



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİSPLATİN KAYNAKLI TESTİS
HASARINA KARŞI PROPOLİSİN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özkan YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON – 2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİSPLATİN KAYNAKLI TESTİS
HASARINA KARŞI PROPOLİSİN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özkan YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON – 2015

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özkan YILDIRIM'ın hazırladığı “Sıçanlarda Sisplatin Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Propolisin Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Esin YULUĞ

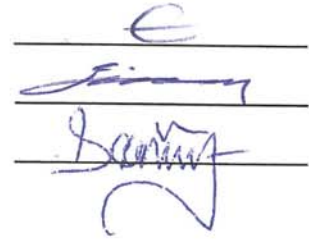


Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Prof. Dr. Esin YULUĞ

Doç. Dr. Deniz ÜNAL



Tarih: 20/11/2015

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03/11/2015 tarih ve 36 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi, kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

02.11.2015

Özkan YILDIRIM

İTHAF

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca deneyimleri ile yol gösteren, manevi destek veren, akademik yönünden eğitimime ve iş alanında kariyerime büyük katkıları olan,engin bilgi ve tecrübeleriyle bilimsel gelişimimde büyük etkinliğe sahip değerli ve saygı değer danışman hocam KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Esin YULUĞ'a, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocam KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e, eğitimim boyunca bilgisinden aydınlandığım ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum sevgili hocam KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ersan ODACI'ya, deney aşamasına katkıda bulunan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Selim DEMİR'e, tezimin istatistik çalışmasında emeği geçen KTÜ Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer KUTLU'ya, çalışmamın her aşamasında destek olan, laboratuvar bilgilerini esirgmeden bana sunan doktora öğrencileri Sibel TÜREDİ'ye ve Hatice HANCI'ya, Araştırma Görevlisi Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE'ye ve en önemlisi bu güne kadar hayatımın her anında bana olan desteklerini, güvenlerini ve hayata dair her türlü güzellikleri bana sunmaya çalışan, her zaman yanımda olup, almış olduğum tüm kararlarımı destekleyen, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım ve hayatlarını çocuklarının varlıkları üzerine kuran aileme ve sevgisini, desteğini, güvenini ve yaşattığı bütün güzellikleri ile hayatıma kattığı anlam için eşime saygılarımı sunar, sonsuz teşekkür ederim.

Özkan YILDIRIM

Trabzon, 2015

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
1. ÖZET	xvi
2. SUMMARY	xvii
3. GİRİŞ ve AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Testisin Anatomisi	4
4.2. Testisin Embriyolojisi	6
4.3. Testisin Histolojisi	8
4.3.1. Seminifer Tübüller	9
4.3.2. Seminifer Epitel	9
4.3.2.1. Sertoli Hücreleri	9
4.3.2.2. Spermatogenik Seri Hücreleri	11
4.3.3. Spermatogenez	12
4.3.3.1. Spermatositogenez	12
4.3.3.2. Spermiyogenez	13
4.3.5. İnterstisyel Alan	14
4.3.5.1. Leydig Hücreleri	14
4.3.5.2. Miyoid Hücreler	15
4.3.6. Kan-Testis Bariyeri	16
4.4. Epididimis	16
4.5. Apoptoz	18
4.6. Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)	20
4.6.1. Sisplatinin Hücre İçine Alınışı	21

4.6.2. Etki Mekanizması ve Toksisitesi	21
4.7. Propolis	23
4.7.1. Propolisin Fiziksel Yapısı	24
4.7.2. Propolisin Kimyasal Yapısı	24
4.7.3. Propolisin Bitkisel Kaynakları	26
4.7.4. Propolisin Biyolojik Etkileri	27
4.7.5. Propolisin Antioksidan Etkileri	28
4.7.6. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM	31
5.1. Deneysel Çalışma Aşaması	31
5.1.1. Deney Hayvanları	31
5.1.2. Sıçanların Çalışma Süresince Bakımı ve Laboratuvar Şartları	31
5.1.3. Çalışma Grupları	32
5.1.4. Propolisin İzole Edilmesi	33
5.1.6. Bouin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı	33
5.1.5. Testis Dokularının Elde Edilmesi	33
5.1.7. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması	35
5.1.8. Kesitlerin Alınması ve Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi	35
5.1.9..Epididimal Sperm Sayısı, Motilite, Vitalite ve Morfoloji Yönünden Değerlendirme	37
5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler	38
5.2.1. TUNEL Boyama	39
5.3. Testis Hasarının Değerlendirilmesinde Skorlama Yöntemi	41
5.4. Biyokimyasal İşlemler	41
5.4.1. Ratlarda Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi	41
5.4.2. Ratlarda doku Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi	42
5.4.3. Testis Dokularında Glutatyon Düzeylerinin Belirlenmesi	42
5.4.4. Rat Testis Dokularında Katalaz Düzeylerinin Belirlenmesi	43
5.4.5. Rat Testis Dokularında Süperoksit Dismutaz Düzeylerinin Belirlenmesi	43
5.4.6. Rat Serumlarında Testosteron Düzeylerinin Belirlenmesi	43
5.5. İstatistiksel Analizler	43
6. BULGULAR	44
6.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular	44
6.2. Morfometrik Bulgular	44

6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular	44
6.2.2. Johnsen Skorum Sonuçları	45
6.3. Morfolojik Bulgular	45
6.4. Semen Analizine Ait Bulgular	53
6.5. Biyokimyasal Değerlendirmeler	62
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	64
8. KAYNAKLAR	73
9. ETİK KURUL ONAYI	93
10. ÖZGEÇMİŞ	94

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Propolis ekstraksiyonu için kullanılan çözücüler ve elde edilen bileşenler	25
Tablo 2. Propolisin kimyasal bileşenleri	26
Tablo 3. Propolisin yapısında bulunan bazı bileşikler ve biyolojik aktiviteleri	28
Tablo 4. Propolisin içerisinde bulunan polifenoller	30
Tablo 5. Çalışma grupları ve özellikleri	33
Tablo 6. Dokuların takibi	35
Tablo 7. Hematoksilen eozin boyama yöntemi	36
Tablo 8. TUNEL boyama yöntemi	40
Tablo 9. Johnsen skorlama sistemi	41
Tablo 10. Deney gruplarının vücut ve testis ağırlığına ait ortalama ve standart sapmalar	44
Tablo 11. Çalışma Gruplarına ait histolojik analizlerin sonuçları ve değerlendirilmesi ($p<0.05$)	45
Tablo 12. Çalışma gruplarına ait apoptotik indeks değerlendirme sonuçları ($p<0.05$)	50
Tablo 13. Semen analizine ait bulgular	54
Tablo 14. Biyokimyasal analiz sonuçları	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Sisplatinin (<i>cis-diamminedichloroplatinum</i>)	20

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1. Seminifer tübülün genel histolojik yapısı. İnterstisyel alan (✚), leydig hücresi (Δ), spermatogonyum (⇔), spermatozoonlar (★), seminifer tübül lümeni (◇), (H&E, X200)	12
Resim 2. Deney hayvanlarının barınmasında kullanılan Tip III kafesler (A, B)	32
Resim 3. Testislerin çıkarılması ve makroskopik görünümleri (A, B, C, D)	34
Resim 4. Testislerin ağırlıkları (A, B, C, D)	34
Resim 5. Makler sayım kamerası ışık mikroskobu ve sperm sayımı	38
Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (H&E, X200)	46
Resim 7. Sisplatin grubuna ait testis dokusu. Seminifer tübülün germinal epitelinde açılmalar (⌋), Lümeneye dökülen germinal epitel hücreleri (⇔) ve ödem (Δ) (H&E, X200)	47
Resim 8. Propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (★) ve ödem (Δ) (H&E, X200)	47
Resim 9. Propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (★) (H&E, X200)	48
Resim 10. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (★), lümeneye dökülen germinal epitel hücreleri (⇔) ve ödem (Δ) (H&E, X200)	48
Resim 11. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (★), lümeneye dökülen germinal epitel hücreleri (⇔) ve ödem (⇔) (H&E, X200)	49
Resim 12. Kontrol grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (⇔), TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)	50
Resim 13. Sisplatin grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (⇔), TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)	51
Resim 14. Propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (⇔), TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)	51

