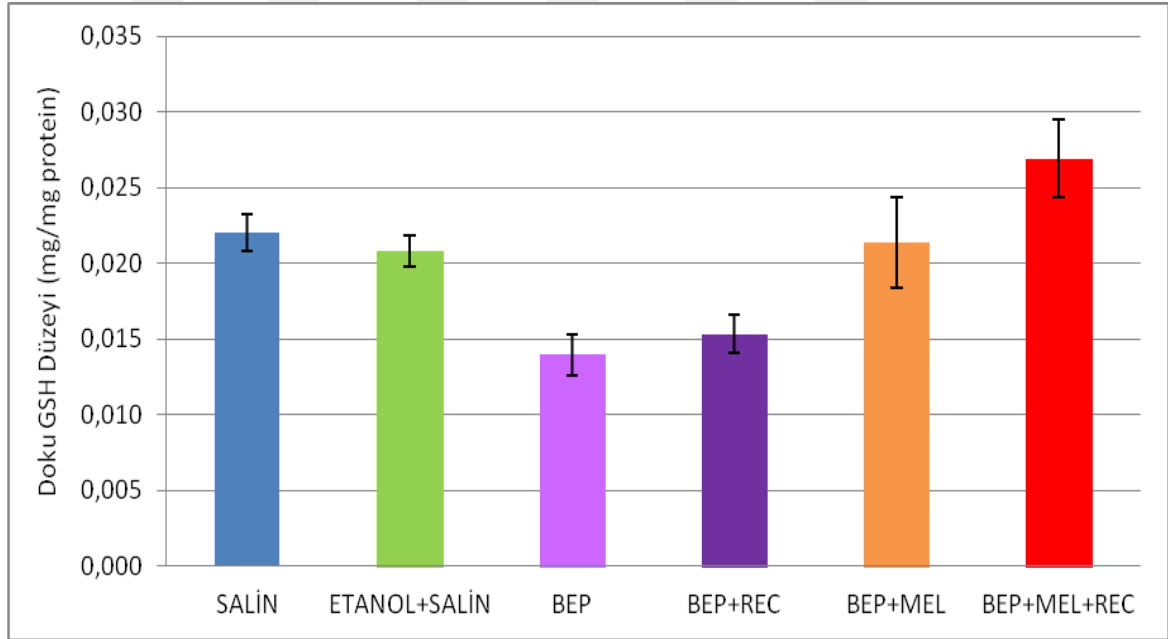
**Çizim 4.53.** Gruplara göre sıçanların testis dokusu MDA düzeyleri (nmol/mg protein). Gruplardaki değerler ortalama ( $\bar{X}$ )±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.1.2. Testis dokusu GSH düzey tayini bulguları

Grupların testis dokusu GSH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek testis dokusu GSH düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük testis dokusu GSH düzeyi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,611$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,947$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Kontrol grubu olan salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu GSH düzeylerinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,620$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.18, Çizim 4.54).

**Çizelge 4.18.** Gruplara göre testis dokusu GSH düzeyleri (mg/mg protein)

Gruplar	Testis Dokusu GSH Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	0,022067±0,00122	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,020819±0,00106	
BEP	0,013990±0,00135	
BEP + Recovery	0,015345±0,00128	
BEP + Melatonin	0,021365±0,00295	
BEP + Melatonin + Recovery	0,026926±0,00261	



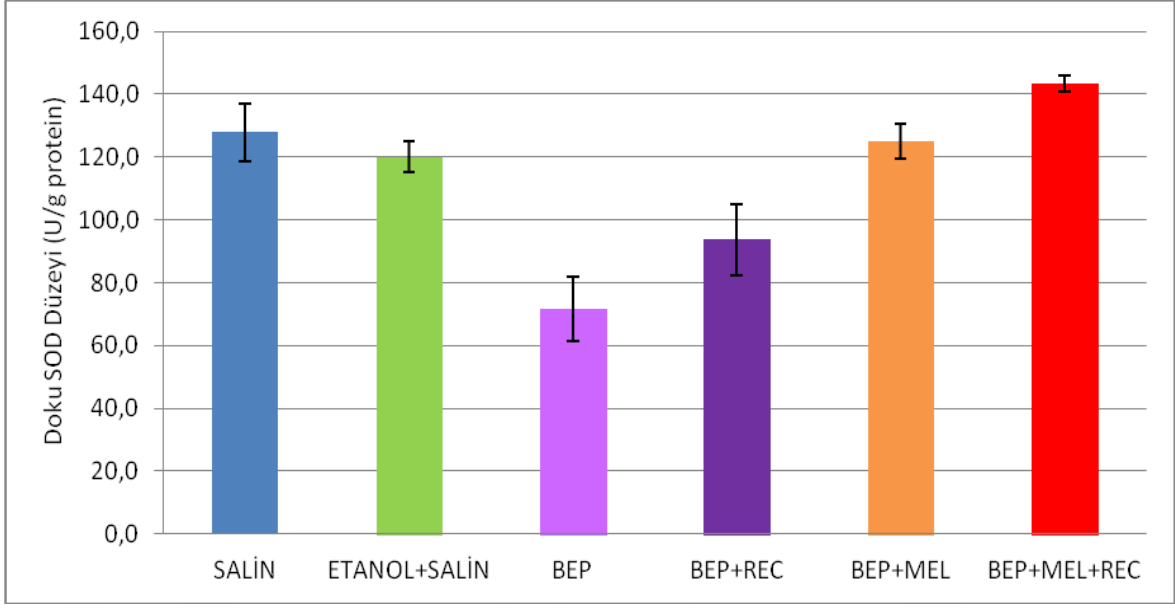
**Çizim 4.54.** Gruplara göre sıçanların testis dokusu GSH düzeyleri (mg/mg protein). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.1.3. Testis dokusu SOD düzey tayini bulguları

Grupların testis dokusu SOD düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek testis dokusu SOD düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük testis dokusu SOD düzeyi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,143$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,935$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Kontrol grubu olan salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu SOD düzeylerinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu SOD düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.19, Çizim 4.55).

**Çizelge 4.19.** Gruplara göre testis dokusu SOD düzeyleri (U/g protein)

Gruplar	Testis Dokusu SOD Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	127,892157±9,12828	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	120,068627±4,82795	
BEP	71,729412±10,23733	
BEP + Recovery	93,688235±11,25798	
BEP + Melatonin	124,950980±5,56614	
BEP + Melatonin + Recovery	143,426471±2,57826	



**Çizim 4.55.** Gruplara göre sıçanların testis dokusu SOD düzeyleri (U/g protein). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

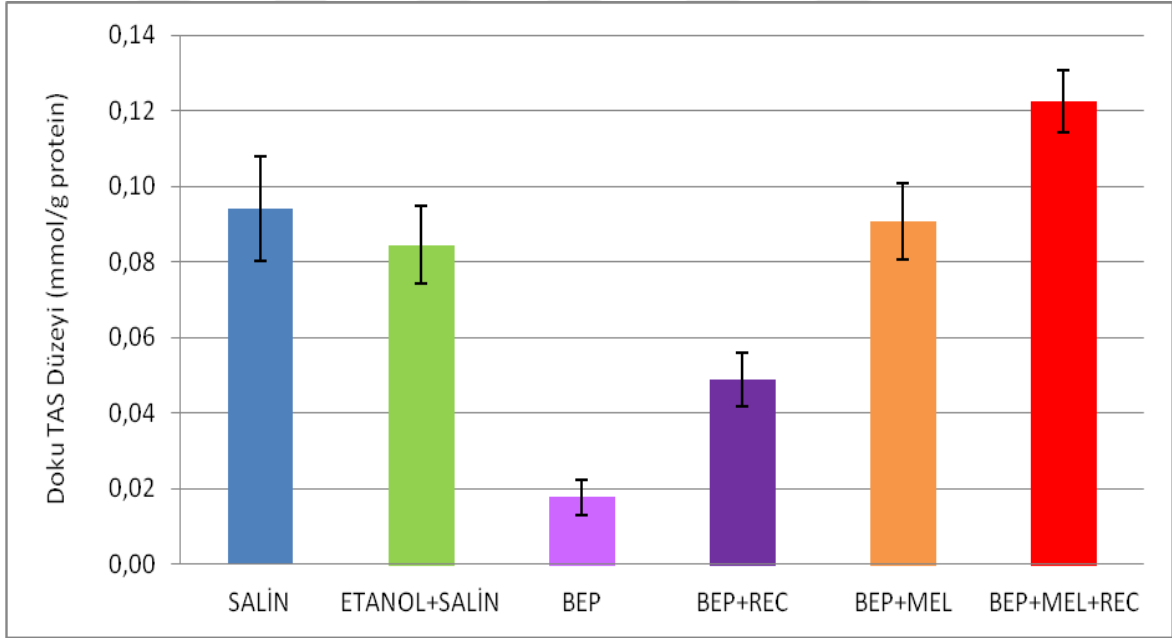
#### 4.6.1.4. Testis dokusu TAS düzey tayini bulguları

Grupların testis dokusu TAS düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek testis dokusu TAS düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük testis dokusu TAS düzeyi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,152$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,953$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Kontrol grubu olan salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu TAS düzeylerinde anlamlı bir azalış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu TAS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.20, Çizim 4.56).



**Çizelge 4.20.** Gruplara göre testis dokusu TAS düzeyleri (mmol/g protein)

Gruplar	Testis Dokusu TAS Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	0,094105±0,01385	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,084418±0,01023	
BEP	0,017714±0,00469	
BEP + Recovery	0,048896±0,00715	
BEP + Melatonin	0,090684±0,01005	
BEP + Melatonin + Recovery	0,122633±0,00819	



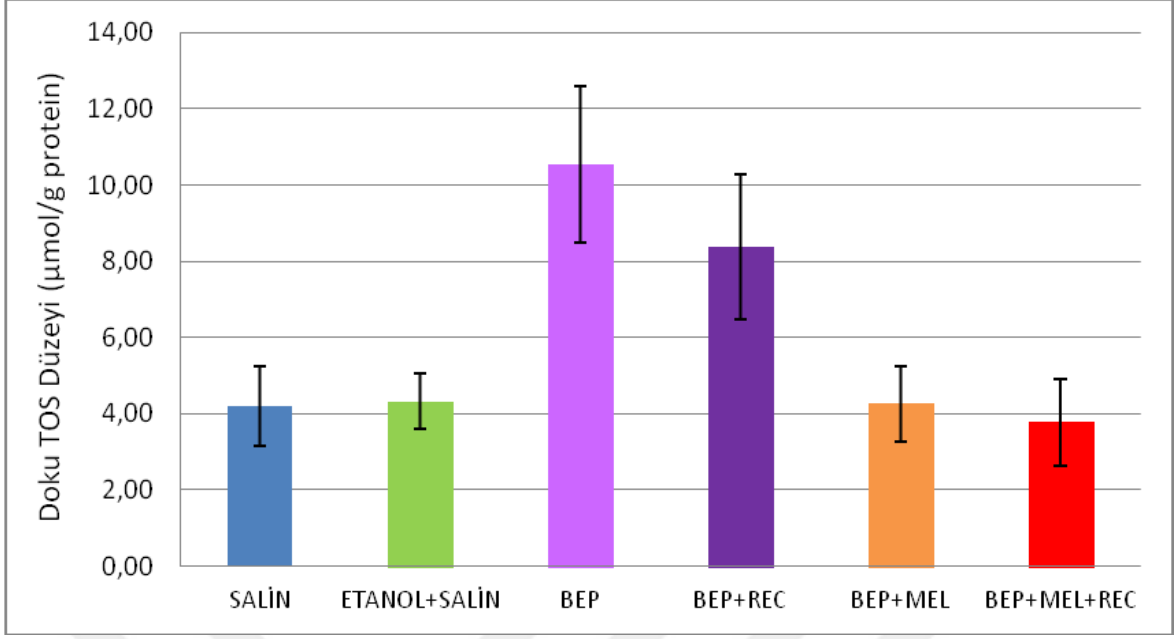
**Çizim 4.56.** Gruplara göre sıçanların testis dokusu TAS düzeyleri (mmol/g protein). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.1.5. Testis dokusu TOS düzey tayini bulguları

Grupların testis dokusu TOS düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek testis dokusu TOS düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük testis dokusu TAS düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=1,000$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=1,000$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,890$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu TOS düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p=0,007$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu TOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,790$ ) (Çizelge 4.21, Çizim 4.57).

**Çizelge 4.21.** Gruplara göre testis dokusu TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol/g}$  protein)

Gruplar	Testis Dokusu TOS Düzeyleri $\pm$ Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	4,202342 $\pm$ 1,05243	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	4,318309 $\pm$ 0,72036	
BEP	8,373279 $\pm$ 1,91630	
BEP + Recovery	10,540226 $\pm$ 2,05104	
BEP + Melatonin	4,257028 $\pm$ 0,97501	
BEP + Melatonin + Recovery	3,785967 $\pm$ 1,13793	



**Çizim 4.57.** Gruplara göre sıçanların testis dokusu TOS düzeyleri (µmol/g protein). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

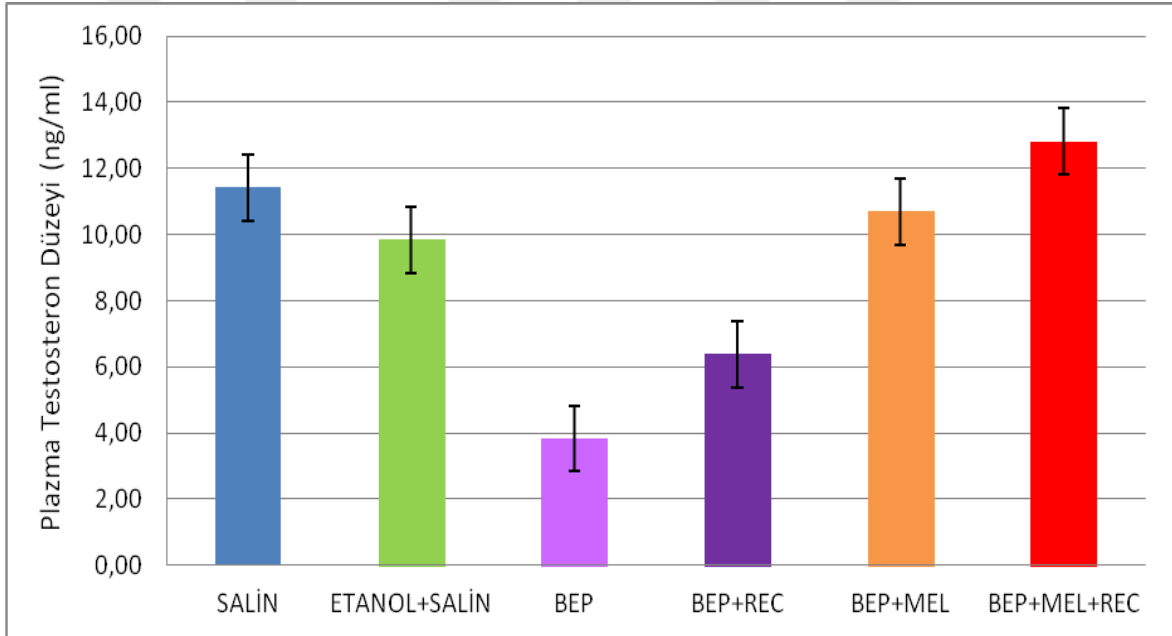
#### 4.6.2. Plazmada Testosteron, FSH ve LH düzey tayini bulguları

##### 4.6.2.1. Plazmada Testosteron düzey tayini bulguları

Grupların plazma Testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek plazma Testosteron düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük plazma Testosteron düzeyi ise BEP grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,447$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,957$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,577$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre plazma Testosteron düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,084$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre plazma Testosteron düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,144$ ) (Çizelge 4.22, Çizim 4.58).