Resim 15. Propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler ($\Leftarrow$), TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)	52
Resim 16. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler ($\Leftarrow$) (TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)	52
Resim 17. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler ($\Leftarrow$) (TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)	53
Resim 18. Deney grubuna ait sperm hücreleri. Canlı (★) ve cansız sperm hücreleri (Δ) (A, B) (eozin-y, X200)	55
Resim 19. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki sperm hücreleri (eozin-y, X200)	56
Resim 20. Sisplatin grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomalisi (★) ve boyun anomalisi ($\Uparrow$) (eozin-y, X200)	56
Resim 21. Propolis 50 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomalisi (★) (eozin-y, X200)	57
Resim 22. Propolis 100 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomalisi (★) (eozin-y, X200)	57
Resim 23. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomalisi (★) ve boyun anomalisi ($\Uparrow$) (eozin-y, X200)	58
Resim 24. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş onomalisi (★) ve boyun anomalisi ($\Uparrow$) (eozin-y, X200)	58
Resim 25. Kontrol grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (★) (H&E, X200)	59
Resim 26. Sisplatin grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlarda azalma ($\Downarrow$) ve lümene dökülmüş spermatogenik hücreler (Δ) (H&E, X200)	59
Resim 27. Propolis 50 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (★) (H&E, X200)	60
Resim 28. Propolis 100 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (★) (H&E, X200)	60
Resim 29. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (★), spermatozoonlarda azalma ($\Downarrow$) ve lümene dökülmüş spermatogenik hücreler (Δ) (H&E, X200)	61

Resim 30. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu.
Spermatozoonlar (★) (H&E, X200)

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ABSU	: Absorbans Ünitesi Cinsinden
AI	: Apoptotik İndeks
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
AMH	: Antimülleriyan Hormon
CAT	: Katalaz
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DTT	: Dithiothreitol
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropini
HE	: Hematoksilen ve Eozin
IM	: Işık Mikroskobu
İp	: İntraperitoneal
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MİM	: Mülleryan İnhibitör Madde
LH	: Luteinize Edici Hormon
Cis	: Sisplatin
PBS	: Fosfat Buffer Solusyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SRY	: Cinsiyet Belirleyici Bölge Y
SS	: Standart Sapma
TDF	: Testis Belirleyici Faktör
TdT	: Terminal Deoxynucleotidl Transferase
THF	: Tetrahidrofolat
TBARS	: Tiobarbituric Acid Reactive Substance

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxyuridine Triphosphate
Nick and Labeling Assay

Simgeler

cm : Santimetre
gr : Gram
kg : Kilogram
mg : Miligram
°C : Santigrat Derece
µm : Mikrometre
µL : Mikrolitre
mM : Milimolar

Formüller

AlCl₃ : Alüminyum Klorür
Cl₂H₆N₂Pt : Cisplatin
CoCl₂.6H₂O : Kobalt klorür
H₂SO₄ : Sülfürik Asit
H₃PO₄ : Fosforik Asit
HCL : Hidroklorik Asit
KCl : Potasyumklorür
NaCl : Sodyumklorür

1. ÖZET

Sıçanlarda Sisplatin Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Propolisin Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Dünyada, çiftlerin çocuk sahibi olamama (infertilite) oranı yaklaşık % 20'ye yakındır ve günümüzün en büyük problemlerinden bir tanesi de budur. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de iki milyon çift çocuk sahibi olamıyor. Çiftlerin büyük bir kısmında çocuk sahibi olamama nedenini açıklayacak sebepler bulunabilirken, yaklaşık % 15'inde infertilite açıklanamayan gruba girmektedir. Sisplatin, çeşitli genitoüriner tümörlerin tedavisi için kullanılan, en etkili ve yaygın olarak reçete edilen antikanser ilaçlardan biridir. Fakat organlar üzerindeki toksik etkileri hala net olarak bilinmemektedir. Propolis bal arıları tarafından ağaçların kozalak ve kabuklarında, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımından oluşan bir arı ürünüdür. Çeşitli organ sistemleri üzerinde yapılan çalışmalarla antioksidan özellikleri gösterilmiştir. Bizde yaptığımız bu çalışmada sisplatin kaynaklı testis hasarına karşı propolisin antioksidan ve antiapoptotik özelliklerini araştırmayı amaçladık. Deneyimizin toplam süresi ondört gün olarak belirlenmiştir. Deney için toplam 36 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta altı adet sıçan bulunacak şekilde altı gruba ayrıldı. Kontrol grubuna tek doz izotonik solüsyon intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Sisplatin grubuna sadece çalışmanın ilk günü 7 mg/kg sisplatin ip olarak uygulandı. Propolis gruplarına (propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg) ise 14 gün boyunca propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg gavaj yoluyla verildi. Tedavi gruplarına (sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg) tek doz 7 mg / kg sisplatin ip olarak uygulama sonrası deney süresi boyunca gavaj yolu ile verildi. Deney süresinin sonunda anestezi altında sıçanların testisleri epididimis ile birlikte çıkarıldı ve kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edildi. Çıkarılan bir testis ikiye bölündü ve bir parçası histolojik incelemeler için kullanıldı. Diğer parçası ve plazma örneği ise biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Propolis, Sıçan, Sisplatin, Testis.

2. SUMMARY

Assesment of Antioxidant and Antiapoptotic Effects of Propolis Against Cisplatin Induced Testis Damage in Rats

In the world, the ratio of the couples inability to have children (infertility) is close to about 20% and this is also one of today's biggest problem. According to Ministry of Health data can not have two million pairs of children in Turkey. Couples will explain the cause of the inability to have a child found in a large part of the reason is unable to enter the group described in approximately 15%. Cisplatin, various genitourinary prescribed the most effective and widely used anti-cancer drugs are for the treatment of tumors. But toxic effects on the body are still not known clearly. Propolis honey bees by trees and cones in the bark of the plant oils collected from various buds and sprouts, pollen, bee products consisting of a mixture of special resins and waxy substances. Their antioxidant affect shown with studies on various organ systems. We aim to investigate antioxidant and antiapoptotic effects of propolis against cisplatin induced testis damage. In this study that we have done, we vere intended to research the antioxidant and antiapoptotic properties of propolis against cisplatin induced testicular damage. Fourteen days was determined as the total time of experiment. In this expermient thirty six male Sprague Dawley rats were used. They were divided into six groups of six rats. Rats of control group will be injected intraperitoneally (ip) at a dose of saline with a single injection. Just for the first day of the experiment, 7 mg/kg of cisplatin were injected intraperitoneally (i.p) with a single injection to the rats of cisplatin group. Propolis groups (propolis 50 mg/kg and propolis 100 mg/kg), were given by gavage of the propolis 50 mg / kg and propolis 100 mg / kg during the 14 days. The rats of treatment groups (sisplatin + propolis 50 mg/kg and sisplatin + propolis 100 mg/kg), were injected with 7 mg/kg of cisplatin on the first day of the study and propolis were given by gavage for fourteen days. At the end of the fourteen -day experiment, testicles with epididymis of the rats were taken out and were sacrificed with the method of making bloodless. One of the each pair of the testicles were divided into two pieces and one of them were used for histological processes. The other half and blood serum were used for biochemical analyses.

Key Words: Antioxidant, Cisplatin, Propolis, Rat, Testis.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser; normal hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması, yaygın nitelik kazanması, metastaz yapması ile kendini gösteren ve kalp hastalıklarından sonra ölüme yol açan nedenler arasında ikinci sırada yer almaktadır (1). Günümüzde türüne ve gelişim evresine bağlı olarak cerrahi çıkarım, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin ya tek başına ya da kombine uygulamalarıyla tedavi edilmektedir (2).

Sisplatin, çeşitli genitoüriner tümörlerin tedavisi için kullanılan etkili ve yaygın olarak reçete edilen, hücresel bölünmeyi ve gelişmeyi engelleyen anti-kanser (antineoplastik) bir ilaçtır (3). Hala testiküler kanser de dahil olmak üzere birçok tipteki tümörlerin tedavisinde kullanılır. Hücresel DNA molekülleri ile kovalent bağ oluşturarak kanser hücrelerinin çoğalmasına engel olur, vücuttaki gelişimlerini ve yayılımlarını yavaşlatır. Replikasyon, transkripsiyon ve apoptozu teşvik ederek hayati işlemleri sonlandırmasıyla kanser hücrelerini öldürür (4). Testis kanserlerinde yüksek tedavi edici etkisine rağmen, sisplatin spermatogenez üzerinde ciddi olumsuz etkilere ve hatta azoospermiye (semende hiç spermatozoon görülmemesi) yol açar (5). Germ hücre apoptozunda artış gösterir (6), aynı zamanda üreme organ ağırlıklarında azalmaya ve spermatojenik hücrelerde dejenerasyona neden olabilir (7, 8). Sisplatin uygulaması ardından genellikle testiküler hasar, oksidatif strese artış, serbest radikal üretimi ve antioksidanların tükenmesine yol açtığı bildirilmiştir. Sisplatin-kaynaklı testis hasarı altında yatan mekanizma biyokimyasal ve fizyolojik doku bozukluklarından kaynaklanan oksidatif stres oluşumunu içerir. Bu nedenle, sisplatine dayalı testis hasarına karşı çeşitli antioksidanlar test edilmiştir (9).