**Çizelge 4.22.** Gruplara göre plazma Testosteron düzeyleri (ng/ml)

Gruplar	Plazma Testosteron Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	11,415642±1,81633	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	9,843649±1,65082	
BEP	3,835078±2,98964	
BEP + Recovery	6,386546±2,38744	
BEP + Melatonin	10,691023±2,00108	
BEP + Melatonin + Recovery	12,813843±1,61982	



**Çizim 4.58.** Gruplara göre sıçanların plazma Testosteron düzeyleri (ng/ml). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

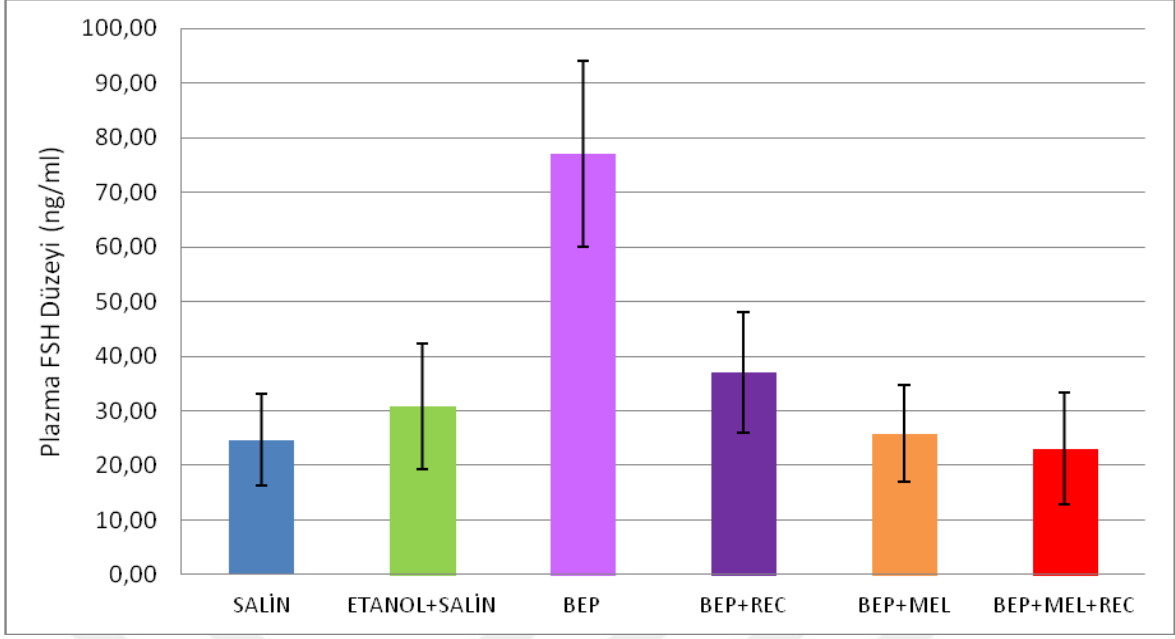
#### 4.6.2.2. Plazmada FSH düzey tayini bulguları

Grupların plazma FSH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,000). En yüksek plazma FSH düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük plazma FSH düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında (p=0,772), BEP+Melatonin grubu arasında (p=1,000) ve

BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,999$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre plazma FSH düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre plazma FSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,990$ ) (Çizelge 4.23, Çizim 4.59).

**Çizelge 4.23.** Gruplara göre plazma FSH düzeyleri (ng/ml)

<b>Gruplar</b>	<b>Plazma FSH Düzeyleri ± Standart Sapma</b>	<b>P değeri</b>
Kontrol (Salin)	24,706156±8,29823	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	30,799797±11,54211	
BEP	76,995637±16,93978	
BEP + Recovery	37,109989±11,03611	
BEP + Melatonin	25,832976±8,82931	
BEP + Melatonin + Recovery	23,050550±10,26061	



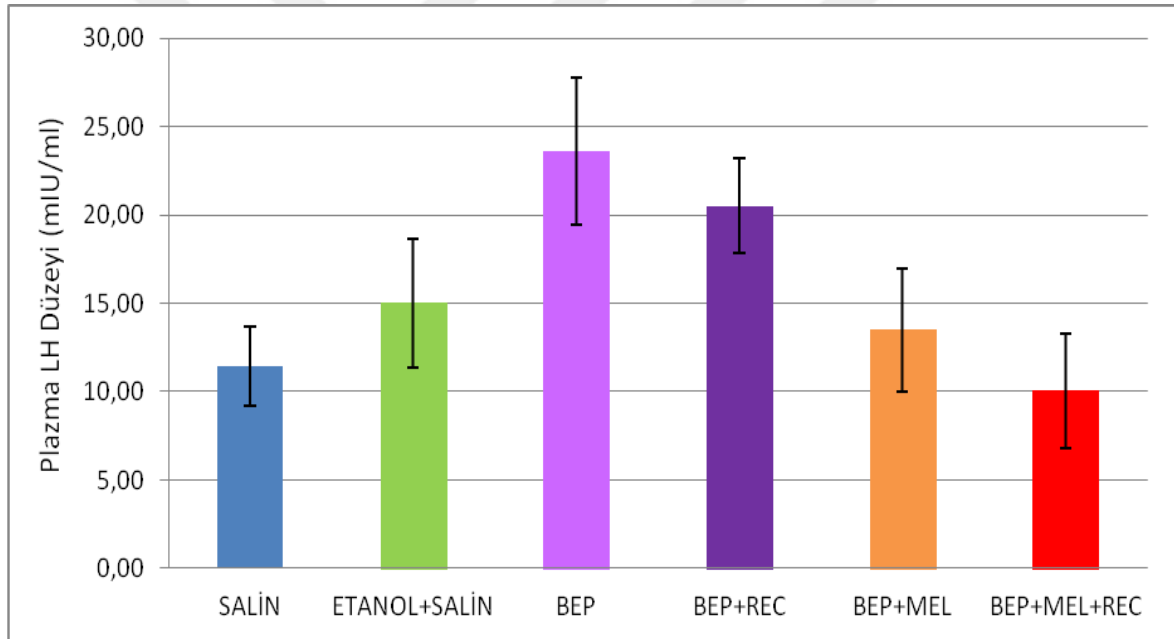
**Çizim 4.59.** Gruplara göre sıçanların plazma FSH düzeyleri (ng/ml). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.2.3. Plazmada LH düzey tayini bulguları

Grupların plazma LH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek plazma LH düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük plazma LH düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,097$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,658$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,896$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre plazma LH düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,308$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre plazma LH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,121$ ) (Çizelge 4.24, Çizim 4.60).

**Çizelge 4.24.** Gruplara göre plazma LH düzeyleri (mIU/ml)

Gruplar	Plazma LH Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	11,451554±2,23678	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	15,029897±3,64673	
BEP	23,575540±4,1664	
BEP + Recovery	20,509844±2,67668	
BEP + Melatonin	13,479347±3,47473	
BEP + Melatonin + Recovery	10,034141±3,22268	



**Çizim 4.60.** Gruplara göre sıçanların plazma LH düzeyleri (mIU/ml). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.3.Serumda MDA, GSH, SOD, TAS ve TOS düzey tayini bulguları

##### 4.6.3.1. Serumda MDA düzey tayini bulguları

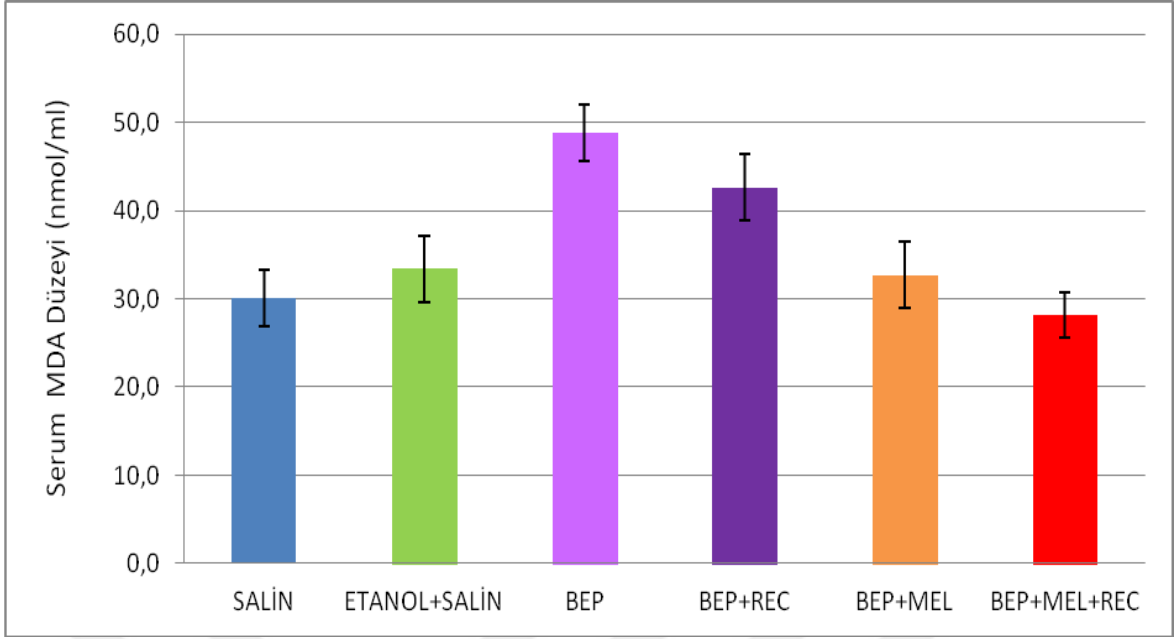
Grupların serum MDA düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,000). En yüksek serum MDA düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük serum MDA düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda izlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin

grubu arasında ( $p=0,170$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,402$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,725$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre serum MDA düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p=0,002$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre serum MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ( $p=0,18$ ) (Çizelge 4.25, Çizim 4.61).

**Çizelge 4.25.** Gruplara göre serum MDA düzeyleri (nmol/ml)

<b>Gruplar</b>	<b>Serum MDA Düzeyleri ± Standart Sapma</b>	<b>P değeri</b>
Kontrol (Salin)	30,043830±3,16640	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	33,381173±3,76750	
BEP	48,823716±3,24002	
BEP + Recovery	42,628292±3,80538	
BEP + Melatonin	32,700585±3,71452	
BEP + Melatonin + Recovery	28,099167±2,55538	





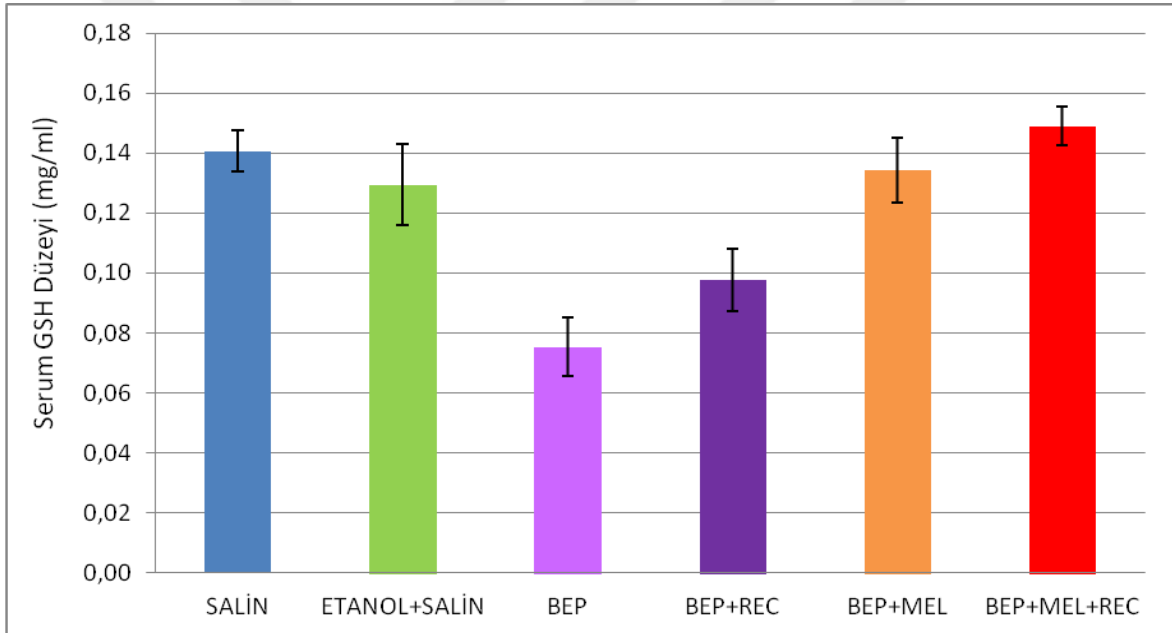
**Çizim 4.61.** Gruplara göre sıçanların serum MDA düzeyleri (nmol/ml). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.3.2. Serumda GSH düzey tayini bulguları

Grupların serum GSH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p=0,000$ ). En yüksek serum GSH düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük serum GSH düzeyi ise BEP grubunda görüldü. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,072$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,586$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,322$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre serum GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre serum GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ( $p=0,006$ ) (Çizelge 4.26, Çizim 4.62).

**Çizelge 4.26.** Gruplara göre serum GSH düzeyleri (mg/ml)

Gruplar	Serum GSH Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	0,140697±0,00684	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	0,129427±0,01348	
BEP	0,075321±0,00965	
BEP + Recovery	0,097601±0,01032	
BEP + Melatonin	0,134150±0,01080	
BEP + Melatonin + Recovery	0,148999±0,00642	



**Çizim 4.62.** Gruplara göre sıçanların serum GSH düzeyleri (mg/ml). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

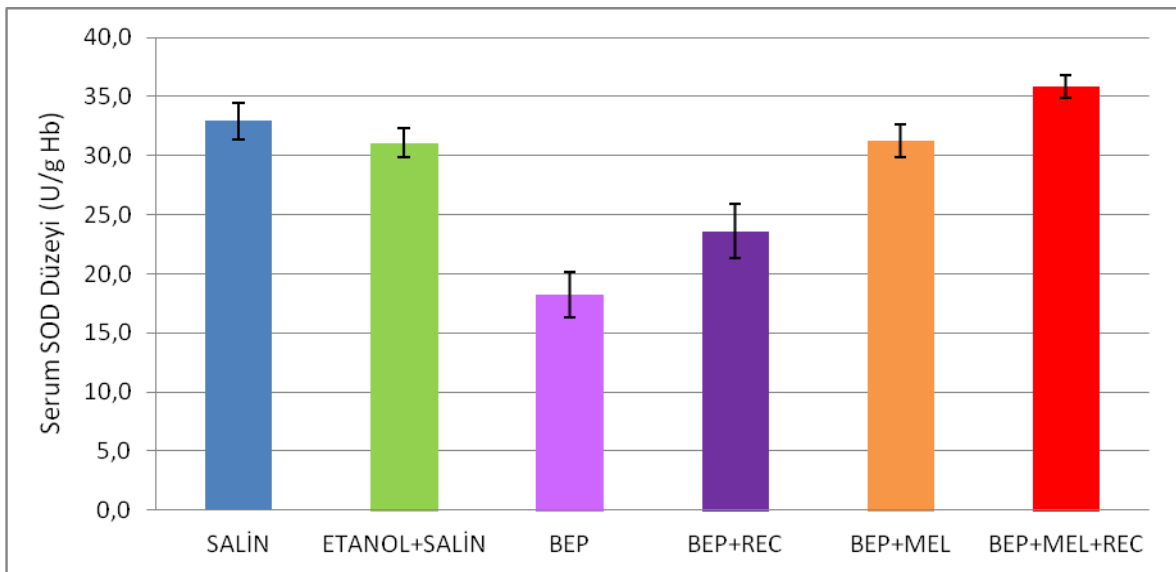
#### 4.6.3.3. Serumda SOD düzey tayini bulguları

Grupların serum SOD düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,000). En yüksek serum SOD düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük serum SOD düzeyi ise BEP grubunda görüldü. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında (p=0,062) ve BEP+Melatonin grubu arasında (p=0,106) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. BEP+Melatonin+Recovery grubunda kontrol grubu olan salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (p<0,05). BEP grubu ve

BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre serum SOD düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre serum SOD düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.27, Çizim 4.63).

**Çizelge 4.27.** Gruplara göre serum SOD düzeyleri (U/g Hb)

Gruplar	Serum SOD Düzeyleri	P değeri
	$\pm$ Standart Sapma	
Kontrol (Salin)	32,958217 $\pm$ 1,54364	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	31,097975 $\pm$ 1,21543	
BEP	18,233530 $\pm$ 1,94542	
BEP + Recovery	23,618480 $\pm$ 2,33212	
BEP + Melatonin	31,247100 $\pm$ 1,39899	
BEP + Melatonin + Recovery	35,873217 $\pm$ 0,99058	



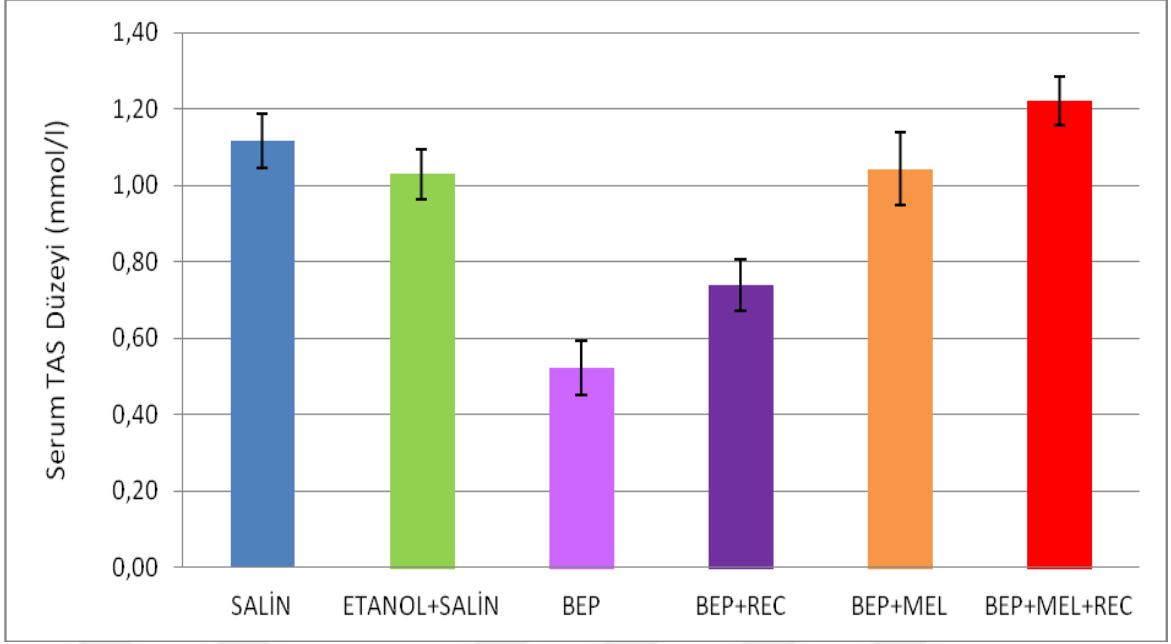
**Çizim 4.63.** Gruplara göre sıçanların serum SOD düzeyleri (U/g Hb). Grublardaki değerler ortalama ( $\bar{X}$ ) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.3.4. Serumda TAS düzey tayini bulguları

Grupların serum TAS düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulundu ( $p=0,000$ ). En yüksek serum TAS düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük serum TAS düzeyi ise BEP grubunda görüldü. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,054$ ) ve BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,144$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. BEP+Melatonin+Recovery grubunda kontrol grubu olan salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $p=0,011$ ). BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre serum TAS düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre serum TAS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.28, Çizim 4.64).

**Çizelge 4.28.** Gruplara göre serum TAS düzeyleri (mmol/l)

Gruplar	Serum TAS Düzeyleri ± Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	1,116528±0,06934	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	1,029847±0,06548	
BEP	0,521544±,07001	
BEP + Recovery	0,740214±,06668	
BEP + Melatonin	1,042485±0,09555	
BEP + Melatonin + Recovery	1,220587±0,06410	



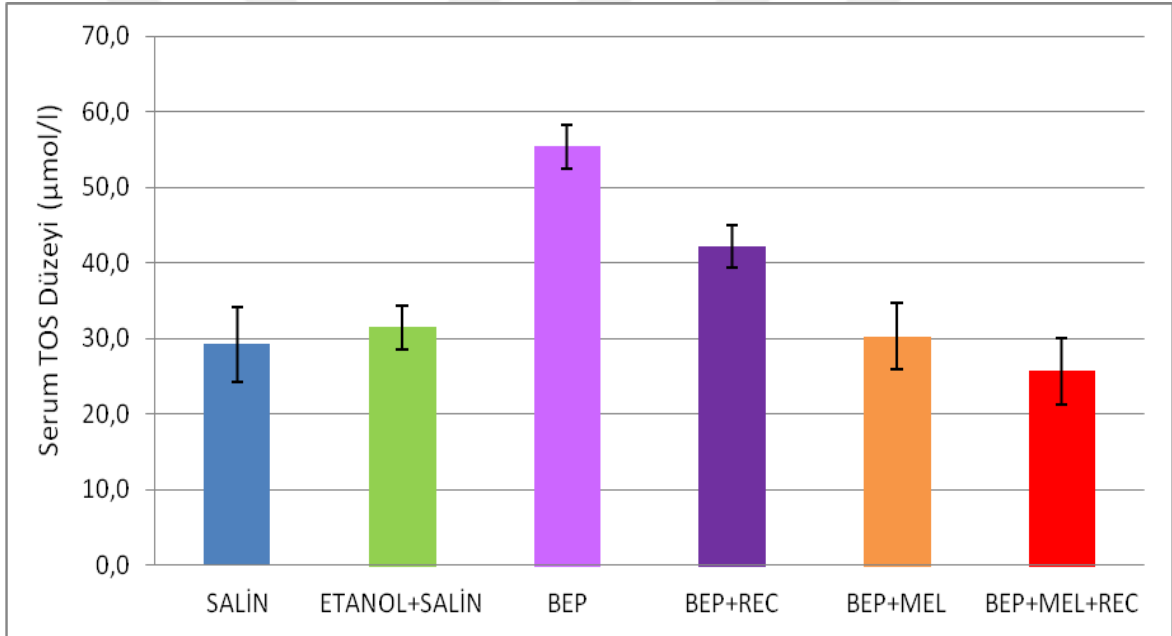
**Çizim 4.64.** Gruplara göre sıçanların serum TAS düzeyleri (mmol/l). Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

#### 4.6.3.5. Serumda TOS düzey tayini bulguları

Grupların serum TOS düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulundu ( $p=0,000$ ). En yüksek serum TOS düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük serum TOS düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda görüldü. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ( $p=0,711$ ), BEP+Melatonin grubu arasında ( $p=0,981$ ) ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında ( $p=0,238$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre serum TOS düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur ( $p=0,000$ ). Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery grupları ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlendi ( $p<0,05$ ). Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında serum TOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,051$ ) (Çizelge 4.29, Çizim 4.65).

**Çizelge 4.29.** Gruplara göre serum TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol/l}$ )

Gruplar	Serum TOS Düzeyleri $\pm$ Standart Sapma	P değeri
Kontrol (Salin)	29,208861 $\pm$ 4,92715	0,000
Melatonin'in çözücü kontrolü (etanol+salin)	31,465190 $\pm$ 2,88670	
BEP	55,392405 $\pm$ 2,90482	
BEP + Recovery	42,151899 $\pm$ 2,77071	
BEP + Melatonin	30,316456 $\pm$ 4,45660	
BEP + Melatonin + Recovery	25,675105 $\pm$ 4,35990	



**Çizim 4.65.** Gruplara göre sıçanların serum TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol/l}$ ). Gruplardaki değerler ortalama ( $X$ ) $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi.

## 5. TARTIŞMA

Testis kanseri 15-35 yaş arası genç erkeklerde yaygın olarak görülen kanser tipidir ve erkeklerde görülen malign tümörlerin %1-2'sini oluşturmaktadır. Testis kanserinin %95'i ise germ hücreli tümörlerden oluşmaktadır. Testis kanserinin insidansı son 50 yılda dünya genelinde giderek artmaktadır (Gilligan 2007, Huyghe ve diğ. 2007, Kawai ve diğ. 2006).

TGHT etiyojisi genetik faktörlerin yanısıra kimyasal karsinojenlere maruziyet ve travma gibi çevresel risk faktörleri, kriptorşidizm, orşit, Klinefelter sendromu, spermatik ve testiküler disgenezi, testiküler atrofi, inguinal herni ve hidrosel sayılabilir (Richiardi ve diğ. 2007, Rukstalis 1996, di Pietro ve diğ. 2005, Holzick ve diğ. 2004).

Son yıllarda testis kanserinin insidansının artmasına rağmen bu hastalığa bağlı ölüm oranının azaldığı görülmektedir. Bunu sağlayan nedenlerden biri de kanser tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapinin daha etkin kombinasyonlarının kullanımıdır. Kemoterapinin ana ilkesi; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden özellikle kontrolsüz çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etki göstererek büyümelerini ve çoğalmalarını durdurmak ya da yok etmektir. Kemoterapi ile hastalığın tedavi edilmesi, kanserli hücrelerin bölünmesinin ve çoğalmasının engellenmesi ve yok edilmesi, hastalığın büyümesinin ve yayılmasının önlenmesi, hastalığa bağlı rahatsızlıklarının azaltılması, yaşam sürelerinin uzatılması ve böylece daha kaliteli yaşam sürmeleri amaçlanmıştır (Küçüksayan 2011, Brooks ve diğ. 2009, Akyol 2004).

Kemoterapötik ajanlar kanserli olmayan normal doku ve hücrelerde de çeşitli düzeylerde yan etkilere sahip olduğu için erkek infertilitesi hatta sterilitesi kemoterapötik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği olumsuz faktörlerden birisidir. Spermatogenezdeki aksaklıklar, sperm kalite parametrelerindeki bozukluklar, ejakülasyon bozukluğu, hipotalamus-hipofiz-gonad eksenindeki fonksiyon bozukluğu, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi olumsuz durumlar kemoterapötiklerin üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler arasında gösterilmektedir (Ragheb ve Sabanegh 2010, Delbes ve diğ. 2010, Demirci ve diğ. 2010, Meistrich 2009, Oktay ve Meirow 2007, Schrader ve diğ. 2001, Meistrich 1999).

Testisteki Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen kemoterapötiklere dirençli iken, germinal epitel bu ilaçlara son derece duyarlıdır. Ancak kullanılan kemoterapi protokolünün ilaç sayısı, dozları ve uygulama sürelerine bağlı olmakla birlikte, eğer germinal epiteldeki kök hücreler sağlam kalırsa, tedavinin sonlandırılmasından sonra belli

zaman periyodunda spermatogenezis geriye dönebilmektedir (Ragheb ve Sabanegh 2010, Schrader ve diğ. 2001, Colpi ve diğ. 2004).

İnfertilite evli çiftlerin %15'ini etkileyebilmektedir. Bu oranın yarısını ise erkeğe bağlı infertilite oluşturmaktadır (Sharlip ve diğ. 2002). Diğer taraftan kemoterapi alan evli çiftlerde ise uygulama bittikten sonra görülen infertilite oranı %30'lara kadar çıkmaktadır (Bokemeyer ve diğ. 1994, Schrader ve diğ. 2001).

Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte spermatogenik hücrelerde doğrudan (Delbes ve diğ. 2010, Codrington ve diğ. 2007a, 2007b) ve/ veya oksidatif stresle ilişkili olarak dolaylı (Agarwal ve Sekhon 2010, Türk ve diğ. 2006, Tremellen 2008) meydana gelen kromatin ve DNA hasarı ile steroidogenesisisteki aksaklıklar genellikle sorumlu tutulmaktadır (Türk 2013).

Spermatogenetik hücreler kemoterapötik ajanların zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlıdır. Kemoterapötik ajanlar, kök hücre topluluğunda onarılamayan hasarlara yol açarak kalıcı infertiliteye neden olabilirler. Kemoterapiye en duyarlı hücreler, aktif olarak bölünen spermatogonyum ve pre-leptoten fazına kadar olan spermatositlerdir (Dohle 2010).

BEP rejimi; Bleomisin, Etoposid, ve sisPlatin kombinasyonundan oluşan ve metastatik nonseminomatöz testis tümörlerinde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür. Bu kür ayrıca, evre I testis tümörü için uygulanan orşiektomi sonrasında tümör dokusunda saptanan vasküler invazyonun yaratabileceği yüksek orandaki tekrarlama (nüks) ihtimali için de kullanılabilir. İleri evre tümörlerde BEP rejimi tedavisinin üstün başarısı bu kombinasyonu standart hale getirmiştir. BEP rejimi, her bir siklus üç hafta olmak üzere üç ya da dört siklus olarak uygulanır. Bleomisin, 30 U/gün i.v. olarak siklusun 2., 9. ve 16. günleri; Etoposid, 100 mg/m<sup>2</sup>/gün i.v. olarak siklusun 1-5. günleri; Sisplatin ise 20 mg/m<sup>2</sup>/gün i.v. olarak siklusun 1-5. Günleri uygulanmaktadır (Jones ve Vasey 2003, Huddart ve diğ. 2005, Williams ve diğ. 1987).

Bleomisin, glikopeptid yapısında bir antibiyotiktir (Corcoran ve diğ. 1975). Bleomisin, özellikle hücre döngüsünün G2 ve M fazında daha çok etkili olup oksidatif süreçle DNA'ya direkt olarak bağlanarak tek ve çift zincir kırılmalarına neden olmaktadır ve büyüyen hücrelerde apoptozisi tetiklemektedir (Spermon ve diğ. 2006). Bu süreç oksijen ve ferröz demir iyonuna bağlıdır (Day ve diğ. 2002). Birçok çalışmada demir, bakır ve kobalt gibi metallerin Bleomisin tarafından indüklenen DNA kırılmasını desteklediği gösterilmiştir. Demirin in vivo olarak etki gösteren başlıca metal olduğu düşünülmektedir (Abraham ve diğ. 2001). Bleomisin, mitokondriyonların elektron transport sisteminde



elektron transportu sırasında yüksek düzeyde ROS, hidrojen peroksit radikalleri ve süperoksit radikalleri oluşturur (Conklin 2004). Oluşan bu radikaller DNA'ya atak yapıp tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, transkripsiyon ve translasyonda hasara neden olmaktadır (Sausville ve diğ. 1978). ROS'un neden olduğu artmış hücrel oksidatif stres, hücrenin redoks durumunu değiştirerek birçok reaksiyonu tetiklemektedir (Cejas 2004). Bleomisinle birlikte farklı kemoterapötiklerin ortak kullanılması sonucu kanserli hastalarda oligospermi ve azospermi, spermelerde DNA hasarı ile birlikte kromozomal anöploidiler görülmektedir. Arrebola ve diğ. antikanser antibiyotik olan Bleomisin'i, günlük 30 mg/kg dozunda 5 gün boyunca intraperitoneal olarak sıçanlara uygulamışlar ve 52 gün sonra bu hayvanları dekapite ettiklerinde sperm sayısında azalma ve anormal sperm oranında da artışlar tespit etmişlerdir (Arrebola ve diğ. 2010). Benzer şekilde Hansen ve Sorensen, 100 mg/kg Bleomisin'in farklılaşma sürecindeki fare spermatogonyumlarının yaşama oranını %37'den %4'lere düşürdüğünü gözlemlemişlerdir (Hansen ve Sorensen 1991).

Etoposid ve teniposid gibi podofilotoksinlerin S sonu-G2 fazı ile mitokondriyon fonksiyonlarını inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Page ve Takimoto 2004, Dancey ve Arbuck 2000). Etoposid'in başlıca hedefi topoizomerez II enzimidir ve bu enzimin DNA ile oluşturduğu bağlanma komplekslerinin konsantrasyonunu azaltarak hücreleri öldürmektedir (Wilstermann ve Osheroff 2001, Burden ve Osheroff 1998). Etoposidle birlikte birkaç kemoterapötüğün kombinasyon tarzında testiküler tümörlü hastalarda kullanılması sonucunda, kemoterapiyi takip eden süreçte spermatogenezis ve Leydig hücrelerinde fonksiyon bozukluğu (De Mas ve diğ. 2001) ile spermatozoonlarda artan derecede anöploidi (Gerres ve diğ. 1998) gibi reproduktif yan etkiler meydana gelmektedir. Prepubertal dönemde sıçanlara uygulanan Etoposid, doza bağımlı olarak apoptotik germ hücre sayısında artış (Stumpp ve diğ. 2004); reproduktif organ ağırlıklarında azalma; spermatogonyum, spermatozoid ve spermatid sayısında azalma; testiküler histopatolojik lezyonlar ve infertiliteye (Freitas ve diğ. 2002) neden olmaktadır.

Küratif etkisinin yanında gonadotoksik etkisinin de yüksek olması nedeniyle kemoterapötiklerin özellikle de alkilleyici ajanların kanserli ve sağlıklı erkeklerin reproduktif sistemi üzerindeki etkileri ile ilgili pek çok çalışma Sisplatin'le yapılmıştır (Schrader ve diğ. 2001). Sadece Sisplatin ya da Sisplatin tabanlı kombine kemoterapi alan kanserli hastaların hemen hemen hepsinde akut azospermi gelişmektedir ve hastaların yaklaşık yarısında kemoterapiden sonraki 6 ay ile 5 yıl arasındaki bir sürede sperm sayısında normalleşme görülmektedir (Ishikawa ve diğ. 2004, Sakamoto ve diğ. 2007). Bununla birlikte hastaların %30'unda da kalıcı azospermi meydana gelmektedir (Petersen

ve diğ. 1998). Geriye dönüşümsüz spermatogenezis hasarı ise Sisplatin'in kümülatif dozu ile ilişkili olup 400 mg/m<sup>2</sup>'den düşük dozlar uzun süre sperm üretimini baskımlarken, 600 mg/m<sup>2</sup>'den daha yüksek dozlarda kalıcı azoospermi riski artmaktadır (Colpi ve diğ. 2004, Sakamoto ve diğ. 2007). Sisplatin hücre içerisine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek hücrede fibrogenezis, inflamasyon, hipoksi, mitokondriyal hasar, ROS üretimi, oksidatif stres, GSH-Px, SOD, KAT gibi aktif antioksidan enzimlerin aktivasyonunun inhibisyonu, MDA düzeyinin artması, apoptozis ve nekrozise yol açarak sitotoksik etki göstermektedir (Kanter ve diğ. 2007). Platin bileşiklerinin uygulaması sonucunda sıçanlarda testiküler histopatolojik lezyonlar (spermatogeneziste yavaşlama; spermatogonyum, spermatosit, spermatid, Leydig hücrelerinde azalma ve dejenerasyon), steroidogenik enzimlerin (3β-hidroksisteroid dehidrogenaz, 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz) testiküler aktiviteleri ve serum testosteron düzeyinde azalmalar, serum FSH ve LH düzeylerinde artışlar (Reddy ve diğ. 2010a, 2010b), sperm sayısı ve motilitesinde azalmalar ile ayrıca sperm membran bütünlüğünde bozulmalar (Reddy ve diğ. 2010a, Reddy ve diğ. 2010b, Türk vd., 2008) gibi önemli reproduktif sistem hasarları meydana gelmektedir. Yetişkin erkek fare ve sıçanlarla yapılan pek çok çalışmada Sisplatin'in testis, epididimis, seminal bez ve prostat ağırlıkları, sperm yoğunluğu, motilitesi ve morfolojik olarak normal yapılı spermilerin sayısında azalmalara, seminifer tübül çaplarında daralmalara, testiküler dokuda dejenerasyon, nekrozis ve ödem gibi histopatolojik lezyonlara (Ateşşahin ve diğ. 2006a, Ateşşahin ve diğ. 2006b, Ateşşahin ve diğ. 2006c, İlbey ve diğ. 2009a, İlbey ve diğ. 2009b, İlbey ve diğ. 2009c, Türk ve diğ. 2008), testiküler apoptotik germ hücre sayısında artışlara (Amin ve diğ. 2008), serum FSH düzeyinde yükselmelere, spermelerde geri dönüşümsüz DNA çift zincir kırılmalarına (Narayana 2010) ve testosteron düzeylerinde ise azalmalara yol açtığı bildirilmektedir.