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı direnç kazanması, insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yönlendirmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arılardan elde edilen ürünlerdir. Bu ürünlerin tümü birçok hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıları azaltmak ve tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (10). Propolis, ilk kez eski çağlarda Yunanlılar tarafından doğal bir antibiyotik olarak kullanılmış ve son yıllarda sağlık içeceği olarak ayrıca yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak kullanılarak popülerlik kazanmıştır (11).

Bal arısı (*Apis mellifera L.*) ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına “apiterapi” denilmektedir. Apiterapi arıcılık kadar eskidir (12). Apiterapi; bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehri kullanımını kapsar (13). Arı ürünleri, arının doğrudan vücudundan salgıladığı ürünler olan arı sütü ve arı zehri ile arının bitkilerden topladığı ve kısmen vücut salgılarını eklediği ürünler olan bal, polen ve propolistir (14).

Propolis bal arıları tarafından ağaçların kozalak ve kabuklarında, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımından oluşan bir arı ürünüdür. Arılar propolisi kovan deliklerinin ve çatlaklarının kapatılmasında, peteklerin tamiri ve bir birine yapıştırılmasında ayrıca çeşitli arı hastalıklarından koloninin korunmasında ve hastalık etmenlerinin etkisiz hale getirilmesinde kullanılmıştır (15).

Propolisin içeriği toplanan bitki kaynağına, arı ırkına ve arkeolojik koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Yapısında yaklaşık 150 kimyasal bileşik, 20’den fazla mineral madde, bal mumu, reçine ve polen bulunmaktadır (16). Propolisin en önemli biyolojik özelliği mikroorganizmalara karşı savunucu etkisidir (17). 60’dan fazla farmakolojik etkisi nedeniyle insanlar tarafından kullanılan doğal bir arı ürünüdür. Yapılan çalışmalarda propolisteki flavonoidler ve bunlarla ilgili bileşiklerin serbest radikal temizleme etkisi en fazla olan bileşikler olduğu gösterilmiştir (18).

Farmakolojik etkileri hala çok iyi bilinmemekle birlikte insan sağlığını geliştirmek, kalp hastalığı, inflamasyon, diyabet ve kanser gibi hastalıkları önlemek için kullanılabileceği düşünülmektedir (10). Propolisin; mide, karaciğer, kalp, damarlar, deri gibi organlar üzerinde yapılan çalışmalarda antioksidan / antiapoptotik etkisi gösterilmiştir (19 - 22).

Spermatogenik hücreler, kemoterapötik ilaçların zararlı etkilerine oldukça duyarlıdır ve kök hücre topluluğunda onarılamayan bir hasar oluşturarak kalıcı infertiliteye yol açabilirler. En duyarlı hücreler aktif bölünen spermatogonyumlar ve preleptoten fazına kadarki spermatositlerdir (8, 9, 23, 24).

Bu çalışmada sisplatin kaynaklı testis hasarı üzerine literatürde sıklıkla kullanılan farklı iki dozda propolisin akut dönemdeki etkilerini histopatolojik ve biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler ile araştırmayı amaçladık. Bu çalışma sisplatin

kaynaklı testis hasarına karşı propolisin etkisinin araştırılmamış olması yönü ile özgün bir çalışma olup literatürde ki bu eksikliği de dolduracağını düşünüyoruz.

4. GENEL BİLGİLER

Organizmaların hayatlarının devamı ve varlığını sürdürebilmesi için en büyük ihtiyaç üremedir. Bu gereksinim için canlıların üreme sistemine sahip olması gerekir. Yeni nesillerin oluşabilmesinde erkek gamet olarak sperm ve dişi gamet olarak yumurta olmak üzere iki gamete ihtiyaç vardır ve aynı zamanda bu iki gametin dışının üreme sisteminde buluşması gerekiyor. Bu gereksinim için erkek üreme sistemine ihtiyaç vardır. Erkek üreme sistemi erkek üreme hücreleri olan spermler, bu spermlerin aktarılmasını sağlayan organlar, androjen hormonlar, üretilmesi ve salgılanmasını sağlayan kompleks bir sistemdir. Bu kompleks sistem; iki testis, genital kanallar, eşey bezleri ve penisten oluşur (25, 26). Erkek genital organları dış genital organlar ve iç genital organlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Dış genital organları skrotum ve penis, iç genital organları ise; testis ve aksesuar organlardan (Ductus Deferens, Ductus Ejakulatorius, Vezikula Seminalis, Prostat bezi, Üretra ve Bulboüretral bez) oluşur (26 - 28).

4.1. Testisin Anatomisi

Testisler, erkekte eşey hücrelerinin yapıldığı bir çift üreme organıdır. İnsanda yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda 2-3 cm eninde ve 20-30 gr ağırlığında oval şekilli, skrotum adı verilen kıvrımlı bir torba içerisinde yer alır (29 - 32). Skrotum iç kısımdan, skrotal septum (septum scrotum) ile iki ayrı bölüme ayrılır ve her bir testis bu ayrılan bölmelerin içindeki boşluklarda yer alır. Testisler skrotum içerisinde oblik pozisyonda yerleşiktir. Testislerin üst ucu öne ve dışa, alt ucu ise arkaya ve öne doğru bakar pozisyonundadır. Testislerin skrotum içindeki pozisyonları, organın uzun eksenini yukarıdan aşağıya, önden arkaya eğik ve biri diğerine göre genellikle biraz daha (genellikle 1cm) aşağı konumdadır (30 - 34).

Testisin sperm üretebilmesi için gerekli optimum sıcaklık, vücut sıcaklığından 2-3 °C daha düşük yani 34-35 °C'dir. Normal spermatogenez, testislerin karın boşluğundaki ısıdan daha düşük ısıda bulunmasıyla gerçekleşebilir. Karından gelen atardamardaki kanın sıcaklığını testisten gelen toplardamardaki kan tarafından düşürülmesiyle testislere düşük sıcaklıktaki kan iletilir. Ayrıca testislerin sıcaklığının sabitlenmesinde skrotumun ortam ısısına uygun olarak testisdeki sıcaklık değişimi skrotumun sıcakta gevşeyip sarkarak vücuttan uzaklaşma veya soğukta ise toplanıp vücuda yaklaşması ile

testislerin optimum sıcaklığı sağlanır. Bu hareketleri, musculus cremaster ve musculus dartosun kasılmaları ile gerçekleştirir (35, 36).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Erken fetal dönemde karın boşluğu içerisinde böbreklere yakın olarak yerleşen testisler fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce kanalis inguinalis aracılığıyla skrotuma inerler. Testislerin temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için bu iniş zorunludur. Testisler bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklediklerinden dolayı aşağıdaki katmanlarla kaplıdır. (37 - 39).

- a. Deri,
 - b. Tunika dartos,
 - c. Fasia spermatika eksterna,
 - d. Fasia kremasterika,
 - e. Fasia spermatika interna,
 - f. Tunika vaginalis.
- } Skrotum

Her bir testis facies medialis ve facies lateralis olarak iki yüz, ekstremitas inferior ve ekstremitas süperior olarak iki uç, margo anterior ve margo posterior olarak iki kenara sahiptir. Ekstremitas süperior üst uç olup, buraya caput epididimis yerleşmiştir. Ekstremitas inferior testis'in alt ucu olup, cauda epididimis ile örtülüdür. Margo posterior'un medial bölümüne corpus epididimis yerleşir. Margo anterior, peritoneum viscerale'nin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo posterior'un orta kısmında testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur (29, 36, 37).

Testis dıştan içe; tunica vaginalis'in lamina visceralis'i (epiorchium), tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak üç tabaka ile sarılıdır (37, 40, 41). Tunica vaginalis, skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisi saran lamina visceralis olarak iki tabakadan oluşur. Lamina visceralis, epididimis'in büyük kısmı ile arka kenarının mediyal bölümü dışında, testis'i sarar ve bu iki yapıyı birbirine bağlar. Lamina parietalis, periton'un fascia spermatica interna'yı döşeyen kısımdır (29, 42 - 44). Tunica vaginalis'in iki tabakası arasında kalan aralığa cavum serosum scroti denir

ve içinde eklem sıvısına benzer, testislerin serbest hareketini sağlayan kaygan bir sıvı bulunur (45, 46).

Tunica albuginea, lamina visceralis'in altında testis'i örten mavimsi beyaz renkli, fibroblastlar ve kollajenden yoğun fibröz bir tabakadır. Esneklik özelliği olmayan bu tabaka, testis'in arka dış kısmından içeriye girerek, organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı bölge olan mediastinum testis adı verilen kalın ve vertikal bir bölmeyi oluşturur. Testis içine giren bu bölmelere septula testis denir (45, 46). Tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250- 300 adet piramit biçimli lobüllere (lobuli testis) ayırarak lobuli testislerin taban kısımları periferde, tepe kısımları ise mediastinum testis'e yönelmiştir (47). Her lopçuk, tübülü seminiferi contorti (seminifer tübül) denilen, sayısı 600-1000 arasında değişen sıkışık, kıvrıntılı tüplerden oluşmaktadır. Bu tübüllerin uzunlukları yaklaşık 30-70 cm, çapları ise 150-250 μm 'dir (44, 45, 48).

Tunica vasculosa, gevşek bağdokusundan oluşan, tunica albuginea'nın iç yüzünü, lopçukları saran ve damar ağının bulunduğu tabakadır. Testisin arka tarafından çıkan küçük venler önce birleşerek plexus panpiniformis daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena testikularisi oluştururlar. Bu oluşum sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya doğru açılır (26, 29, 45).

4.2. Testisin Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, fertilizasyon sırasında sperm hücresinin genetik yapısı ile belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlarda erkek veya dişi morfolojik özellik belirlenemez. Gonadların benzer özellik göstermesi ve birbirinden ayırt edilememesi durumuna farketilmemiş gonad denir. Testisler embriyolojik olarak posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel), bunun altındaki mezenkim (embriyonik bağ dokusu) ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken almaktadır (49, 50).

İnsan embriyosunda, gonadların gelişimi 5. haftada mezonefrozun medialinde mezotelin kalınlaşarak gonadal kabartıları oluşturması ile başlar. Epiblasttan köken alan primordiyal germ hücreleri primitif çizgi boyunca göç ederler. Gelişimin üçüncü haftasında ise kaudalde allantois çıkışının önündeki vitellüs kesesinin duvarında endoderm hücrelerinin arasında görülür. Germ hücreleri, dördüncü haftada son

bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerlerler. Beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar. Altıncı hafta sürecinde primordial germ hücreleri genital sırtlara ulaşmış veya birincil cinsiyet kordonlarına yerleşmiş olurlar. Böylece farklılaşmamış olan fetal gonadlar gebeliğin altıncı haftasında ortaya çıkmış olur (49 - 51).

Primordial germ hücrelerinin gonadların testise farklılaşmasında indükleyici etkisi olduğu bilinmektedir. Farklılaşmamış gonadın yapısında dışta korteks iç kısımda medulla yer alır. Eğer embriyo XX dişi cinsiyet kromozomlarını taşıyorsa farklılaşmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır, medullası geriler, eğer embriyo genetik olarak XY erkek cinsiyet kromozomlarını taşıyorsa, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları bırakarak geriler ve dejenere olur. (50 - 52).

Embriyo genetik olarak XY cinsiyet kromozomları taşıması halinde, Y kromozomu kısa kolu üzerindeki SRY geninin etkisiyle testis belirleyici faktörü kodlar ve primitif cinsiyet kordonları testis veya medüller kordonları oluşturmak üzere, gebeliğin altıncı ve yedinci haftalarda SRY geninin etkisiyle testis yönünde farklılaşma göstermeye başlarlar (53 - 55). Primitif germ kordonları testis veya medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalır ve gonadın medulla içlerine doğru ilerler. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturacak ince hücre sıralarından ibaret bir ağ şeklinde yayılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde testis kordonlarının kalın fibröz bir bağ dokusu olan tunika albugineanın oluşması halinde yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur (41, 51, 54).

Ergenlikle birlikte testis kordonlarının lümeni oluşarak seminifer tübüller belirmeye başlar. Seminifer tübüller tubuli rekti ve rete testise farklılanır, ardından duktuli efferenteslerle birleşirler. Bu birleşim rete testis ile Wolf kanalını birbirine bağlamış olur. Ayrıca seminifer tübüller, interstisyel Leydig hücrelerini oluşturan mezenşim ile birbirlerinden ayrılmıştır (56 - 59).

Gonadal sırtın orijinal mezenşiminden köken alan ve testis kordonlarının arasında bulunan Leydig hücreleri kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Sekizinci haftaya kadar gelişen sertoli hücreleri, dokuzuncu haftalarda Müller kanalının gerilemesini sağlayan antimüllerian hormon (AMH) veya mülleryan inhibitör madde (MİM) olan hormonu salgılar. Sekizinci haftada Leydig hücreleri testosteron salgılamaya başlarlar. İnsan koryon gonadotropin hormonu (hCG)

testosteron üretimini uyarır. Testisler ve skrotum dahil erkek dış genital yapılar ise bu olaydan sonra 10- 15. haftalar arasında oluşur (49, 53). Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek durumda olurlar (60 - 62). 26. haftada testislerin 2-3 gün devam eden, inguinal kanallardan geçerek skrotuma iniş süreci oluşur. Testisler, periton ve processus vaginalis dışından geçerler, skrotuma girdikten sonra, inguinal kanal, spermatik kord etrafında kasılır. Testislerin skrotuma inişi, fetal testislerce üretilen androjenler sayesinde kontrol edilir. (63 - 68).

Yeni doğanların %97'den fazlasında her iki testis de skrotum içerisinde bulunur. Doğumdan sonra ilk üç ay içerisinde inmemiş testislerin büyük bir miktarı skrotuma iner, fakat bir yaşından sonra testislerin skrotuma kendiliğinden inişleri olası değildir. Doğumdan sonra testislerden birisinin veya her ikisinin pelvis boşluğunda ya da inguinal kanal içinde yerleşik kalma durumunda “kriptorşidizm (inmemiş testis)” adı verilen işlevsel bozukluk ortaya çıkartır (69).

4.3. Testisin Histolojisi

Erkek üreme sisteminin en önemli bir parçası olan testisler, erkeğe ait gametlerin (spermatozoonların) puberteden sonra devamlı olarak üretilmesi, beslenmesi, geçici olarak depolanması ve androjenlerin (erkek cinsiyet hormonlarının) sentezinden salgılanmasına kadar gerekli olan sistemin esas fonksiyonel organlarıdır (70, 71). Ayrıca birleşik tübüler bez yapısındadırlar. Testisler, tunika vajinalis denilen mezotelyum ile döşeli boşluğu içine alan deriden oluşan bir cep şeklindeki skrotal kese içinde yer alırlar. Skrotumun en önemli fonksiyonu testis sıcaklığını vücut sıcaklığından 2-3°C düşük ısıda olmasını ayarlamaktır (70, 71).

Testisler oval şekilli bez olan, beyaz görünümü nedeniyle tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bağ dokusundan oluşan kalın kapsülle sarılmıştır. Testisin arka yüzünde tunika albugineanın kalınlaşmasıyla mediastinum testis adı verilen yapı oluşur. Buradan bezin içine doğru uzanan septumlar, bezi yaklaşık 250 adet piramidal şekilli löbüllere ayırır. Her lobülde 1-4 adet seminifer tübül gevşek bağ dokusu ile sarılıdır. Ayrıca bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücrelerini (İnterstisyel hücreleri) içerir. İnterstisyel hücreler testis androjenlerini salgılayarak, seminifer tübüllerde erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretiminde görev yaparlar (70, 72 - 75).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller spermatozoonların üretildiği, yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğunda çok kıvrımlı kanalcıklardır. Seminifer tübüller; bir fibröz bağ dokusu kılıfı, bazal lamina, somatik hücreler, kompleks bir germinal epitel ihtiva eden ve devamında merkezi bir lümeninden oluşan özelleşmiş bir yapıdır. Ayrıca seminifer epitelde germinal epiteli oluşturan, germ hücrelerine destek olan, onları besleyen ve gelişimini sağlayan Sertoli hücreleri vardır (48, 70, 73).