Çalışmamızda BEP rejiminin testis dokusunda ve sperm parametreleri üzerinde görülen histopatolojik etkilerine karşı Melatonin'in koruyuculuğu ve potansiyel iyileştirici özelliği morfolojik, morfometrik, immünohistokimyasal, western-blotting, biyokimyasal ve ultrastrüktürel gibi farklı yöntemler uygulanarak incelenmiştir.

Kemoterapi erkek infertilitesinin etiolojisindeki en önemli faktörlerden biri olan oksidatif strese neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarla, çeşitli kategorideki sitostatik ajanların hem in vivo hem de in vitro olarak serbest radikal üretimine neden oldukları gösterilmiştir (Weijl ve diğ. 1997, Crohns ve diğ. 2009, Simone ve diğ. 2007a ve 2007b, Facorro ve diğ. 2004, Chen ve diğ. 2007, Sari ve diğ. 2008, Brea-Calvo ve diğ. 2006, Sangeetha ve diğ. 1990, White ve diğ. 2006) Sitostatik ilaçlarla tedavi edilen hematolojik

ve/ veya solid malignansili hastalarda, polimorfonükleer lökositler tarafından in vitro olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> radikali üretiminin tedavi öncesine göre belirgin derecede arttığı görülmüştür. Kanser hastalarında kemoterapiye bağlı olarak lipit peroksidasyonu (LPO) ürünlerinin miktarının yükseldiği ve tedavi sonrasında da plazma E vitamini düzeyinin azaldığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Weijl ve diğ. 1997, Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011, White ve diğ. 2006).

Serbest radikaller hücrelerde özellikle yağ asitleri ve lipidler olmak üzere proteinlere de saldırarak çeşitli yapı ve biyomembran bozukluklarına sebep olmaktadır. Memeli spermatozoonunun lipid kompozisyonu somatik hücrelerden önemli derecede farklıdır. Sperm plazma membranı fosfolipidler, steroller, doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oldukça zengin olduğu için ROS hasarlarına karşı aşırı hassastırlar (Aitken ve Roman 2008, Tremellen 2008, Agarwal ve diğ. 2008, Sanocka ve Kurpisz 2004, Kothari ve diğ. 2010). Kemoterapötikler de lipid, kolesterol ve protein peroksidasyonu ile oksidatif strese yol açarak özellikle spermatogenik hücrelerde DNA hasarı, apoptozis, sperm kalitesinde düşüşler, infertilite ve hatta sterilite gibi yan etkilerin erkek üreme sisteminde meydana gelmesine neden olmaktadır (Ateşşahin ve diğ. 2006a, 2006b, 2006c).

Antikanser ilaçların bulunması ve sürekli yeni ilaçların geliştirilmesi şüphesiz kanser hastalarının yaşam süresinin uzamasındaki en etkili faktörlerden biridir. Bununla birlikte bu ajanların üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler erkeklerin cinsel ve fertil yaşam kalitesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bu konuyla ilgili kanserli erkekler ve sağlıklı deney hayvanlarında yapılan sayısız bilimsel çalışmanın sonuçları, özellikle genç erkeklerin gelecekteki fertilite potansiyellerinin ciddi bir tehlike içerisinde olduğunu ne yazık ki çok açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemindeki yan etkilerinin önlenmesine yönelik çeşitli hormon ve antioksidan uygulamalar ile sperma, germ hücre ve testis dokusunun dondurularak saklanması gibi yaklaşımlar deney hayvanlarında başarılı sonuçlar vermektedir (Türk 2013).

Her ne kadar kemoterapi uygulanacak hastalarda tedavi öncesi sperm dondurularak önlem alınmaya çalışılsa da, bu hem sosyo-ekonomik yönden hastaya sıkıntı yaratmakta hem de alınan sperm örnekleri belirli bir süre dahilinde saklanabilmektedir. Ayrıca bu imkana sahip olmayan sağlık kuruluşları da dikkate alındığında hastanın mevcut fertilitésinin korunması ya da tedavi sonrası geri kazandırılmasında yardımcı olunması daha büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle BEP rejimi uygulanan hastalarda testis ve sperm parametrelerinde oluşacak olumsuz etkileri Melatonin uygulayarak azaltabilmek ya da yok edebilmek fertilite açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Çalışmalarda Melatonin'in serbest radikaller üzerine dolaylı etkileri olduğu gösterilmiştir. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O<sub>2</sub> - radikalini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek de antioksidan etki göstermektedir (Reiter ve diğ. 2009).

Çalışmamızda deney başlangıcındaki vücut ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmayan gruplardaki deney sonu vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde, kontrol grubu olan salin grubu ile Melatonin'in çözücü kontrolü olan etanol+salin grubu, BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplar, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında vücut ağırlığında görülen azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda vücut ağırlığı açısından anlamlı azalış görülürken, tedavi grupları olan BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda bu durumun görülmemesi ve kontrole yakın değerlere sahip olması, bu etkinin Melatonin kaynaklı olduğunu göstermektedir. Narayana ve arkadaşları, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştırmışlar ve deney sonunda BEP uygulanan grupta vücut ağırlığında azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun vücut ağırlığında kontrole yakın bir değer görülürken, bizim çalışmamızda 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) vücut ağırlığında artış olmasına rağmen istatistiksel olarak kontrol grubuna göre hala anlamlı bir fark bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmada BEP+AK uygulanan tedavi gruplarında 9 haftalık iyileşme sonucunda vücut ağırlığının kontrol grubuna yakın bir değer göstermesi bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).

Grupların sol testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, en yüksek sol testis ağırlığı BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta görülürken; en düşük sol testis ağırlığı ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile Melatonin'in çözücü kontrolü olan etanol+salin grubu, BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grup arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda, diğer gruplara göre sol testis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış söz konusudur. Bu gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta sadece BEP uygulanan gruba göre sol testis ağırlığında artış görülmektedir. Ancak bu artış kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda sol testis ağırlığı açısından anlamlı azalış görülürken, tedavi grupları olan BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda bu durumun görülmemesi ve kontrole yakın değerlere sahip olması, bu etkinin Melatonin kaynaklı olduğunu göstermektedir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında BEP uygulanan grupta %67 oranında testis ağırlığında azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada BEP+AK grubunda da %69 oranında testis ağırlığında azalma tespit edilirken bizim çalışmamızda BEP+Melatonin grubunda kontrol grubuna göre testis ağırlığında %26 oranında bir azalma görülmüştür ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) testis ağırlığında kontrole yakın bir değer görülürken, bizim çalışmamızda 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) testis ağırlığında artış olmasına rağmen istatistiksel olarak kontrol grubuna göre hala anlamlı bir fark bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmada, BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda testis ağırlığının kontrol grubuna yakın bir değer göstermesi, bizim BEP ve Melatonin uyguladığımız tedavi grubunun (BEP+Melatonin+Recovery) bulgularını destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).

Grupların epididimis ağırlıkları değerlendirildiğinde, en yüksek epididimis ağırlığı BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta görülürken; en düşük epididimis ağırlığı ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile Melatonin'in çözücü kontrolü olan etanol+salin grubu, BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda, diğer gruplara göre epididimis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış söz konusudur. Bu gruplar kendi aralarında

karşılaştırıldığında, BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta sadece BEP uygulanan gruba göre epididimis ağırlığında artış görülmektedir. Ancak bu artış kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda epididimis ağırlığı açısından anlamlı azalış görülürken, tedavi grupları olan BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda bu durumun görülmemesi ve kontrole yakın değerlere sahip olması, bu etkinin Melatonin kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Grupların epididimal sperm sayıları değerlendirildiğinde, en yüksek epididimal sperm sayısı BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta görülürken; en düşük epididimal sperm sayısı ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile Melatonin'in çözücü kontrolü olan etanol+salin grubu, BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda, diğer gruplara göre epididimal sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış söz konusudur. Bu gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta sadece BEP uygulanan gruba göre epididimal sperm sayısında artış görülmektedir. Ancak bu artış kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda epididimal sperm sayısı açısından anlamlı azalış görülürken, tedavi grupları olan BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda bu durumun görülmemesi ve kontrole yakın değerlere sahip olması, bu etkinin Melatonin kaynaklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta BEP + Melatonin uygulanan gruba göre epididimal sperm sayısında istatistiksel olarak artış görülmektedir. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında, BEP uygulanan grupta %90 oranında epididimal sperm sayısında azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada BEP+AK grubunda da %76 oranında epididimal sperm sayısında azalma tespit edilirken bizim çalışmamızda BEP+Melatonin grubunda

kontrol grubuna göre epididimal sperm sayısında %4 oranında bir azalma görülmüştür ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) epididimal sperm sayısında hala kontrole göre (%54-58 oranında) azalma tespit edilmiştir ve bu bulgu bizim çalışmamızla uyusmaktadır. Ayrıca bu çalışmada, BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda epididimal sperm sayısında hala kontrole göre (%54-58 oranında) azalma tespit edilirken, bizim BEP ve Melatonin uyguladığımız tedavi grubunda (BEP+Melatonin+Recovery) epididimal sperm sayısı kontrol grubuna yakın bir değerde bulunmuştur (Narayana ve diğ. 2013).

Grupların sperm motilitesi değerlendirildiğinde, en yüksek sperm motilitesi BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta görülürken; en düşük sperm motilitesi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile Melatonin'in çözücü kontrolü olan etanol+salin grubu, BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda, diğer gruplara göre sperm motilitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış söz konusudur. Bu gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta sadece BEP uygulanan gruba göre sperm motilitesinde artış görülmektedir. Ancak bu artış kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda sperm motilitesi açısından anlamlı azalış görülürken, tedavi grupları olan BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda bu durumun görülmemesi ve kontrole yakın değerlere sahip olması, bu etkinin Melatonin kaynaklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta BEP + Melatonin uygulanan gruba göre sperm motilitesinde istatistiksel olarak artış görülmektedir. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında, BEP uygulanan grupta sperm motilitesinde aşırı bir azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada tedavi grubu olan BEP+AK uygulanan grupta sperm motilitesinde %55 oranında azalma tespit edilirken bizim

çalışmamızda yaklaşık olarak %5 oranında bir azalma görülmüştür. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) sperm motilitesinde kontrole yakın bir sonuç elde edilirken bizim çalışmamızda kontrole göre %29 oranında azalma tespit edilmiştir ve kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada, BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda sperm motilitesi kontrol grubuna yakın bir değerde bulunmuştur. Bu sonuç da bizim BEP ve Melatonin uyguladığımız tedavi grubunda (BEP+Melatonin+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).

Toluidin blue ile boyanan spermlerin morfolojilerine bakıldığında; salin grubu, etanol+salin grubu, BEP+Melatonin uygulanan grup ve BEP+Melatonin+Recovery grubu sıçanların sperm morfolojileri normaldir ve bu gruplar arasında fark yoktur. Ancak BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda başsız (pin-head), küçük ve yuvarlak başlı, çift başlı, kuyuksuz, kısa kuyuklu, orta parça hasarı olan, kement benzeri (lasso-like) olan anomalili spermler görülmüştür. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında, BEP uygulanan grupta sperm morfolojisinde anomaliler tespit edilirken, tedavi grubu olan BEP+AK uygulanan grupta sperm morfoloji anomalilerinde ciddi bir azalma görülmüştür. Bu bulgular da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) sperm morfolojisinde birkaç sefalokaudal ayrılma görülmesine rağmen kontrole yakın bir sonuç elde edilirken bizim çalışmamızda bu sonuca göre sperm morfoloji anomalileri daha fazla görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada, BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda sperm morfolojisi kontrol grubuna yakın bir değerde bulunmuştur. Bu sonuç da bizim BEP ve Melatonin uyguladığımız tedavi grubunda (BEP+Melatonin+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).

Tüm gruplara ait sıçanların Hematoksilen-Eozin ve PAS boyamaları incelendiğinde, salin grubununa ait testis kesitlerinin normal histolojiye sahip oldukları görüldü. Seminifer tübül yapılarının normal olduğu saptanmıştır. Tüm spermatogenik seri hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlenmiştir. Spermatidlerin başının Sertoli hücresi sitoplazmasına gömülü bir şekilde olduğu ve kuyuklarının lümene doğru uzanmış biçimde yerleştikleri görülmüştür. Sertoli hücreleri de normal yapıda gözlemlenmiştir. Bu bulgular düzgün bir



spermatogenezis sürecinin varlığını göstermektedir. Tunika albuginea, bazal membran ve interstisyel alanda herhangi bir dejenerasyona rastlanmamıştır. Etanol+Salin uygulaması yapılan gruba ait testis dokuları histomorfolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna eş değer görünüm izlenmiştir. BEP uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, tübül duvarından ayrılan spermatogenik hücre serileri ve seminifer tübül lümeninde serbest hale gelen hücresel döküntüler birlikte izlenmiştir. Düzenli bir interstisyel alan ve seminifer tübül histolojisine rastlanmamıştır. Bazı seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi görülmüştür. Ayrıca bazal membran kalınlaşması, konjesyon, vakuolizasyon gözlenmiştir. Birçok nukleusun kaynaşmasıyla oluşmuş dev hücrelere sık olarak rastlanmıştır. Bazı tübüllerde bu dev hücrelerin lümene döküldüğü gözlenmiştir. BEP+Recovery uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, BEP grubuna benzer özellikler gözlenmiştir. Ancak dev hücrelere nadir olarak rastlanmıştır. BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery uygulanan grubun testis dokularında histomorfolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucu, Salin ve Etanol+Salin grubuna benzer şekilde normal testis dokusu yapısı gözlenmiştir.

Grupların seminifer tübül çapları değerlendirildiğinde, en fazla seminifer tübül çapı BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta görülürken; en az seminifer tübül çapı ise BEP grubunda gözlenmiştir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında BEP uygulanan grupta seminifer tübül çaplarında azalma tespit etmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışmamızı destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013). Kontrol grubu olan salin grubu ile Melatonin'in çözücü kontrolü olan etanol+salin grubu, BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda, diğer gruplara göre seminifer tübül çapında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış söz konusudur. Bu gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan grupta sadece BEP uygulanan gruba göre sperm motilitesinde artış görülmektedir. Ancak bu artış kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. BEP uygulanan ve BEP uygulan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda seminifer tübül çapı açısından anlamlı azalış görülürken, tedavi grupları olan BEP + Melatonin uygulanan grup ve BEP + Melatonin uygulanan + 9 haftalık iyileşme sürecine bırakılan gruplarda bu durumun

görülmemesi ve kontrole yakın değerlere sahip olması, bu etkinin Melatonin kaynaklı olduğunu göstermektedir.

PCNA, genomik DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirinde önemli rolü olan 36 kDa ağırlığında temel bir proteindir (Kelman ve Hurwitz 1998, Tsurimoto 1999). Hücre döngüsünün G1 fazında sentezlenmeye başlar, S fazında en yüksek seviyesine ulaşır ve DNA polimeraz  $\sigma$ 'ya yardımcı (ko-faktör) olarak işlev görür. G2 evresinde ekspresyonu azalmaya başlar, M fazında ve interfazda ise en düşük düzeye ulaşır (Bravo ve diğ. 1987, Kurki ve diğ. 1986). PCNA, spermatogenik hücre proliferasyonu için uygun bir işaretleyicidir. Oksidatif hücre hasarlarında kromatin-PCNA komplekslerinin oluşumunda aksaklıklar olduğuna dair bazı bulgular vardır (Balajee ve diğ. 1999).