Seminifer tübüller kıvrımlı ve uçlarına doğru lümeni daralarak düzgün tübüller ya da tübülü rekti olarak adlandırılan kısa segmentler halinde devam eden kanalcıklar şeklinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlar. Bu bölgede birleşme yapan rete testis kanalları ile devam eder ve yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes (boşaltım kanalı) ile epididimisin baş kısmına bağlanmaktadır (70, 73, 74).

Seminifer tübülü tunika propria adı verilen birkaç fibroblast tabakasından oluşan fibröz bağ dokusu yapısında olan tabaka sarar. Tunika propria'da birbirine geçmiş yapıda ve ince Tip I kolajen lif demetleri de bulunmaktadır (29, 70). Bazal laminaya yapışık olan en içteki tabaka, düz kas özelliği gösteren yassılaştırmış miyoid hücreleri barındırır. Tübüllerin arasındaki boşluğun büyük bir bölümünü Leydig (interstisyel) hücreleri tarafından doldurulur. Bu alanda küçük kan damarları, makrofajlar ve lenfatikler de bulunmaktadır (29, 70, 76, 77).

4.3.2. Seminifer Epitel

Seminifer epitelde Sertoli hücreleri (destek hücreleri) ile spermatogenez serisini oluşturan hücreler olmak üzere iki farklı işlev için gerekli hücreler bulunur. Spermatogenez serisinin hücrelerinin işlevleri spermatozoonları üretmek olup dört-sekiz tabaka halinde düzenlenirler. Spermatogenetik hücrelerinin spermatozoonlara kadar olan gelişim aşamasına spermiyogenez denir (70, 78).

4.3.2.1. Sertoli Hücreleri

İlk kez 1865 yılında Enrico Sertoli, testiste çok sayıda ince uzantıları ile komşu germ hücrelerini saran, onları çevreden izole eden, dallanmalar yapmış bu hücreleri tanımlamış ve daha sonra Sertoli hücreleri olarak isimlendirmiştir (49, 70). Ergenliğe

kadar seminifer epitelde baskın hücre tipi olarak, ergenlikten sonra ise germ hücrelerinin çoğalması ile seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10-15'ini oluşturabilirler. Yaşlılık dönemine doğru erkeklerde, spermatogenik hücre topluluğunun azalmasıyla birlikte, Sertoli hücreleri yeniden epitelin esas yapısı haline gelirler (29, 48, 70, 79).

Sertoli hücreleri hücre tabanları geniş ve bazal lamina üzerine oturmuş, tepe kısımları ise seminifer tübülün lümenine uzanmış piramidal şekilli spermatogenik serideki hücreleri etrafını saran hücrelerdir (70). Bunların bölünme kabiliyeti olmadığı için oluşabilecek bir hasarda kendini yenileyecek bir yapıya sahiptirler. Çekirdekleri düzensiz şekilli ve oldukça kıvrımlı olup, belirgin çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin bulundurlar (70, 80). Ayrıca Sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemeyen, çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri ile lizozom ve iyi gelişmiş golgi kompleksi ihtiva eden hücrelerdir. Protein yapısında kristalloid cisimcikler olarak bilinen Charcot-Böttcher kristalleri çekirdek etrafında görülür (81, 82).

Yan yana dizili halde bulunan Sertoli hücreleri, hücrenin alt yan yüzlerinde engelleyici sıkı bağlantılarla birbirine tutunarak kan-testis bariyerini meydana getirirler. Spermatogonyumlar, bu bariyerin hemen altındaki bazal bölmede yerleşikdir. Sertoli hücreleri gap junction bağlantıları ile birbirleriyle sıkı ilişki içindedirler. Bu bağlantılar aracılığı ile hücrelerin kimyasal ve iyonik alışverişi sağlanır. Bu olay, seminifer epitelyum döngüsünde önemli yer tutmaktadır. Sertoli hücreleri testis içerisinde birçok önemli göreve sahiptir. Bu görevleri şu şekilde özetleyebiliriz (70, 74, 76, 81 - 84).

1. Gelişmekte olan sperm hücrelerinin korunmasını, desteklenmesini ve beslenmesini sağlamak.
2. Spermiyogenez esnasında meydana gelen sitoplazma artıkları olan rezidual cisimcikleri lizozomları ile fagosit etmek.
3. Seminifer lümen içerisine olgunlaşmış spermin aktin tarafından yapılan kasılmalarla rete testise doğru boşaltımını sağlamak.
4. Seminifer tübül lümenine genital kanallar yönünde akan, sperm hücrelerinin kolay bir şekilde taşınması için kullanılan ve beslenmesi için gerekli olan fruktozca zengin olan testiküler sıvıyı salgılamak.

5. Seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan, FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilen Androjen bağlayıcı proteini (ABP) salgılamak.
6. Hipotalamus ve ön hipofiz bezinden Folikül uyarıcı hormon (FSH) sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve FSH salınımı üzerine olumlu bir etki gösteren aktivin hormonunu salgılamak.
7. Embriyonun gelişimi sırasında glikoprotein yapısındaki AMH (Anti Müllerian Hormon)'u salgılamak. Bu hormon, erkek fetusta, Müller kanallarının gerilemesini sağlar. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

4.3.2.2. Spermatogenik Seri Hücreleri

Seminifer tübül duvarını döşeyen dört-sekiz katlı epitel olup, düzenli olarak bölünerek olgun spermlere farklılaşan hücrelerdir. Erkek gametlerinin germ hücreleri olan spermatogonyumlar, olgun üreme hücresi olan spermatozoon halini alıncaya kadar geçirdiği üretim süreci olan spermatogenezin tüm evreleri, spermatogenik hücre tabakalarından sıralı olarak geçer. Tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri incelendiğinde bazaldan lümene doğru dört farklı hücre tipi olduğu görülür. Hücreler olgunlaştıkça bazaldan lümene doğru; spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar şeklinde dizilim gösterirler (Resim 1) (76, 81, 82, 85).



Resim 1. Seminifer tübülün genel histolojik yapısı. İnterstisyel alan (+), leydig hücresi (Δ), spermatogonyum (⇔), spermatozoonlar (☆), seminifer tübül lümeni (◇), (H&E, X200)

4.3.3. Spermatogenez

Spermatogenez, erkekte spermatogoniumdan spermatozoon oluşumuna kadar geçen olayların tümüne denir. Ergenlikten kısa bir süre önce, hipofizden salınan gonadotropinler sayesinde başlar ve hayat boyu devam eder (86).

Spermatogenez süreci iki aşamadan oluşmaktadır:

- 1) Spermatositogenez
- 2) Spermiyogenez

4.3.3.1. Spermatositogenez

Spermatojenik serinin kök hücreleri olan koyu tip A spermatogonyumlar bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra kök hücreler olan açık tip A spermatogonyumlar olarak devam ederler. Ardından devam eden mitotik bölünmeler sonucunda farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. B tipi spermatogonyum büyüyerek, daha büyük yuvarlak hücreler olan primer spermatosit halini alır ve birinci mayozun profazına girerler (70, 87, 88). Bir tane primer spermatosit birinci mayoz bölünme

sonucunda iki adet sekonder spermatositi oluşturur. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde ikinci mayoz bölünmeye giderler. Her bir sekonder spermatositen sperm şeklinde olgunlaşan iki adet spermatid oluşur (89).

İnsanlarda 46 kromozom (44+XY) içeren diploid hücreler birinci mayoz bölünmenin profazında eşleşmiş homolog kromozomlara ayrılırken, ikinci mayotik bölünme sırasında interfaz safhasının S aşamasında DNA miktarı iki katına çıkarılmadığından, sırayla; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarından sonra kardeş kromatidler yavru hücreler olan haploid spermatidler oluşur veya sekonder spermatositler 23 kromozoma sahip (22+X veya 22+Y) haploid hücreleri meydana getirirler (51, 53, 70). Kısaca ard arda geçireilen mayoz bölünmeler sonucunda bir tane diploit spermatogonyumdan 4 tane haploid spermatid meydana gelir. Sonraki aşama olan ve spermiyogenez olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecini başlatırlar. (40, 70, 87 - 89).

4.3.3.2. Spermiyogenez

Haploid spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanında yerleşmiş ve Sertoli hücre sitoplazma kriptaları içine gömülüdürler. Spermiyogenez spermatidlerin hücre bölünmesi gerçekleşmeden spermatozoona dönüştüğü süreç olup spermatogenezin önemli bir aşamasıdır (70, 89). Aşağıda spermiyogenez sürecinin dört safha halinde oluşumu açıklanmıştır (70, 90). Bu safhalar;

1. Golgi safhası, çekirdeğin bir kutbuna yerleşik olarak bulunan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve granüllü endoplazmik retikulum sisternalarından oluşur. PAS pozitif olan granüller proakrozomal granülleri (glikoproteince zengin) Golgi kompleksinde birikip birleşerek, zarla çevrili bir akrozom vezikülünün içerisinde yer alan tek bir akrozom granülünü oluştururlar. Sentriyoller, göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma yerleşirler. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ettikçe aksonem bileşenleri çevresine sarılırlar (70, 87, 88).

2. Kep safhası, Akrozom kesesi büyüyerek çekirdek zarına tutunan bir kep oluşturur. Bu kepin içeriğinde akrozomda, nöraminidaz, tripsin, hiyalüronidaz ve asit fosfataz benzeri proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler bulunur ve spermin oosite

penetrasyonunda oositleri çevreleyen korona radiata hücrelerini ve zona pellusidayı eriterek spermatozoonun oositi döllemesine yardımcı olur (87, 88).

3. Akrozomal safha, çekirdek zarı uzayıp yoğunlaşırken, sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur ve diğeride hücrenin bölünmesinde gerekli olan sentriyolü meydana getirir. Bu kep çekirdeğin çevresini sarmaya başlar ve oluşan bu yapıya akrozomal kep denir. Bu arada çekirdekteki yoğunlaşma devam eder. Mitokondriler, kamçının orta parça denilen proksimal kısmı etrafını sararak kalınlaşma oluştururlar. Orta kısım denilen bu bölgede mitokondriler sayesinde üretilen enerji ile spermatozoonun hareketliliği sağlanır (70, 91).

4. Olgunlaşma safhası, son faz olan bu safhada spermatozoon olgunlaşıp kuyruklu hale gelince geride kalan fazla sitoplazmik parçalar Sertoli hücreleri tarafından fagositozla ortadan kaldırılır. Böylece spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine bırakılarak epididimde depolanmak üzere boşaltımı sağlanır (51, 87, 92).

4.3.5. İnterstisyel Alan

Testislerde seminifer tübüller arasında kalan alanda bulunan bağ dokusundan oluşan alana interstisyel alan denir. İnterstisyel alanda ki bağ dokusu farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, Leydig hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, lenfositler içeri. Burada kan proteinleri gibi makromoleküllerin geçişine imkan sağlayan bol kılcal kan damarları, lenf damarları ve sinirler bulunur (70). Canlı için büyük önem arz eden androjen üretiminin yapıldığı alan olması yönünden de önemlidir. Ergenlikte (pubertede) leydig hücreleri denilen yeni hücreler işlevsel olarak belirgin hale gelir ve bu hücreler steroid salgılayan hücrelerdir (70, 72).

4.3.5.1. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasında üçgen şeklindeki bölümlerde bulunurlar. Hücrelerin şekilleri yuvarlak ya da poligonal biçimlidir ve yaklaşık 15 µm çapında, merkezi bir çekirdeği bulunur (70, 72, 93). Erkeklerde ikincil seks karakterlerinin gelişimini sağlayan testosteron hormonunun üretimi ve salınımından sorumludur. Bu hücreler salgıladıkları testosteron hormonu ile spermatogenezi devam ettirir. Testosteron embriyonal ve fetal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması ve

gonadotropin salgısının kontrolünü de üstlenir. Ayrıca metabolik olayların kontrolü için nöroendokrin görev yapar (70, 94).

Testosteron sentezi mitokondri ve 20 granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. Kristal mitokondriler, granülsüz endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksleri ile birkaç granüllü endoplazmik retikulum ihtiva ederler. Ayrıca sitoplazmaları eozinofilik ve küçük lipid damlacıklarından zengindir. Ancak salgılayıcı vezikül bulundurmazlar, çünkü testosteron, sentezi tamamlandıktan sonra hemen salgılanmaktadır. Lizozom ve peroksizomlar da vardır, ancak özellikle daha yaşlı erkeklerde lipokrom (lipofuskin) pigmenti şeklinde bulunurlar. Bu özellikleri dolayısı ile Leydig hücreleri steroid salgılayan hücre özelliklerini gösterir (29, 70, 72, 95).

İnsanın gebeliği sırasında, plasental gonadotropik hormon fetüse geçerek, androjenik hormonları üreten fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarak embriyonik farklılaşma sürecinde erkek genital organlarının gelişmesine öncülük eder. Embriyonik interstisyel hücreler insan hamileliğinin 16-18. ayına kadar farklılaşmış olarak kalırlar ve sonrasında ise testosteron sentezindeki azalmaya bağlı olarak gerilerler. Gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon (LH) uyarımı altında dinlenmede kalan hücreler testosteron sentezini ancak puberte döneminde yeniden yapmaya başlarlar (79, 94 - 96).

Olgun Leydig hücreleri doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, normal olarak çocuk testisinde ergenliğe kadar bulunmaz. Ergenlikle birlikte belirgin olarak sayıca çoğalır ve yaşlılık dönemine doğru tekrar azalma gösterir (97, 98).

4.3.5.2. Miyoid Hücreler

Seminifer tübül epitelini çevreleyen lamina propria bağ dokusundan oluşan miyoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreler) ve kollajen lifler seminifer epitelin dış bazal laminasında bulunurlar. Miyoid hücreler, seminifer tübülde üretilen hareketsiz spermlerin rete testise taşınımını sağlayan ritmik kasılma hareketlerinden sorumlu hücrelerdir. Spermler böylelikle duktus epididimise ulaşır ve epididimisi geçtikten sonra hareket yeteneği kazanırlar. Miyoid hücrelerin sitoplazmasında aktin filamentlerini içermesi ve bazal zarının olmasından dolayı düz kas hücrelerine benzediği elektron mikroskobu incelemeleriyle ortaya konmuştur. Ayrıca miyoid hücreleri kollajen

sentezini fibroblastlarda bulunan granüllü endoplazmik retikulumlar sayesinde yapmaktadırlar (96, 99).

4.3.6. Kan-Testis Bariyeri

İnterstisyel doku ile seminifer tübüller arasında yer alır. Kan-testis bariyeri, kan ve lenfatik yolla gelen maddelerin seminifer tübüller içerisine geçişini ayarlayan birincil bariyer görevi üstlenir. Seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyer bulunması, testis sıvısında kandan gelen çok az madde bulunmasını sağlar. Testis kapillerleri pencere tiptedir ve büyük moleküller bu aralıklardan kolayca geçebilirler. Sertoli hücreleri arasında bulunan engelleyici bağlantılar, bir bariyer oluşturarak büyük moleküllerin Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa taşınmasını engeller. Böylece spermatogenezin daha ileri aşamalarındaki germ hücreleri, kandaki zararlı maddelere karşı korunmuş olur (29, 70).

Ergenlik öncesi insan testisinde, komşu Sertoli hücrelerinin karşılıklı gelen membranları arasında birbirine geçmiş villus benzeri uzantılar görülür. Ergenliğin başlamasını takiben bu yapılar fonksiyonellik kazanırlar. Sertoli hücrelerinin bölünmeyen hücre konumuna geçmesi ve spermatogenezin başlaması ile eş zamanlı olarak kan-testis bariyerinin oluşması gerçekleşir.

İmmünolojik savunma mekanizmasından sonra gelişen seksüel olgunlaşma sonucu, farklılaşp gelişmekte olan spermatozoonları yabancı cisim olarak algılamaktadır. Bu durum neticesinde germ hücrelerinin ölümüne neden olabilecek bir immün yanıt oluşmaktadır. Bu bariyer, gelişen spermatozoonlar ile immün sistem arasında oluşabilecek herhangi olumsuz bir durumu ortadan kaldıracak ve seminifer tübüllere immünoglobulinlerin geçmesini önleyecektir (89, 97).