Grupların Anti-PCNA immünreaktiviteyi incelendiğinde, Salin kontrol grubu, Etanol+salin kontrol grubu, BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait tüm hayvanların testislerindeki Anti-PCNA immünreaktivitesinin fazla olduğu görülmüştür. Anti-PCNA tutulumunun daha çok spermatogonyumlar ve spermatosit nukleuslarında olduğu dikkati çekmiştir. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda yer alan seminifer tübüllerdeki hücrelerin nukleuslarındaki immünohistokimyasal Anti-PCNA tutulumu daha az hücrede ve boyanma şiddeti de daha az olarak izlenmiştir. H-skor değerlerine göre; grupların Anti-PCNA immünreaktiviteyi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek Anti-PCNA immünreaktiviteyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük Anti-PCNA immünreaktiviteyi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Yani hücre proliferasyonu BEP+MEL+Recovery grubunda en yüksek seviyede bulunurken, BEP grubunda en düşük seviyede bulunmuştur. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ve BEP+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu karşılaştırıldığında ise, BEP+Melatonin+Recovery grubunda salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Anti-PCNA immünreaktivitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında Anti-PCNA immünreaktiviteyi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında azalmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında

karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre anti-PCNA immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir.

DMC1/ Lim15 proteini mayoz aşamasında rekombinasyona dayalı DNA sentezinde görev alan bir proteindir. Yapılan çalışmalar DMC1/ Lim15 proteinin sadece mayozda spesifik hücrelerde ifade edildiğini göstermiş ve DMC1/ Lim15 proteinin PCNA proteini ile mayoz aşamasında işbirliği yaptığını ortaya koymuştur. Bu iki proteinin ifadesi mayoz bölünme için kritik bir öneme sahiptir. Söz konusu genin ekspresyonunun varlığı ile testis dokusunda spermatogenik aktivite hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.

Grupların Anti-Dmc1/Lim15 immünreaktiveleri incelendiğinde, salin kontrol grubu, etanol+salin kontrol grubu, BEP+Melatonin grubu ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait tüm hayvanların testislerindeki Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinin fazla olduğu görülmüştür. Anti-Dmc1/Lim15 immünreaktivitesinin daha çok spermatogonyumlar ve spermatozoid nükleuslarında olduğu dikkati çekmiştir. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda yer alan seminifer tübüllerdeki hücrelerin nükleuslarındaki immünohistokimyasal Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi daha az hücrede ve boyanma şiddeti de daha az olarak izlenmiştir. H-skor değerlerine göre; grupların Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktiveleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi ise BEP grubunda görülmüştür. Yani spermatogenik aktivite BEP+MEL+Recovery grubunda en yüksek seviyede bulunurken, BEP grubunda en düşük seviyede bulunmuştur. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ve BEP+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu karşılaştırıldığında ise, BEP+Melatonin+Recovery grubunda salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında azalmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi

gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre Anti-Dmc1/ Lim15 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir.

CD71/ Transferrin Reseptör hücre içine demir alımını düzenleyen, çoğunluğu eritroblast kaynaklı, kemik iliğinden hemoglobinin sentezi için demir sağlayan, her biri 95 kDa iki eş polipeptid zincirinden oluşan 188 kDa bir transmembran glikoproteinidir. Hücre yüzeyindeki CD71/ Transferrin Reseptör konsantrasyonu hücrenin demir gereksinimini göstermektedir. Hücrenin metabolik gereksinimleri için hücre içindeki demir azaldığında hücre membranındaki CD71/ Transferrin Reseptör artar, hücre içinde demir fazla ise hücre membranındaki CD71/ Transferrin Reseptör azalır (Shih ve diğ. 1990, Uysal 2007).

Grupların Anti-CD71/Transferrin Reseptör immünreaktiviteyi incelendiğinde, salin kontrol grubu, etanol+salin kontrol grubu, BEP+Melatonin grubu ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait tüm hayvanların testislerindeki Anti-CD71/Transferrin Reseptör immünreaktivitesinin fazla olduğu görülmüştür. Anti-CD71/Transferrin Reseptör immünreaktivitesinin daha çok spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidlerin sitoplazmalarında olduğu dikkati çekmiştir. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda yer alan seminifer tübüllerdeki hücrelerin sitoplazmalarındaki Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi diğer gruplara göre çok daha az hücrede ve boyanma şiddeti de çok daha zayıf olarak izlenmiştir. H-skor değerlerine göre; grupların Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktiviteyi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ve BEP+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Salin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu karşılaştırıldığında ise, BEP+Melatonin+Recovery grubunda salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesinde anlamlı bir azalış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında Anti-CD71/ Transferrin Reseptör immünreaktivitesi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında azalmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden

kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre Anti-CD71/Transferrin Reseptör immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir.

Grupların TUNEL işaretlemelerini değerlendirdiğimizde, Salin kontrol grubu, Etanol+salin kontrol grubu, BEP+Melatonin grubu ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarına ait tüm hayvanların testislerindeki TUNEL pozitif hücreler çok az sayıda ve yoğunluğu da az şekilde görülürken; BEP ve BEP+Recovery grubunda TUNEL pozitif hücreler çok fazla sayıda ve yoğunluğu da artmış şekilde görülmektedir. Grupların Aİ'si karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek Aİ, BEP grubunda görülürken; en düşük Aİ ise BEP+Melatonin+Recovery grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu, BEP+Melatonin grubu ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer tüm gruplara göre Aİ'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında Aİ kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında artmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. BEP+Recovery grubundaki Aİ değeri, BEP grubuna göre daha düşük olarak bulunmuştur ancak diğer gruplara göre Aİ değeri hala yüksektir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin grubu ile BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında Aİ değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

TEM ile ultrastrüktürel inceleme bulgularında; salin grubuna ait testis kesitlerinin elektron mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübüller ve tübüller arasında bulunan Leydig hücreleri incelenmiştir. Farklı gelişim evrelerindeki germ hücreleri, bazal lamina, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin normal bir yapı sergiledikleri görülmüştür. Spermatogenezis sürecinin sürekliliğini koruduğu seminifer tübüllerde, spermatogonia hücrelerinin bazal lamina üzerinde düzenli olarak dizilmiş halde oldukları görülmüştür. Hücrelerde küre ya da

oval şekilli nukleus, birkaç mitokondriyon ve az miktarda endoplazmik retikulum gözlenmiştir. Seminifer tübül bazal laminası üzerinde yerleşim gösteren Sertoli hücrelerinde ökromatinden zengin büyük bir nukleus, belirgin bir nukleolus, sitoplazmasında mitokondriyon, lizozom, lipit damlacıkları ve vakuollerin varlığı belirlenmiştir. Yuvarlak spermatidlerde akrozomal veziküllerinin şekillendiği ve nuklear membranının kalınlaştığı, spermatid nukleusunun anterior kutubuna yayılmış halde akrozomal veziküllerin olduğu görülmüştür. Spermatogenezisin ileri aşamalarında spermilerin akrozom tarafından sarılmış uzun, elektron yoğun nukleus içeren normal bir başa sahip oldukları gözlenmiştir. Sperm hücre sınırlarının düzgün olduğu tespit edilmiştir. Olgun spermilerin kuyruk kısımlarının enine geçmiş kesitlerinde, sperm kuyruklarında normal bir aksonem yapısı görülmüştür. Seminifer tübüllerin lümenleri açık ve bol miktarda sperm içermekte idi. İnterstisyel alandaki damarların ve damarlara yakın yerleşim gösteren Leydig hücrelerinin normal görünümde oldukları gözlenmiştir. Leydig hücrelerinin eksantrik yerleşimli nukleus ve sitoplazmalarında mitokondriyon, elektron yoğun granüller, lipit damlacıkları ve düz endoplazmik retikulum içerdikleri gözlenmiştir. Etanol ve salin uygulanan sıçanların testislerinin ultrastrüktürel incelemelerinde salin grubu ile benzer bulgular görülmüştür. Buna rağmen salin grubu ile kıyaslandığında, bazal laminada yer yer kalınlaşma olduğu ve spermatogenik hücrelerin vakuol miktarında artış olduğu saptanmıştır. BEP uygulanan grubun testis dokuları incelendiğinde, çok miktarda seminifer tübülün germinal epitelindeki spermatogenik hücre sıralamasında bozukluk olduğu tespit edilmiştir. Bazal laminanın homojen yapısını kaybettiği, yer yer parçalanma gösterdiği ve belirgin kollajen birikimi sonucu kalınlaştığı ayırt edilmiştir. Sertoli ve spermatogonia hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı alanlar gözlenmiştir. Ayrıca Sertoli ve spermatogonia hücreleri arasında boşlukların olduğu görülmüştür. Sertoli hücrelerinde üçgen şekilli nukleus, belirgin elektron yoğun nukleolus, dejeneratif mitokondriyon, genişlemiş endoplazmik retikulum, çok miktarda sitoplazmik otofajik vakuoller ve lipit damlacıkları görülmüştür. Primer spermatosit ile yuvarlak spermatidlerin düzensiz sınırlara sahip olduğu ve hücreler arası boşlukların varlığı tespit edilmiştir. Yuvarlak spermatidlerde yuvarlaklaşmış nukleus, şişmiş ve dejenere olmuş mitokondriyon, genişlemiş endoplazmik retikulum, çok miktarda lipit damlacıkları ve artan vakuolizasyon gözlenmiştir. Spermatid ve spermatogenezisin ileri aşamalarındaki hücrelerin düzensiz hücre sınırlarına sahip oldukları görülmüştür. Olgun spermilerin kuyruk kısımlarının enine geçmiş kesitlerindeki aksonem yapılarında dejenerasyon olduğu ve 9+2 yapısında bozulma olduğu görülmüştür. İnterstisyel alandaki damarlarda parçalanma ve endotel yapısında dejenerasyon

saptanmıştır. Leydig hücrelerinde salin grubuna göre artan miktarda vakuolizasyon gözlenmiştir. BEP uygulandıktan sonra 9 haftalık iyileşme süresi verilen sıçanların (BEP+Recovery) testislerinin ultrastrüktürel incelemelerinde, bazal laminanın salin grubuna hatta BEP grubuna göre oldukça kalın olduğu ve kollajen birikmesinin arttığı saptanmıştır. Seminifer tübül yapılarında gözlenen hasarların BEP grubundakine benzer olduğu dikkati çekmiştir. Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların bazal laminadan ayrıldığı alanlar görülmüştür. Spermatogenik hücrelerde BEP grubuna kıyasla artan miktarda vakuolizasyon olduğu saptanmıştır. Spermilerin aksonem yapılarında oldukça fazla miktarda dejenerasyon olduğu, çoğunun 9+2 düzenlenme göstermediği ve akrozom yapılarının olmadığı gözlenmiştir. Lümeninde olgun spermilerin görülmemesi dikkati çekmiştir. BEP+Melatonin deney grubuna ait testis dokularının incelemesinde, bazal lamina ve seminifer tübül yapılarında BEP grubunda gözlenen hasarların neredeyse tamamen düzeldiği ve normale yakın görünümlü hale geldiği görülmüştür. Bazal laminanın salin grubundakine benzer kalınlığa sahip olduğu ve hücreler ile arasında açılmaların çok az olduğu görülmüştür. Spermatogenik hücrelerin, Sertoli hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin salin grubundakilere benzer görünüme sahip olduğu ve BEP grubuna kıyasla daha az vakuol içerdiği saptanmıştır. Spermatogenezisin normal olarak olaylandığı ve sperm üretiminin devam ettiği görülmüştür. Yuvarlak spermatidlerde akrozomal veziküllerin varlığı ve spermatid nükleusunun anterior kutbuna yayılmış halde düzenlenişleri dikkati çekmiştir. Spermin kuyruk kısmının enine kesitlerinde aksonem yapısının ve düzenlenişinin salin grubundakilere benzer olduğu gözlenmiştir. BEP grubundakiler ile kıyaslandığında, bu grupta görülen Leydig hücrelerinin daha fazla lipid damlacıkları içerdiği gözlenmiştir. BEP+Melatonin+Recovery grubuna ait testis dokularındaki seminifer tübül elemanlarının, bazal laminanın, interstisyel alandaki damar ve Leydig hücrelerinin ultrastrüktürel özelliklerinin BEP+Melatonin grubu ile benzerlik göstermesi dikkati çekmiştir ve salin grubuna göre önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Western blot bulgularında, PCNA/  $\beta$ -Aktin bantları oranlarına bakıldığında, en yüksek PCNA/  $\beta$ -Aktin oranı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük PCNA/  $\beta$ -Aktin oranı ise BEP grubunda gözlenmiştir. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının PCNA/  $\beta$ -Aktin oranı, salin grubuna yakın bir değerdedir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren

antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında BEP uygulanan grupta PCNA ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada 9 haftalık iyileşme süresi sonunda BEP uygulanan grupta (BEP+Recovery) PCNA ekspresyonu artarken bizim çalışmamızda bu artış kontrol grubuna göre anlamlı değildir. Ayrıca bu çalışmada BEP+AK uygulanan grupta PCNA ekspresyonu artmıştır ve bu bulgu bizim sonuçlarımızla uyumaktadır (Narayana ve diğ. 2013).

Western blot bulgularında, DMC1/  $\beta$ -Aktin bantları oranlarına bakıldığında, en yüksek DMC1/  $\beta$ -Aktin oranı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük DMC1/  $\beta$ -Aktin oranı ise BEP grubunda gözlenmiştir. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının DMC1/  $\beta$ -Aktin oranı, salin grubuna yakın bir değere sahiptir.

Western blot bulgularında, CD71/  $\beta$ -Aktin bantları oranlarına bakıldığında ise, en yüksek CD71/  $\beta$ -Aktin oranı BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük CD71/  $\beta$ -Aktin oranı ise BEP grubunda gözlenmiştir. BEP ve BEP+Recovery gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarının CD71/  $\beta$ -Aktin oranı, salin grubuna yakın bir değere sahiptir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında BEP uygulanan grupta CD71 ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada 9 haftalık iyileşme süresi sonunda BEP uygulanan grupta (BEP+Recovery) CD71 ekspresyonu artarken bizim çalışmamızda bu artış kontrol grubuna göre anlamlı değildir (Narayana ve diğ. 2013).

Grupların testis dokusu MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek testis dokusu MDA düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük testis dokusu MDA düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında, BEP+Melatonin grubu arasında ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu MDA düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında MDA düzeyi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında artmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici



etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Grupların serum MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, testis dokusu MDA düzeyleriyle aynı şekilde görülmüştür. Ancak serum MDA düzeyi BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre daha düşük çıkmıştır. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının serum MDA düzeyinde daha etkili olduğunu göstermektedir.

Grupların testis dokusu GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek testis dokusu GSH düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük testis dokusu GSH düzeyi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ve BEP+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP+Melatonin+Recovery grubunun testis dokusu GSH düzeyi salin grubuna göre daha fazla bulunmuştur. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında testis dokusu GSH düzeyi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında azalmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir.

Grupların serum GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, testis dokusu GSH düzeyleriyle aynı şekilde görülmüştür. Ancak serum GSH düzeyi, BEP+Melatonin+Recovery grubu ile salin kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir. Ayrıca kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında serum GSH düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Grupların testis dokusu SOD düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek testis dokusu SOD düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük testis dokusu SOD düzeyi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ve BEP+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP+Melatonin+Recovery grubunun testis dokusu SOD düzeyi salin grubuna göre daha fazla bulunmuştur. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu SOD düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında SOD düzeyi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında azalmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında testis dokusu SOD düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu SOD düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir.

Grupların serum SOD düzeyleri karşılaştırıldığında, testis dokusu SOD düzeyleriyle aynı şekilde görülmüştür.

Grupların testis dokusu TAS düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek testis dokusu TAS düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük testis dokusu TAS düzeyi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında ve BEP+Melatonin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP+Melatonin+Recovery grubunun testis dokusu TAS düzeyi salin grubuna göre daha fazla bulunmuştur. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu TAS düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında TAS düzeyi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında azalmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında testis dokusu TAS düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis SOD düzeyinde

istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu da Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde de kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermektedir.

Grupların serum TAS düzeyleri karşılaştırıldığında, testis dokusu TAS düzeyleriyle aynı şekilde görülmüştür.

Grupların testis dokusu TOS düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek testis dokusu MDA düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük testis dokusu TOS düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında, BEP+Melatonin grubu arasında ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre testis dokusu TOS düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında TOS düzeyi kontrol grubuna yakın çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında artmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre testis dokusu TOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Grupların serum TOS düzeyleri karşılaştırıldığında, testis dokusu TOS düzeyleriyle aynı şekilde görülmüştür.

Grupların plazma Testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek plazma Testosteron düzeyi BEP+MEL+Recovery grubunda görülürken; en düşük plazma Testosteron düzeyi ise BEP grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında, BEP+Melatonin grubu arasında ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre plazma Testosteron düzeylerinde anlamlı bir azalma söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında plazma Testosteron düzeyi kontrol grubuna yakın bir değerde çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında çok fazla artmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tedavi grupları kendi aralarında

karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre plazma Testosteron düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında, BEP uygulanan grupta %48 oranında plazma Testosteron düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir. Bu bulgu da bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada BEP+AK grubunda da %34 oranında plazma Testosteron düzeylerinde azalma tespit edilirken bizim çalışmamızda BEP+Melatonin grubunda kontrol grubuna göre plazma Testosteron düzeylerinde %6 oranında bir azalma görülmüştür ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) plazma Testosteron düzeylerinde kontrole yakın bir değer görülürken bizim çalışmamızda %44 oranında bir azalma mevcuttur. Ayrıca bu çalışmada, BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda plazma Testosteron düzeyleri kontrol grubuna yakın bir değerde bulunmuştur. Bu sonuç bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).

Grupların plazma FSH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek plazma FSH düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük plazma FSH düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında, BEP+Melatonin grubu arasında ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre plazma FSH düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında plazma FSH düzeyi kontrol grubuna yakın bir değerde çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında çok fazla artmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ancak bu fark kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre plazma FSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında, BEP uygulanan grupta plazma FSH

düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda plazma FSH düzeylerinde %211 oranında plazma FSH düzeylerinde artış görülmüştür. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) plazma FSH düzeylerinde kontrole göre %58 azalma görülürken, bizim çalışmamızda plazma FSH düzeylerinde iyileşme görülmesine rağmen hala %50 oranında bir artış söz konusudur. Ayrıca bu çalışmada, BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda plazma FSH düzeylerinde kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. Bu sonuç bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).

Grupların plazma LH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. En yüksek plazma LH düzeyi BEP grubunda görülürken; en düşük plazma LH düzeyi ise BEP+MEL+Recovery grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu olan salin grubu ile etanol+salin grubu arasında, BEP+Melatonin grubu arasında ve BEP+Melatonin+Recovery grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. BEP grubu ve BEP+Recovery grubunda diğer tüm gruplara göre plazma LH düzeylerinde anlamlı bir artış söz konusudur. Tedavi grupları olan BEP+Melatonin ve BEP+Melatonin+Recovery gruplarında plazma LH düzeyi kontrol grubuna yakın bir değerde çıkarken, sadece kemoterapötik ilaç alan BEP ve BEP+Recovery gruplarında çok fazla artmış olması, bu etkinin Melatonin'in iyileştirici etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Kemoterapötik ilaç aldıktan sonra iyileşme süreci geçiren BEP+Recovery grubu ile sadece kemoterapötik ilaç alan BEP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BEP+Melatonin+Recovery grubunda BEP+Melatonin grubuna göre plazma LH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Narayana ve arkadaşlarının, BEP rejiminin indüklediği testiküler disfonksiyon üzerine  $\alpha$ -tocopherol, L-askorbik asit, çinko ve selenyum içeren antioksidan kokteylinin (AK) etkisini araştıran çalışmalarında, BEP uygulanan grupta %250 oranında plazma LH düzeylerinde artış tespit etmişlerdir. Bu bulgu bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada BEP+AK grubunda %57 oranında plazma LH düzeylerinde artış tespit edilirken bizim çalışmamızda BEP+Melatonin grubunda kontrol grubuna göre plazma LH düzeylerinde yaklaşık %18 oranında bir artış görülmüştür ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada 9 haftalık iyileşme sonucunda BEP uygulanan grubun (BEP+Recovery) plazma LH düzeylerinde %60 oranında plazma LH düzeylerinde azalma tespit edilirken bizim çalışmamızda ise yaklaşık %79 oranında hala bir artış mevcuttur. Ayrıca bu çalışmada,

BEP ve AK uygulanan tedavi grubunda (BEP+AK+Recovery) 9 haftalık iyileşme sonucunda plazma LH düzeyleri kontrol grubuna yakın bir değerde bulunmuştur. Bu sonuç bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (Narayana ve diğ. 2013).



## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü regüle eden genlerde bozukluk sonucu oluşan kanser, dünyada en çok ölüme neden olan hastalıklardan birisidir. Kanser için günümüzde en yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi, immünoterapi ve kemoterapidir. Kemoterapötikler kanserli olmayan normal doku ve hücrelerde de çeşitli düzeylerde yan etkilere sahip olduğu için erkek infertilitesi hatta sterilitesi kemoterapötik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği olumsuz faktörlerden birisidir. Spermatogenezdeki aksaklıklar, sperm kalite parametrelerindeki bozukluklar, ejakülasyon bozukluğu, hipotalamus-hipofiz-gonad eksenindeki fonksiyon bozukluğu, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi olumsuz durumlar kemoterapötiklerin üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler arasında gösterilmektedir.

Kanserli insan ve hayvanlarda yapılan pek çok çalışmada hormon uygulamalarının, sperm ve testiküler doku kriyoprezervasyonunun, testiküler biyopsi aracılığıyla in vitro spermatogenezin, testis transplantasyonunun ve çeşitli antioksidan maddeleri ihtiva eden tamamlayıcı ve alternatif uygulamaların kemoterapiden önce ya da kemoterapi esnasında ilaçların erkek üreme sistemindeki yan etkilerinin azaltılması veya önlenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmaların pek çoğunda kemoterapötiklerin genellikle oksidatif stresle ilişkili veya ilişkisiz DNA hasarı oluşturma mekanizmasıyla erkek üreme sisteminde yan etkilere sebep olduğu, dolayısıyla da farklı yapıdaki birçok antioksidan maddenin koruyucu rollere sahip olduğu bildirilmektedir.

Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte spermatogenik hücrelerde doğrudan ve/ veya oksidatif stresle ilişkili olarak dolaylı meydana gelen kromatin ve DNA hasarı ile steroidogenesisteki aksaklıklar genellikle sorumlu tutulmaktadır. Kemoterapiyi de içerisine alan birçok durum erkek infertilitesinin etiolojisindeki en önemli faktörlerden biri olan oksidatif strese neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarla, çeşitli kategorideki sitostatik ajanların hem in vivo hem de in vitro olarak serbest radikal üretimine neden oldukları gösterilmiştir.

Antioksidanların, kemoterapi ile ilgili bazı toksik etkileri azaltabileceği ileri sürülmüştür. Birçok yayında antioksidanların kemoterapiye bağlı toksisite şiddetini ve sıklığını azalttığı bildirilmektedir. Antioksidanları tüketen ajanlarla tedavi edilen hastalarda, antioksidanların bu kaybı telafi üzere kullanılması mantıklı görülmekte ve bu hastalarda antioksidan takviyesinin gerekli ve yararlı olabileceği üzerinde durulmaktadır.

Melatonin'in endokrin ve sirkadiyen ritm üzerine bilinen etkilerinden başka son yıllarda yapılan çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak direkt serbest radikalleri yok edici antioksidan etkiye sahip bir ajan olarak da kullanılabilceğini ortaya koymaktadır. Hatta antioksidanlar içerisinde, melatoninin en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürüldüğünden, melatonine olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda BEP rejimi ileri derecede testiküler hasara yol açmıştır. 9 haftalık iyileşme sürecine bakıldığında hasarın geri dönüşümü istenen düzeyde gerçekleşmemiştir. Buna karşın hem Melatonin grubunda hem de Melatonin'in 9 haftalık iyileşme sürecinde alımına devam edildiği grupta, kemoterapötik olarak kullanılan BEP rejiminin oluşturmuş olduğu testiküler hasar büyük bir oranda yok edilmiştir. 9 haftalık iyileşme sürecinde Melatonin alan gupta daha belirgin bir iyileşme görülmüştür.

Bu bulgular doğrultusunda, BEP rejiminin testiste oluşturduğu oksidatif stres kaynaklı yapısal bozuklukları azaltmak için Melatonin alımının faydalı olduğu düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

Abraham AT, Zhou X ve Hecht SM. Metallobleomycinmediated cleavage of DNA not involving a threading-intercalation mechanism. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(22), 5167-75.

Agarwal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility, In: Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment, Editors: Popov I, Lewin G. Transworld Research Network, Kerala India, 2008, s. 195-218.

Agarwal A ve Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, 2010, 13(4): 217-225.

Ağras K. Embryology of Undescended Testis and Mechanisms of Testicular Descent. *Turk Urol Sem.* 2012, 3: 17-22.

Ahmed EA, Omar HM, Elghaffar SKh, Ragb SM, Nasser AY. The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(5):1115-21.

Aitken RJ ve Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*, 2008, 1(1):15-24.

Akbulut H ve Akbulut KG. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Ankara, 2005, s 23.

Akre O, Pettersson A, Richiard L. Risk of contralateral testicular cancer among men with unilaterally undescended testis: a meta analysis. *Int J Cancer*, 2009, 124(3): 687-9.

Aksoy E, Aktan TM, Duman S, Dursunoğlu D, Cüce G. Farklı semen parametrelerinde ışık mikroskobu düzeyinde spermatozoa morfolojisi ve nükleer kondansasyon değerlendirilmesi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 2009, 40(3), 111-7.

*Farklı Semen Parametrelerinde Işık Mikroskobu Düzeyinde Spermatozoa. Morfolojisi ve Nükleer Kondansasyon Değerlendirmesi.*

Akşit H ve Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Vet. Fak. Derg*, 2008, 19(1):55-63.

Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi). 1.Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2001.

Akyol H. Kemoterapinin Temel İlkeleri, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı. *Dokuz Eylül Ün. Onk. Ens*, 2004, 159-163.

Alpsoy A, Yasa S, Gündüz U. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68: 351-5.

Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl*, 2008, 10(2):291-7.

Anthony CT, Rosselli M ve Skinner MK. Actions of the Testicular Paracrine Factor (P-Mod-S) on Sertoli Cell Transferrin Secretion Throughout Pubertal Development. *Endocrinology*, 1991, 129 (1): 353-360.

Arıncı K ve Elhan A. Anatomi 1. Cilt. 3. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara, 2001.

Arnedos M, Vielh P, Soria JC, Andre F. The genetic complexity of common cancers and the promise of personalized medicine: is there any hope? *The Journal of Pathology*, 2014, 232(2):274-82.

- Arrebola DFA, Novoa AV, Fernandez LAR, Roche LD. Comparison of the sprague dawley rats response against cyclophosphamide and bleomycin in the head sperm morphology assay. *Ars Pharmaceut*, 2010, 51:155-62.
- Aschim EL, Haugen TB, Tretli S, Grotmol T. Subfertility among parents of men diagnosed with testicular cancer. *Int J Androl*, 2008. 31(6): 588-94.
- Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol*, 2006a, 21(1):42-7.
- Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res*, 2006b, 41(1):21-7.
- Ateşşahin A, Türk G, Karahan İ, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Bulmuş Ö. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril*, 2006c, 85(1):1216-22.
- Avcı B. Farklı Fiksasyon Protokolleri ile Sperm Kromatin Kondansasyon Anomalisinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2006, 32 (2): 55-9.
- Averette HE, Boike GM, Jarrell MA. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function and reproductive capacity. *CA Cancer J Clin*, 1990, 40(4):199-209.
- Azu OO, Duru FIO, Osinubi AA, Oremosu AA, Norohna CC, Okanlawon AO, Elesha SO. Long-term treatment with kigelia africana fruit extract ameliorates the testicular toxicity following cisplatin administration in male sprague-dawley rats. *J Med Plants Res*, 2011, 5(3):388-97.
- Azu OO, Duru FIO, Osinubi AA, Oremosu AA, Norohna CC, Elesha SO, Okanlawon AO. Histomorphometric effects of kigelia africana (bignoniaceae) fruit extract on the testis following short-term treatment with cisplatin in male sprague-dawley rats. *Mid East Fertil Soc J*, 2010, 15(3):200-8.
- Baade P, Carriere P ve Fritschi L. Trends in testicular germ cell cancer incidence in Australia. *Cancer Causes Control*, 2008. 19(10): 1043-9.
- Bahrami A, Ro JY ve Ayala AG. An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(8): 1267-80.
- Balajee AS, Dianova I, Bohr VA. Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27 (22): 4476-4482.
- Bancroft JD ve Stevens A. Theory and practice of histological techniques, (3rd ed). Churchill Livingstone, London, 1990, p. 133–134 & 188.
- Bender RP, Jablonksy MJ, Shadid M, Romaine I, Dunlap N, Anklin C, Osheroff, N. Substituents on Etoposide That Interact with Human Topoisomerase II $\alpha$  in the Binary Enzyme– Drug Complex: Contributions to Etoposide Binding and Activity. *Biochemistry*, 2008, 47(15), 4501-4509.
- Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguzturk H, Yılmaz F. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(1):207-13.
- Bloom W ve Fawcett DW. A textbook of histology. 12th Edition. Chapman&Hall, Newyork-London, 1994.
- Bokemeyer C, Schmoll HJ, van Rhee J, Kuczyk M, Schuppert F, Poliwoda H. Long-term gonadal toxicity after therapy for hodgkin's and non-hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*, 1994, 68:105-10.
- Bravo R, Frank R, Blundell Pa, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 1987, 326 (6112): 515-517.

- Brea-Calvo G, Rodríguez-Hernández A, Fernández-Ayala DJ, Navas P, SánchezAlcázar JA. Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(8), 1293-1302.
- Bromberg KD, Burgin AB, Osheroff N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II $\alpha$ . *J Biol Chem*, 2003, 278: 7406-12.
- Brooks SA, Hannah LB, Kinch C, Nash G, Kieda C. Altered cell surface glycosylation function in mechanisms of cancer cell metastasis. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 2009, 10 (1): 91-101.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine*, 1997, 336, 186-195.
- Buege JA ve Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1978; 52:302-10.
- Bullock J, Boyle J, Wang M. Fizyoloji. Hariri N (Çeviri Editörü). 2.Baskı. Saray Tıp Kitabevi, İzmir, 1994, s 375.
- Burden DA ve Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 1400 (1): 139-154.
- Burger A. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Sixth Edition, Volume 5: Chemotherapeutic Agents. Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. Chapter 1: Molecular Biology of Cancer. John Wiley & Sons, Inc, 2003, s 1-32.
- Burgu B ve Telli O. Embryology of Testis and Theories of Testicular Descent. *Turk Urol Sem.* 2010; 1: 47-51.
- Cabadak H. Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008, 9 (3): 51-61.
- Campbell HE. Incidence of malignant growth of the undescended testicle. *Arch Surg*, 1942, 44(2): 353-69.
- Campbell NA ve Reece JB. *Biyoloji*. Palme Yayıncılık, İstanbul, 2006, ISBN: 975-8982-85-0.
- Carlson BM. Pattern's Foundations of Embriyology (6th Edition). McGraw Hill Inc., New York, 1996, s 752.
- Carver BS ve Sheinfeld J. Germ cell tumors of the testis. *Ann Surg Oncol*, 2005, 12(11): 871-80.
- Cejas P. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control*, 2004, 15(7): 707-19.
- Chabner BA. Bleomycin in Harrison's Manual of Oncology. McGraw-Hill Companies Inc., New York, 2008.
- Chaganti RSK ve Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res*, 2000, 60(6), 1475-82.
- Chen J ve Stubbe J. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(2): 175-81.
- Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, St Clair DK. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Molecular Intervention*, 2007, 7(3), 147-156.
- Cheng CY. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, USA, 2008.
- Cigorraga SB, Chemes H ve Pellizzari E. Steroidogenic and morphogenic characteristics of human peritubular cells in culture. *Biology of reproduction*, 1994, 51(6), 1193-1205.
- Claussen CA ve Long EC. Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev.* 1999, 99(9): 2797-816.

- Clavel J. Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. *C R Biol.*, 2007, 330(4):306-17.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*, 1972, 52(1), 198-236.
- Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. *Hum Reprod*, 2007a, 22:1431-42.
- Codrington, AM, Hales, BF, Robaire B. Chronic cyclophosphamide exposure alters the profile of rat sperm nuclear matrix proteins. *Biol Reprod*, 2007b, 77:303-11.
- Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemoradiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004, 113(Suppl 1): 2-6.
- Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*, 2004, 3(4): 294-300.
- Corcoran JW, Hahn FE, Snell JF, Arora KL. Antibiotics III: Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents. Springer Berlin Heidelberg, 1975, s 21-33.
- Cort A, Ozdemir E, Timur M, Ozben T. Effects of curcumin on bleomycin induced oxidative stress in malignant testicular germ cell tumors. *Mol Med Rep*, 2012, 6(4): 860-6.
- Coşgun A ve Aras D. Anatomi-Histoloji-Embriyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1998.
- Crohns M, Liippo K, Erhola M, Kankaanranta H, Moilanen E, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P. Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clinical Biochemistry*, 2009, 42(12), 1236-1245.
- Cumhur M, Yener N, Tuncel M. Temel Anatomi, 1. baskı. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-METU Press, Ankara, 2001, s. 287-291.
- Curry RA ve Tempkin BB. Sonography: Introduction to Normal Structure and Function, Elsevier, Canada, 2016, s 531.
- Çiftçi O, Beytur A, Çakır O, Gürbüz N, Vardı N. Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platinum-n-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011,109(5):328-33.
- Dahl EV ve Herrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 1959, 108(6): 697.
- Dancey J ve Arbuck S. Cancer drugs and cancer drug development for the new millennium. In: Progress in Anti-cancer Chemotherapy. Editors: D Khayat, GN Hortobagyi, Springer, France, Berlin, Heidelberg, 2000, pp. 91-107.
- Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, 1999, 48(1): 41-7.
- Day RM, Suzuki YJ, Lum JM, White AC, Fanburg BL. Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(6): L1349-57.
- De Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Molecular and cellular endocrinology*, 2004, 225(1), 57-64.