4.4. Epididimis

Epididimis erkek üreme sisteminin önemli bir parçası olup spermilerin hareket özelliğini kazandıkları ve olgunlaştıkları genital kanaldır. Yetişkin insanlarda uzunluğu altı yedi metre olan epididimis, testisin arka efferent kanalları ile vas deferensi bir birine bağlayan dar, sıkı sarılmış ve tek bir tüp şeklindedir. Epididimis, testisin üst ucuna doğru olan bölümü “kafa (caput)”, testisin arka kısmında olan bölümü “vücut (corpus)”

ve testisin alt ucuna doğru olan bölge de “kuyruk (kauda)” olmak üzere üç ana bölümden oluşur (36, 70).

Epididimisin lümeni yalancı çok katlı prizmatik stereosilyalı epitel ile kaplıdır. Epitel esas hücreler, bazal hücreler ve diğer hücreler (apikal ve berrak hücreler) olmak üzere üç tip hücreden oluşur.

Esas hücreler, epitel çoğunluğunu oluşturan, sütunlu hücreler olmakla beraber salgılama ve emilim işlemlerini yapabilmeleri için bazal laminadan lümene kadar uzanırlar. Dallanan stereosilya ile iyi gelişmiş Golgi aparatı, lizozomlar ve veziküllere sahiptirler. Lümene, karnitin, sialik asit, glikoproteinler ve glycerylphosphorylcholine salgırlar. Bu hücreler, aynı zamanda kuyruk bölgesinde uzun ve dallanmış, baş bölgesinde kısa olan hareketsiz stereosilyaya sahiptir, bazal laminadan lümene kadar uzanır (70, 79).

Bazal hücreler, bazal lamina üzerine yerleşmiş, apikal yüzeyleri lümene ulaşmadan incelenerek kısalmış ve piramit şeklindeki hücrelerdir. Bunların esas ve diğer hücrelere kaynaklık ettiği öngörülmektedir.

Epididimisin diğer hücreleri ise apikal ve berrak hücrelerdir. Apikal hücreler mitokondri bakımından yoğun ve ağırlıklı olarak baş bölgesinde bulunurken berrak hücreler ise kuyruk bölgesinde daha baskın durumdadır. Ayrıca epididimis kanalında doku boyunca dağılmış, immünolojik reaksiyonlarda görevli intraepitelyal lenfositler ve makrofajlar yer alır (70, 79).

Stereosilialar: Epididimisin stereosilyaları uzun sitoplazmik uzantılı ve hareketsiz olup, emilime yardımcı olan epididim yapılarıdır. Bu membran uzantıları diğer stereosilyaya göre daha uzundur. Ayrıca emici mikrovillus gibi olup, yüzey alanın da emme ve salgılamayı da artırır. Epididimden başlangıçta hareketsiz olan spermatozoonları taşımak için fazla miktarda sıvı salgılanır. Sperm hareket yeteneği kazandıktan sonra bu sıvıyı büyük oranda (%90 gibi) absorbe ederler. Bu salınım ve emilim seminifer tübüllerden epididime gelen hareketsiz spermatozoonları sıvı akımı ile hareket ettiren bir oluşumdur (100).

Epididimisin sperm depolama ve ejakulasyondaki rolü: testiste üretilen spermatozoonlar kaput epididimise girer, buradan korpuse geçer ve ilerleyerek kaudal kısmında depolanır. Kaput epididimise giren spermatozoonların ileri doğru hareket

yeteneği olmadığı için epididimisin çevresindeki düz kas hücrelerinin peristaltik hareketleri sayesinde spermatozoaların taşınımı sağlanır. Ayrıca hareket yeteneği olmayan bu spermatozoonlar yumurtayı dölleme yeteneğinden yoksundurlar. Epididimisin buradaki rolü spermatozoonlar epididimise geçtikten sonra burada bunların hareket yeteneği ve olgunlaşma işlevlerini sağlamaktır. Spermatozoonların son olgunlaşması kadın üreme sisteminde (kapasitasyon) tamamlanır (101).

4.5. Apoptoz

Apoptoz kelime anlamı olarak yaprak dökmesi anlamına gelen bir terimdir. Vücutta ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerden kurtulmanın normal yoludur. Programlı hücre ölümü adıyla bilinen apoptoz, belirli bir moleküler işlemler serisinin sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır (102).

Apoptoz sinyali alan bir hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Benzer bir şekilde sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür. Bu parçalara apoptotik cisimcikler de denilir. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yakınlarındaki makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. (70, 103 - 105).

Apoptoz, genetik olarak kontrol edilen, vücut işlevleri ve sağlık için en az hücre çoğalması kadar önemli olan ve biyolojik görevini tamamlayan veya düzelmeyecek seviyede hasar gören hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan programlı hücre ölümüdür (106 - 110). Bir başka ifadeyle, çok hücreli organizmalarda hücre sayısının kontrolü için hücre çoğalması ile ölümü arasındaki dengenin sağlanmasının programlı ve fizyolojik şartlarda yapılmasına fizyolojik ölüm veya apoptoz denir (107). Fizyolojik hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen, apoptoz terim olarak ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlarındaki patologlar tarafından kullanılmıştır (111).

Bir organizmada yaşamın devamı için embriyonal ve fötal dönemde, rejenerasyon olayları, hücresel homeostazın sağlanması, organ büyüklüklerinin korunması, immünolojik reaksiyonlar ve fonksiyonları bozulmuş, organizma için gerekliliği kalmamış, istenmeyen hücrelerin yok edilmesini gerektiren embriyonik aşamadan

organizmaların hayatının sonuna kadar devam eden süreçteki en önemli hayati fonksiyonlarından biridir (90, 103, 107).

Apoptoz, homeostazın korunmasında embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, dişi fetüste Wolf ya da erkek fetüste Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde yer alarak; doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürüterek, ayrıca DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle infekte hücrelerin ölümünü sağlayarak temel bir rol oynayan önemli bir fizyolojik işlevdir. Ayrıca büyüme faktörlerinin ortamdan çekildiği koşullarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, ilgili organlardaki hücrelerin apoptozla ölümüdür (70, 103 - 105)

Apoptozun düzenlenmesindeki defektlerin kanser, otoimmün hastalıklar, AIDS ve merkezi sinir sisteminin dejeneratif hastalıklar gibi değişik hastalıkların gelişiminde etkili olabileceği bilinmektedir. Genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal alması halinde hücrede apoptoz başlar. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir. Apoptoz, hücre içinden mitokondriyal yolu aktive ederek yada hücre dışından gelen hücre ölüm reseptörü sinyallerinin alınması ile iki yolla oluşur. Memelilerde T ve B lenfositlerde apoptozis olayı görülmektedir. (107, 110 112).

Apoptozun organizmadaki temel işlevlerini şöyle sıralayabiliriz:

- Embriyonal süreçte, örneğin insanlarda parmak aralarının şekillenmesi, göz kapakları arasındaki boşluğun şekillenmesi, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılması,
- Kadınlarda menstruel siklusa endometriyal hücre yıkımı,
- Menapozda folikül atrezisi,
- Laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesi,
- DNA hasarı alan hücrelerin yıkımı,
- Tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması,
- Virüs ile infekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında apoptoz önemli işlevler yapar.

Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Açılımı; "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE" şeklindedir. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive

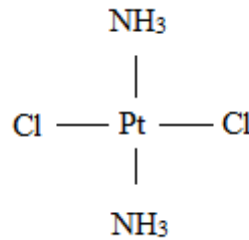
edilirler. Daha sonra hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanır ve mevcut substrat bir karboksil tarafından ayırılır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve şekilsel değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (113). Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmıştır (114). Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (kaspaz-1) ile ilişkili ve CED-3 benzeri olmak üzere iki alt grubu vardır. Alternatif olarak bu proteazlar, substrat özelliklerine göre de gruplandırılabilirler (115).

Apoptoz mekanizmaları hakkında belirli bir genetik kontrol altında gerçekleşen programlı hücre ölümü ile ilgili olarak birkaç mekanizma açıklanmıştır.

1. Kaspazlar aracılığı ile hücre ölümü,
2. Ölüm sinyalleri aracılığı ile hücre ölümü,
3. Kaspaz aktivitesi olmadan hücre ölümü,
4. Apoptozda görev yapan diğer proteinlerle hücre ölümü (116).

4.6. Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)

Sisplatin (*cis*-diamminedikloroplatinum (II), *cis*-platinum (II), *cis*-DDP), merkezdeki iki değerlikli platin atomuna bağlı iki amonyum ve iki klor bağı içerir (Şekil 1). Bileşik, *cis* ve *trans* olmak üzere iki izomere sahiptir. Bunlardan sadece *cis* formu sitotoksiktir (117).