- De Mas P, Daudin M, Vincent MC, Bourrouillou G, Calvas P, Mieusset R, Bujan L. Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Hum Reprod*, 2001,16:1204-8.
- Dearnaley DP, Huddart RA ve Horwich A. Managing Testicular Cancer. *BMJ: British Medical Journal*, 2001, 322(7302), 1583-88.
- Delbes G, Hales BF ve Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl*, 2007, 28(2), 241-49.
- Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. Veri Medikal Yayıncılık, Ankara, 2008.
- Demirci U, Benekli M, Büyükberber S, Coşkun U. Late side effects of cancer therapy. *Int J Hematol Oncol*, 2010, 26(3):250-61.
- di Pietro A, Vries EG, Gietema JA, Spierings DC, de Jong S. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(12), 2437-56.
- Dohle G. Male Infertility In Cancer Patients: Review Of The Literature. *International Journal Of Urology*, 2010, 17(4):327-31.
- Drake RL, Vog IW, Mitchell AWM. Gray's Anatomy. Çev. Yıldırım M, Güneş Kitabevi, İstanbul, 2007, s. 406.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82(1):70-7.
- Ehrlich Y, Yossepowitch O, Kedar D, Baniel J. Distribution of nodal metastases after chemotherapy in nonseminomatous testis cancer: a possible indication for limited dissection. *BJU Int*, 2006, 97(6): 1221-4.
- Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. Medipress Yayıncılık Tic. Ltd. Şti., Malatya, 2009: 254-258.
- Evan GI ve Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, 411(6835), 342-48.
- Exelby PR. Testicular cancer in children. *Cancer*, 1980, 45(7 Suppl): 1803-9.
- Facorro G, Sarrasague MM, Torti H, Hager A, Avalos JS, Foncuberta M, Kusminsky G. Oxidative study of patients with total body irradiation: effects of amifostine treatment. *Bone Marrow Transplantation*, 2004, 33(8):793-8.
- Fawcett DW. Bloom And Fawcett: Concise Histology. Chapman And Hall, Newyork, 1997.
- Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer*, 2001, 93 (4): 571-6.
- Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, O'sullivan B, Sobin LH, Yarbro JW. AJCC Cancer Staging Manual. Fifth edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1997, s 225-30.
- Fonkalsrud EW. Current management of the undescended testis. *J Pediatr Surg*, 1996; 5 (1):2-7.
- Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, 2008, 29(5), 560-580.
- Frazier AL, Weldon C ve Amatruda J. Fetal and neonatal germ cell tumors. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012. 17(4): 222-30.
- Freitas FEL, Mori FC, Cerri ES, Lucas SRR, Miraglia SM. Alterations in spermatogenesis in etoposide-treated rats: a stereological study. *Interciencia*, 2002, 27:227-35.
- Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics. *Nature*, 2001, 409(6822), 850-852.

Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyoloji Bilimler Derneği (Çev). 20.Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2002, s 415-418.

Gartner LP ve Hiatt JL. Color textbook of histology (3rd Edition). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2007.

Gerres L, Bramswig JH, Schlegel W, Jurgens H, Schellong G. The effects of etoposide on testicular function in boys treated for Hodgkin's disease. *Cancer*, 1998, 83:2217-22.

Gilligan T. Testis cancer: rare, but curable with prompt referral. *Cleve Clin J Med*, 2007, 74(11), 817-25.

Gobel U, Schneider DT, Calaminus G, Haas RJ, Schmidt P, Harms D. Germ cell tumors in childhood and adolescence. *Annals of Oncology*, 2000, 11(3): 263-72.

Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Mol Pharmacol*, 2001, 59(4): 657-63.

Gürsoy E ve Koptagel E. Embriyoloji atlası, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, 1997, s 222.

Hagiwara SI, Ishii Y ve Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(1): 225-31.

Hamada FN, Koshiyama A, Namekawa SH, Ishii S, Iwabata K, Sugawara H, Nara TY, Sagaguchi K, Sawado T. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacts with a meiosis-specific RecA homologues, Lim15/Dmc1, but does not stimulate its strand transfer activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 352(4), 836-842.

Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 1998, 34 (10): 1514-21.

Hansen PV ve Sorensen D. Effect of vincristine or bleomycin on radiation-induced cell killing of mice spermatogonial stem cells: the importance of sequence and time interval. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1991, 20(2):339-41.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1993, 17(3), 347-357.

Harrison RG. Effect of temperature on the mammalian testis. Handbook of physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. 5, 1975, s 219-223.

Hassa H. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. ESOGÜ Basımevi, Eskişehir, 2003.

Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 1972, 48(2), s 422-27.

Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE. NMS Histology (1st Edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1997.

Herbst KL ve Bhasin S. Testosterone action on skeletal muscle. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2004. 7(3): p. 271-277.

Holzik MFL, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol*, 2004, 5(6), 363-71.

Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. Manual of Clinical Oncology. 5th edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1990.

<http://bilimderyasi.com/wp-content/uploads/2017/01/Resim19.jpg>

[http://en.shram.kiev.ua/health/anatomy/page\\_2106.shtml](http://en.shram.kiev.ua/health/anatomy/page_2106.shtml)

<https://exploreable.wordpress.com/2011/04/20/an-introduction-to-the-cell-cycle/>

Huddart RA, Norman A, Moynihan C, Horwich A, Parker C, Nicholls E, Dearnaley DP. Fertility, gonadal and sexual function in survivors of testicular cancer. *British J Cancer*, 2005, 93(2), 200-7.

Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev*. 1997; 18:259-80.

Hutson JM, Hasthorpe S. Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. *J Pediatr Surg*. 2005; 40:297- 302.

Huyghe E, Plante P ve Thonneau PF. Testicular cancer variations in time and space in Europe. *Eur Urol*, 2007, 51(3): 621-8.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Bleomycins (sulphates and hydrochlorides). Lyon, France, 1981, volume 26, 97–113.

Irkilata HC ve Alp BF. Etiology, Epidemiology and Classification of Undescended Testis. *Turk Urol Sem*. 2012; 3: 23-30.

Ishikawa T, Kamidono S, Fujisawa M. Fertility after high-dose chemotherapy for testicular cancer. *Urology*, 2004, 63(1):137-40.

İlbey YÖ, Özbek E, Şimşek A, Ötünçtemur A, Çekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril*, 2009a, 92(3):1124-32.

İlbey YÖ, Özbek E, Çekmen M, Şimşek A, Ötünçtemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod*, 2009b, 24:1717-25.

İlbey YÖ, Özbek E, Şimşek A, Çekmen M, Ötünçtemur A, Somay A. Chemoprotective effect of a nuclear factor-kB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate, against cisplatininduced testicular damage in rats. *J Androl*, 2009c, 30:505-14.

İlhan F. Evcil Hayvanlarda Testis Dejenerasyonları. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 2003, 14 (2):51-56.

Jones RH ve Vasey PA. Part I: testicular cancer—management of early disease. *Lancet Oncol*, 2003, 4(12): 730-7.

Jones WG. Tumors of the testis: aetiology, epidemiology in animal models. *Testicular Cancer and Other Tumors of the Genitourinary Tract*, Springer US, 1985, 18(7): 41-54.

Junqueira LC ve Carneiro J. Temel Histoloji. Çev.: Aytakin Y ve Solakoğlu S, 10. Baskıdan Çeviri. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2009.

Kadioğlu A, Baflar M, Semerci B, Orhan I, Aşçı R, Yaman MÖ. Erkek ve kadın cinsel sağlığı. *Türk Androloji Derneği*, İstanbul, 2004, s 652-63.

Kalaycı Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1986.

Kanter M, Topçu Y, Uygun M. Cisplatin Nefrotoksisitesinde E Vitamininin Koruyucu Etkileri: Işık Ve Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2007, 5 (3): 83-90.

Kaplan E ve Gündüz U. Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF-7 cells at different levels of etoposide resistance. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66 (1): 29-35.

- Karbownik M ve Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 2000, 225, 9-22.
- Kastan MB ve Bartek J. Cell-cycle check points and cancer. *Nature*, 2004, 432(7015), 316-23.
- Katzung BG, Masters SB ve Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. 12th edition. Chu E ve Sartorelli AC. Capter 54: Cancer Chemotherapy. McGraw-Hill Companies Inc., New York, 2012, s 949-74.
- Kawai K, Hinotsu S, Oikawa T, Sekido N, Hattori K, Miyanaga N, Hasegawa Y, Kojima H, Shimazui T, Akaza H. Treatment outcome of metastatic testicular cancer at a single institution in Japan, a country with low incidence of germ cell tumor. *Jpn J Clin Oncol*, 2006, 36(11), 723-30.
- Keleşoğlu M. Testosteron Eksikliğinde Lipoprotein İlişkili Fosfolipaz A2'nin Kardiyovasküler Risk Faktörleriyle İlişkisi. Tıpta Uzmanlık Eğitimi Tezi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2014.
- Kelman Z ve Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci*, 1998, 23 (7): 236-238.
- Kessinger A ve Wigton RS. Intracavitary bleomycin and tetracycline in the management of malignant pleural effusions: a randomized study. *J Surg Oncol*, 1987, 36(2): 81-3.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Çev.: Demir R. Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
- Kilic S, Lortlar N, Bardakci Y, Ozdemir E, Yuksel B, Ozturk U, Budak G, Dogan M. Caspase-3 and VEGF immunopositivity in seminiferous tubule germ cells in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia in smokers versus non-smokers. *J Assist Reprod Genet*, 2009, 26(1): 57-63.
- Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Kim SH, Moon SY, Choi YM. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 2013, 40(1), 23-28.
- Klug WS ve Cummings MR. Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Çeviri editörü: Öner C. Palme yayıncılık, Ankara, 2002, s 635-651.
- Kong Q, Beel JA ve Lillehei KO. A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses*, 2000, 55(1): 29-35.
- Kopnin BP. Targets of onkogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *BIOCHEMISTRY C/C OF BİOKHİMİİA*, 2000, 65(1), 2-27.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*, 2010, 48:425-35.
- Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H, De Meyst ER. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 288(1-2): 111-8.
- Krstic RV. Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology, Springer-Verlag, Heidelberg, 1994, s 342.
- Kumanov P ve Agarwal A. Puberty: Physiology and Abnormalities, Springer International Publishing, Switzerland, 2016.
- Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*, 1986, 166 (1): 209-219.



- Küçükşayan E. Testis Kanseri Hücre Dizilerinde N-Asetilsisteinin Bleomisin sitotoksitesisi üzerine etkileri. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 2011.
- Küçüksu MN ve Ruacan ŞA. Klinik Onkoloji. Hacettepe Üni. Tıp Fak. Türk. Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara, 1978.
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227:680-5.
- Lanzkowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Fifth Edition. Elsevier, London, 2011, s 645-60.
- Larsen WJ. Human Embryology (3rd Edition). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2003.
- Li FP ve Fraumeni JF. Testicular cancers in children: epidemiological characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 1972, 48(6): 1575-81.
- Li JY, Yin HZ, Gu X, Zhou Y, Zhang WH, Qin YM. Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats, *World Journal of Gastroenterology*. 14(48), 2008, 7392-7396.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Axel Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 2000, 343(2): 78-85.
- Loehrer PJ ve Einhorn LH. Cisplatin. *Annals of Internal Medicine*, 1984,100(5):704-13.
- Looijenga LH, Gillis AJM, Stoop H, Biermann K, Oosterhuis JW. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *Int J Androl*, 2011. 34(4pt2): e234-51.
- Maekawa M, Kamimura K ve Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*, 1996; 59(1): 1-13.
- Marchetti F, Pearson FS, Bishop JB, Wyrobek AJ. Etoposide induces chromosomal abnormalities in mouse spermatocytes and stem cell spermatogonia. *Hum Reprod*, 2006, 21:888-95.
- Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Summers N. Analysis of sperm chromosome complements before, during, and after chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999, 108(2):133-6.
- Mates JM ve Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(2): p. 157-70.
- Matin A ve Nadeau JH. Search for testicular cancer gene hits dead-end. *Cell Cycle*, 2005, 4(9): 1136-8.
- McIver SC, Roman SD, Nixon B, Loveland KL, McLaughlin EA. The rise of testicular germ cell tumours: the search for causes, risk factors and novel therapeutic targets. *F1000Research*, 2013, 2: 55.
- Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer*, 2009, 53(2):261-6.
- Meistrich ML. Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. *Acta Paediatr Suppl*, 1999, 88(s433):19-22.
- Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Alcalde RE, Matsumura T. The role of caspase family protease, caspase-3 on cisplatin-induced apoptosis in cisplatin-resistant A431 cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, 46(3):241-5.
- Millan-Plano S, Piedrafita E, Miana-Mena FJ, Fuentes-Broto L, Martinez-Ballarín E, Lopez-Pingarrón L, Saenz MA, Garcia JJ. Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11, 312-328.

- Misell LM, Holochwost D, Boban D, Santi N, Shefi S, Hellerstein MK, Turek PJ. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *The Journal of urology*, 2006, 175(1), 242-246.
- Mizutani Y, Nakamura T, Nomoto T, Kawauchi A, Miki T. Progress in therapy for testicular tumors. *Gan to Kagaku Ryoho Cancer & Chemotherapy*, 2006, 33(2), 183-7.
- Moeller A, Ask K, Warburton D, Gaudie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 362-82.
- Morgan DO. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press, London, 2007.
- Moore KL ve Persaud TVN. *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri, Biz Doğmadan Önce*. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007. Çev. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009, s 175-178.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2016, s. 260- 278.
- Moore KL ve Dalley AF. *Kliniğe yönelik anatomi*, 4. Baskı. Çev. Şahinoğlu K, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2007.
- Moore KL ve Agur AML. *Temel Klinik Anatomi*. Çev. Elhan A, 2. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara, 2006.
- Narayana K, Alyaa MM, Maie MA, Khan KM. Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. *Fertil Steril.*, 2013, 100(4):1151-9.
- 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: 207–16.
- Narayana K. Cisplatin induces duplex 3' overhangs and 5' blunt ends in epididymal epithelium in a Bax-dependent manner without any protection from l-ascorbic acid. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 641(2): 238-45.
- Narayana K, Verghese S, Jacob SS. L-Ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy-induced testis damage and oligo-astheno-teratospermia in a mouse model. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2009, 61:553–63.
- Neill JD. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Volume 1, 3rd Edition. Elsevier Academic Press Publications, United States of America, 2006.
- Nieschlag E ve Behre HM. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 2nd Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Newyork, 2001.
- Noyan A. *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. 15. Baskı. Meteksan, Ankara, 2005.
- Nozaki Y, Furubo E, Matsuno T, Fukui R, Kizawa K, Kozaki T, Sanzen T. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 6) Two-or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *J toxicol Sci*, 2009, 34(Special): sp73-sp81.
- Oktay K, Meirrow D. Planning for fertility preservation before cancer treatment. *Sex Reprod. Menop.*, 2007, 5(1):17-22.
- Olah E. *Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination*. The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine, 2005, 16(2).
- Olgun N ve Şimşek H. Kemoterapi Hazırlayan ve Uygulayan Hemşirelerin Güvenlik Önlemlerini Kullanma Durumları ve Önlem Almalarını Etkileyen Faktörler. *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 2010, 17(2), 13–23.

Orhan İ. Erkek Üreme Fizyolojisi. Türk Üroloji Yeterlilik Kurulları Sınav Hazırlık Kitabı, Kongre Basımevi, İstanbul, 2006, s 250-252.

Ovalle WK ve Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri editörleri), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009.

Ozan H. Ozan Anatomi. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2004, s. 304-309.

Ozgul S, Kasap M, Akpınar G, Kanli A, Guzel N, Karaosmanoglu K, Baykal AT, Iseri P. Linking a compound-heterozygous Parkin mutant (Q311R and A371T) to Parkinson's disease by using proteomic and molecular approaches. *Neurochemistry International*, 2015, 85-86, 1-13.

Özalp Dural EA. Farmakoloji. 4. Baskı. Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, 2008.

Paduch DA. Testicular cancer and male infertility. *Curr Opin Urol*, 2006, 16(6): 419-27.

Page CP, Curtis MJ, Walker MJA, Hoffman BB. Integrated Pharmacology. 3th edition. Elsevier Mosby Inc., Philadelphia, 2006, 174-175.

Page R ve Takimoto C. Principles of chemotherapy. In: Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology. Editors: R Pazdur, LR Coia, WJ Hoskins, LD Wagman. PRR, New York, 2004, pp. 21-38.

Palo AK, Sahu P, Choudhury RC. Etoposide-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its potential transmission. *J Appl Toxicol*, 2005, 25:94-100.

Patton H. Textbook of physiology. Nobel yayınları, İstanbul, 1989.

Pelicano H, Carney D ve Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*, 2004, 7(2): 97-110.

Petersen PM, Giwercman A, Skakkebaek NE, Rorth M. Gonadal function in men with testicular cancer. *Semin Oncol*, 1998, 25(2):224-33.

Pil P ve Lippard S. Cisplatin and Related Drugs. *Encyclopedia of Cancer*, 1997, 1: 392-410.

Pizzo PA ve Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 4th Edition. Section editors: Cushing B, Perlman E, Marina N, Castleberry RP. Germ Cell Tumors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002, s 1116-39.

Ragheb AM ve Sabanegh E.S. Male Fertility-Implications of Anticancer Treatment and Strategies to Mitigate Gonadotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2010, 10: 92-102.

Rabik CA ve Dolan ME. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(1): 9-23.

Reddy YVK, Reddy PS, Shivalingam MR, Devi BS, Pravallika G, Anusha DN. Carboplatin-mediated changes in the activity levels of steroidogenic marker enzymes, serum hormones and testicular architecture in male rats. *Drug Invent Today*, 2010a, 2(1):42-8.

Reddy YVK, Reddy PS, Shivalingam MR. Testosterone mediated partial recovery of carboplatin induced reproductive toxicity in male wistar rats. *J Biomed Sci Res*, 2010b, 2:46-53.

Reiter RJ, Tangl L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sciences*, 1997, 60(25), 2255-2271.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 2003, 50(4), 1129-1146.

- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, Volume 44, Issue 4, pages 175-200.
- Richiardi L, Pettersson A ve Akre O. Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. *Int J Androl*, 2007, 30(4): 230-41.
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Reichman M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004. *National Cancer Institute*, 2007; 125-37.
- Rohen JW, Yokochi C, Lütjen-Drecoll E. Color Atlas of Anatomy, A Photographic Study of the Human Body. 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011, s 340-41.
- Ross MH ve Pawlina W. Histology- A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology (5th Edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006.
- Ruddon RW. Cancer Biology. Fourth Edition. Oxford University Press, New York, 2007.
- Rukstalis DB. Molecular mechanisms of testicular carcinogenesis. *World J Urol*, 1996, 14(5), 347-52.
- Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2011, 31(2): 137-50.
- Sadler TW. Langman's Medical Embryology (12th Edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012.
- Sakamoto H, Oohta M, Inoue K, Fuji K, Fukagai T, Yoshida H. Testicular sperm extraction in patients with persistent azoospermia after chemotherapy for testicular germ cell tumor. *Int J Urol*, 2007, 14(2):167-70.
- Sancak B ve Cumhuri M. Fonksiyonel anatomi baş-boyun ve iç organlar. 2. Baskı. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-METU Press, Ankara, 2002.
- Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suryaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, 8(1), 15-19.
- Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2(1):12.
- Sari I, Cetin A, Kaynar L, Saraymen R, Hacıoğlu SK, Oztürk A, Kocyigit I, Altuntas F, Eser B. Disturbance of pro-oxidative/antioxidative balance in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 2008, 38(2): 120-25.
- Sastry J ve Kellie SJ. Severe Neurotoxicity, Ototoxicity And Nephrotoxicity Following High-Dose Cisplatin And Amifostine. *Pediatric Hematology and Oncology*, 2005, 22(5): 441-5.
- Sausville EA, Stein RW, Peisach J, Horwitz SB. Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II). *Biochemistry*, 1978, 17(14), 2746-54.
- Sawyers CL, Abate-Shen C, Anderson KC, Barker A, Baselga J, Berger NA, Foti M, Jemal A, Lawrence TS, Li CI, Mardis ER, Neumann PJ, Pardoll DM, Prendergast GC, Reed JC, Weiner GJ. AACR Cancer Progress Report 2013. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20 Suppl): s 4-98.
- Schneider E, Horton JK, Yang C, Nakagawa M, Cowan KH. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF-7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res*, 1994, 54: 152-158.
- Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic, basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol*, 2001, 15:611-7.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th Edition. McGraw-Hill, New York, 2001, s 613-74.

Seaman F, Sawhney P, Giammona CJ, Richburg JH. Cisplatin-induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. *Apoptosis*, 2003, 8(1), 101-8.

Seçkin İ, Ertürkoğlu AŞ, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. Embriyoloji Ders Kitabı (Birinci Baskı). İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi, İstanbul, 2008, s 229-233.

Shabbir M ve Morgan RJ. Testicular cancer. *J R Soc Promot Health*, 2004, 124(5): 217-8.

Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue reseptor. *J Biol Chem*, 1990, 265(31): 19077-81.

Short RV. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatrica* 86. s 422, 1997: 3-7.

Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtaş A. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology*, 2009, 74(3):545-51.

Simon C ve Pellicer A. Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential. Informa healthcare, UK, 2007.

Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 2007a, 13(1), 22-28.

Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 2007b, 13(2), 40-47.

Sipahioğlu H. Onkoloji medikal onkolojide tedavi prensipleri ve protokoller. Hacettepe-TAŞ Kitapçılık, Ankara,1981, s 1034-37.

Skakkebaek NE, De Meyst ER, Jørgensen N, Main KM, Leffers H, Andersson AM, Juul A, Jensen TK, Toppari J. Testicular cancer trends as 'whistle blowers' of testicular developmental problems in populations. *Int J Androl*, 2007, 30(4): 198-205.

Skinner MK ve Fritz IB. Identification of a non-mitogenic paracrine factor involved in mesenchymal-epithelial cell interactions between testicular peritubular cells and Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1986 Jan;44(1):85-97.

Sleijfer S. Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest Journal*, 2001, 120(2): 617-24.

Snell RS. Structures of the Anterior Abdominal Wall: Scrotum, Testis, and Epididymides. *Clinical Anatomy for Medical Students*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, s. 153-157.

Snell RS. Klinik anatomi. Çev. Yıldırım M. 6.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004, s. 236.

Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, Ruban L, Harrison NJ, Schwager C, Abdollahi A, Huber PE, Brunak S, Gjerdrum LM, Moore HD, Andrews PW, Skakkabek NE, De Meyts ER, Leffers H. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5241-50.

Spermon JR, Ramos L, Wetzels AM, Sweep CG, Braat DD, Kiemeney LA, Witjes JA. Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod*, 2006, 21(7): 1781-6.

Stewart BW ve Kleihues P. World cancer report. *IARC Press, Quetigny, France*, 2003.

Sternberg SS. Histology for pathologist. Lippincott-Raven, New York. 1997.

- Stumpp T, Sasso-Cerri E, Freymüller E, Miraglia SM. Apoptosis and testicular alterations in albino rats treated with etoposide during the prepubertal phase. *Anat. Rec. A*, 2004, 279(A):611-2.
- Sugiyama M, Kumagai T, Hayashida M, Maruyama M, Matoba Y. The 1.6-Å crystal structure of the copper (II)-bound bleomycin complexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*. *J Biol Chem*, 2002, 277(3): 2311-20.
- Sun Y, Oberley LW ve Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988, 34(3): 497-500.
- Szak G, Kin K, To W, Polg O, Robery RW, Bates SE. Multidrug resistance mediated by MDR-ABC transporters. *Springer*, 2009, p. 1–20.
- Şahintürk V ve Erçakır M. Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvar Kılavuzu. Osmangazi Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 1999.
- Şahintürk V, Güçlü C, Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian journal of andrology*, 2007, 9(1), 117.
- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi (3. Baskı). Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1998.
- Tanno M, Taguchi T. Proliferating cell nuclear antigen in normal and regenerating rat livers. *Exp Mol Pathol*, 1999, 67(3): 192-200.
- Tansuğ MZ. Metastatik Nonseminomatöz Testis Tümörlerinde Güncel Tedavi Prensipleri. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci*, 2005, 1(9): 77-83.
- Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieuisset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Human reproduction*, 1998, 13(8): 2122-2125.
- Tok OE. Cep Telefonlarının Yayıdığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Testis Gelişimi, Hücre Ölümü ve Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkileri: İnfertilite Açısından Değerlendirme. Yüksek Lisans tezi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update*, 2008, 14(3):243-58.
- Tsurimoto T. PCNA binding proteins. *Front Biosci*, 1999, 4: D849-D858.
- Tufekci O, Gunes D, Ozogul C, Kolatan E, Altun Z, Yılmaz O, Aktas S, Erbayraktar Z, Kırkım G, Mutafoglu K, Soylu A, Serbetcioglu B, Guneri EA, Olgun N. Evaluation of the Effect of Acetyl L -Carnitine on Experimental Cisplatin Nephrotoxicity. *Chemotherapy*, 2009, 55(6): 451–9.
- Tunçdemir M ve Öztürk M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. *J Mol Histol*, 2008, 39(6): 605-16.
- Tung PS, Skinner MK ve Fritz IB. Cooperativity between Sertoli cells and peritubular myoid cells in the formation of the basal lamina in the seminiferous tubule. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1984, 438(1), 435-446.
- Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2013, 17: 73-92.
- Türk G, Çeribaşı AO, Şahna E, Ateşşahin A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. *Phytomedicine*, 2011, 18(5):356-61.
- Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril*, 2008, 89(5):1474-81.

- Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *FÜ Sağlık Bil. Vet. Derg.*, 2006, 20:85-95.
- Uysal Z. Hepsidin ve demir metabolizması. 6.Hematoloji ilk basamak kursu eğitim kitabı, Ulusal Hematoloji Kongresi; 16-19 Ekim Ankara, 2007: 14-20; 33.
- Vahaboğlu H. Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacology Special Topics*, 2004, 2(2): 92-6.
- Van den Heuvel S ve Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, 1993, 262(5142), 2050-4.
- Vicdan K ve Işık AZ. In vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Çağdaş Medikal Kitabevi, Ankara, 1999.
- Waites GMH ve Moule GR. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *Journal of reproduction and fertility*, 1961, 2(3): 213-224, doi: 10.1530/jrf.0.0020213.
- Walker JV ve Nitiss JL. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest*, 2002, 20: 570-589.
- Walschaerts M, Huyghe E, Muller A, Bachaud JM, Bujan L, Thonneau P. Doubling of testicular cancer incidence rate over the last 20 years in southern France. *Cancer Causes Control*, 2008, 19(2): 155-61.
- Wang D ve Lippart SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(4): 307-20.
- Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews*, 1997, 23(4), 209-240.
- Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell-Walsh Urology. 10th Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012, s 591-647.
- Wenzler DL, Bloom DA, Park JM. What is the rate of spontaneous testicular descent in infants with cryptorchidism? *J Urol*. 2004;171;849-51.
- White AC, Sousa AM, Blumberg J, Ryan HF, Fanburg BL, Kayyali US. Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2006, 38(7), 513-520.
- Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet*. 2006;7:620-31.
- Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *New England Journal of Medicine*, 1987, 316(23), 1435-1440.
- Wilstermann AM ve Osheroff N. Base excision repair intermediates as topoisomerase II poisons. *J Biol Chem*, 2001, 276: 46290-96.
- Winters SJ ve Troen P. Testosterone and estradiol are co-secreted episodically by the human testis. *Journal of Clinical Investigation*, 1986. 78(4): p. 870.
- Wood HM ve Elder JS. Cryptorchidism and Testicular Cancer: Separating Fact From Fiction. *J Urol*, 2009, 181(2): 452-61.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5th. Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
- Xu K, Yang L, Zhao D, Wu Y, Qi H. AKAP3 synthesis is mediated by RNA binding proteins and PKA signaling during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*. 2014; 90(6):119.

Yaman K. Fizyoloji. 3. Baskı. Vipaş, Bursa, 1999.

Yıldırım M. İnsan Anatomisi, cilt 2. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2006.

Yıldırım M. Topografik Anatomi, 2. Baskı. Nobel Kitabevleri, İstanbul, 2008.

Yokuş B ve Çakır DÜ. Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2012, 1(2): 7-18

Young B ve Heath JW. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000.

Yücel HA. Erkek Genital Sistemi. İçinde: Gökmen Gövsa F, editör. Sistematik anatomi. Güven Kitabevi, İzmir, 2003, s. 549-551.

Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF ve diğ. Targeted disruption of the Ins13 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol*. 1999;13:681-91.





## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Sema KURNAZ ÖZBEK  
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara/ 10.05.1984  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Evli  
Çalıştığı Kurum : Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji A.D.  
İletişim Adresi ve telefonu : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. İzmit/ KOCAELİ- 05077965546

### Eğitimi

2011- 2017	Doktora	Kocaeli Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı <b>Tez Danışmanı:</b> Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN
2009- 2011	Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı <b>Tez Danışmanı:</b> Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
2003- 2007	Lisans	Hacettepe Üniversitesi- Fen Fakültesi- Biyoloji Bölümü
2002- 2003	İngilizce Hazırlık	Hacettepe Üniversitesi

**Yabancı Dili** : İngilizce

**Unvanları** : Araştırma Görevlisi (2011-halen)

### Mesleki Deneyimi

<b>SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler</b>	<b>2</b>
1- Colak T, Bamac B, Ceylan FS, Kurnaz S, Gundogmus UN, Uzun I. Evaluation of the Median Sacral Artery in 30 Postmortem Specimens, 2016, Studies on Ethno-Medicine, 10 (3): 282-287 (Yayın No: 3357409)	

<p>2- Bayramgurler D, Karson A, Yazir Y, Celikyurt IK, Kurnaz S, Utkan T. The effect of etanercept on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in an unpredictable chronic, mild stress model of depression in rats, 2013, European Journal of Pharmacology, 710 (1-3), 67-72., Doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.007 (Yayın No: 1052866)</p>	
<p><b>Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar</b></p>	<p><b>11</b></p>
<p>1- Investigation of the morphological effect of chronic stress in hippocampus on the rats, 45th Annual Conference of the Anatomical Society of Southern Africa (ASSA), Cape Town, 2017.</p>	
<p>2- The effects of etanercept and Cabergoline on endometriotic implant uterus and over in rat endometriosis model, XI. Turkish German Gynecologic Congress, 2016.</p>	
<p>3- Evaluation of the median sacral artery in 30 postmortem specimens, 110th Annual Meeting/ 31. Arbeitsagung Der Anatomischen Gesellschaft, 2015.</p>	
<p>4- Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients, 10th Biennial Conference of ALPHA, 2014.</p>	
<p>5- Sperm Parametreleri İle Sperm DNA Fragmantasyonu ve Kromozom Anomalilerinin Karşılaştırılması, 6. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi (TSRM), 2014.</p>	
<p>6- Male Infertility Correlation With Numerical Chromosome Abnormality, Ovarian Club III, 2013.</p>	
<p>7- Effect of resveratrol on BDNF in a chronic unpredictable mild stress model: an immunohistochemical study, 25th Congress of the European-College-of-Neuropsychopharmacology (ECNP), 2012.</p>	
<p>8- Scopolamin ile öğrenme ve bellekleri bozulmuş sıçaların beyinlerinde resveratrolün nNOS ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi, 11.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012.</p>	
<p>9- Streptozotosin ile uyarılmış sıçan diabetes mellitus modelinde agmatinin optik sinirde eNOS ekspresyonu üzerine etkilerinin immünohistokimyasal olarak incelenmesi, 11.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012.</p>	
<p>10- Sıçanlarda kronik öngörülemez hafif stresin yol açtığı depresyon modelinde etanercept ile tedavinin penil eNOS ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi: İmmünohistokimyasal bir çalışma, 11.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012.</p>	
<p>11- Sıçan beyininde immunoreaktif nöral nitrik oksit sentetaz dağılımının incelenmesi, 11.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012.</p>	

<b>Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı</b>	<b>12</b>	
<b>Ödüller</b>	<b>1</b>	
Best Abstract Awards, Turkish German Gynecological Education and Research Foundation, ALMANYA, 2016		
<b>Proje Adı</b>	<b>Projeyi Destekleyen Kuruluş</b>	<b>Proje No</b>
Testis Dokusu ve Sperm Üzerinde Kemoterapinin (BEP Rejimi) Olumsuz Etkisine Karşı Melatonin'in Koruyuculuğunun Farklı Yöntemler Uygulanarak Araştırılması	Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi	2016/ 080
Testis Dokusu ve Sperm Üzerinde Kemoterapinin (BEP Rejimi) Olumsuz Etkisine Karşı Melatonin'in Koruyuculuğunun Farklı Yöntemler Uygulanarak Araştırılması	TÜBİTAK (1002 Projesi)	116S690
Kronik Olarak Sigara Dumanına Maruz Bırakılan Sıçanlarda Melatonin'in Over Rezervi Üzerine Etkileri	Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi	2016/ 074
İnsan Uterus ve Tuba Uterinasındaki İnterstisyel Cajal Benzeri Hücrelerin Değişik Yöntemlerle Gösterilmesi	Gazi Üniversitesi BAP Birimi	01/2010-87