Şekil 1. Sisplatinin (*cis*-diamminedichloroplatinum)

Sisplatin dünyada ilk kez 1845 yılında Peyrone tarafından sentezlenip tanımlanan ve Peyron kloridi olarak da bilinen ve sonradan sisplatin adını alan platinin nötral bir *cis* izomeri olduğu saptandı. 1960'lı yıllarda biyofizikçi Barnett Rosenberg bu bileşeni kullanarak *Escherichia Coli* ile yaptığı deneylerde platin elektrotlarının bulunduğu büyüme alanında bakterinin normalden 300 kat daha uzun olan filamanlara sahip

olduğunu gözledi. Bakterinin hücre bölünmesini engellediği ancak diğer büyüme yapılarını engellemediği için çok uzun filamanların ortaya çıktığı gösterildi (118 - 120).

Sisplatine ait bu bulgular 1965 yılında yayınlandı. İlk kez 1971 yılında kanser hastalarında başarı ile uygulanmaya başlandı. Antitümoral etkisi bulunan bu ajanla ilgili ilk klinik çalışma 1972 yılında Rossof ve arkadaşları tarafından yayınlandı. Sisplatin 1970'li yıllardan sonra kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir (121).

Beyin tümörleri, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, germ hücreli tümörler, osteosarkom, nazofarinks karsinomu gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde kullanılan güçlü bir antineoplastik ilaçtır (122, 123). Antineoplastik ajan olarak güçlü etkinliği yanında sisplatin kullanımının farklı dezavantajları vardır. Bunlar nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, bulantı ve kusmayı içeren yan etkilerdir (124, 125). Sisplatin Amerika Gıda ve İlaç kurumundan 1978 yılında onay almıştır (119). İlk olarak germ hücreli tümörlerde kullanılmıştır (126).

4.6.1. Sisplatinin Hücre İçine Alınışı

Sisplatin kanser hastalarına steril bir tuz çözeltisi (sodyum klorür) halinde intravenöz olarak verilir ve böylelikle kan dolaşımına katılır. Yüksek konsantrasyondaki klor iyonları sayesinde bozulmadan kalan bu nötral bileşik daha sonra ya pasif diffüzyonla ya da aktif transportla hücre içine girer (120, 127).

Yapılan ilk çalışmalarda sisplatinin pasif ya da aktif difüzyon ile hücre içine girdiği öne sürülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise bakır transport proteini olan '*copper transporter 1*' in (CTR1) sisplatinin hücre içine aktif olarak alınmasında etkili olduğunu göstermektedir. Sisplatin hücre içerisinde muhtemel hedeflere sahiptir. Bunlar, DNA, RNA, metallothionein ve glutasyon gibi sülfür içeren enzimler ve mitokondridir. Sisplatin uygulanmasından kaynaklanan mitokondrial DNA hasarı, hücre ölümüne sebep olur (120, 128).

4.6.2. Etki Mekanizması ve Toksisitesi

Geniş spektruma sahip olan sisplatin etki mekanizmaları açısından alkilleyici ajanlara benzer. DNA çift zincirinde zincirler arasında ve zincir içinde çapraz bağlanma yapar. Hücreye girdikten sonra klor iyonlarını kaybeder ve guanin-sitozin arasındaki

hidrojen bağlarını koparan reaktif diamin-platin kompleksine dönüşür ve çeşitli sinyal yollarını etkin hale getirir (129).

Sisplatin çoğunlukla sarmal içi bağlar oluşturur, bunlar bazlar arasında kovalent bağ şeklindedir. Bunun yanı sıra bazlarla tekli bağ, sarmal arası çarpaz bağ ve DNA-protein çarpaz bağlarını da oluşturabilir. Çarpaz bağlanma; defektli DNA kalıplarının oluşumu ve DNA sentezinin ve replikasyonunun çöküşüyle sonuçlanır (130).

İlacın nükleik asit ve proteinler ile tepkimeye girebilen aktif şekillerini oluşturabilmek için su aracılığıyla yer değiştiren klor atomları aktif rol oynar. Sulu ortamda çiftleşmemiş elektron içeren oksijen, sülfür ve nitrojen atomları gibi nükleofilik gruplar, klor iyonlarıyla yer değiştirmek üzere platine bağlanır. Bağlanan gruplar deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA)'nın pürin bazında ve birçok aminoasit yan zincirlerinde yer alır (129).

Hızlı bölünen kanser hücrelerinde de çarpaz bağlanma ileri DNA hasarını indükleyebilir. Orta hasarlı DNA tamir edilebilir fakat ileri DNA hasarı geri dönüşümsüz hasardır ve hücre ölümüyle sonuçlanır (129, 130).

Ortamda bulunan klor iyonu konsantrasyonu ilacın etkinliğinin göstergesi olarak değişir. Klor iyonu konsantrasyonunun yaklaşık 100 mM olduğu kanda ve ekstraselüler sıvılarda sisplatin daha az etkindir. Hücre içi klor iyonu konsantrasyonundaki ani düşüşler, ilacın etkinliğinin artmasına neden olur (129).

Sisplatin DNA ile etkileşerek birçok zincir içi ve zincirler arası çarpaz kovalent bağlar oluşturur. Guanin bazının oldukça reaktif olan 7. azot atomu ile kolayca tepkimeye girer. Sisplatin, en sık aynı DNA zincirindeki komşu guaninler arasında çarpaz bağ [cisplatinum diamine-d (GpG)] oluştururken; ikinci sıklıkta, guanin-adenin çarpaz bağları [cis-platinum diamine-d (ApG)] oluşturur. Nadiren, zincirler arası çarpaz bağ oluşturur. Sisplatinin antineoplastik etki mekanizması, ilacın DNA ile kovalent bağlar oluşturarak hücre siklusunu G2 fazında durdurması ve apoptozu tetiklemesi şeklinde açıklanmıştır (130).

DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eden çarpaz bağlar, sisplatinin hem terapötik etkisi hem de hücrel toksisitesi açısından önemlidir. DNA molekülü; DNA onarıcı proteinler ile histonları, mobilitesi yüksek grupları ve diğer protein gruplarını kendisine çeker. Sisplatinin modifiye ettiği DNA yeterince

yenilenemediğinden, sözkonusu proteinlerin, oluşan DNA hasarına verdikleri sinyal apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutlarda ise hücre tarafından tolere edilemez ve hücrenin ölümüne neden olur (129, 130, 131).

Sisplatin toksisitesinin birçok sistem üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Nefrotoksisite ve ototoksisite doz sınırlayıcı iken nörotoksisite, kardiyotoksisite ve miyelosupresyon gibi yan etkiler klinikte önemlidir (132).

Sisplatinin miyelosupresif etkinliği orta dereceli olduğundan daha çok kombine olarak kullanılır. İntravenöz infüzyon (iv.) ve yavaş iv. enjeksiyon olarak 100 mg/ m² dozunda, kombine olarak ise 20 mg/ m² dozunda uygulanır. Vücuttan atılımı üriner yol ile olur. Alınışından itibaren ilk 5 gün içinde kümülatif idrarla eliminasyon, dozun %27-%43'ü kadar olmaktadır. Kalan kısmın atılımı ise daha uzun sürer (133).

Sisplatin neredeyse tüm hastalarda orta-ağır derecede bulantı ve kusmaya neden olur. Bulantı kusma ilaç infüzyonunu takiben bir saat içinde başlar ve 24 saate kadar devam edebilir. Yeterli intravenöz hidrasyon ve antiemetik kullanımı ile bu yan etkilerin azaldığı gözlenirse de iştahsızlık ve bulantı bir hafta süreyle devam edebilir.

Sisplatin verilen hastaların takibinde:

- 1) Düzenli böbrek fonksiyon testlerinin yapılması,
- 2) Nörolojik muayene,
- 3) Kan magnezyum, sodyum, potasyum, fosfor, kalsiyum düzeylerinin yakın takibi,
- 4) Tam kan sayımı,
- 5) İşitmenin sorgulanması ve düzenli odyometrik testlerin uygulanması önerilmektedir (134, 135).

4.7. Propolis

Propolis bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından ağaçların kozalak ve kabuklarında, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımından oluşan bir arı ürünüdür (14). Arılar propolisi kovan deliklerinin ve çatlaklarının kapatılmasında, peteklerin tamiri ve birbirine yapıştırılmasında ayrıca çeşitli arı hastalıklarından koloninin korunmasında ve hastalık etmenlerinin etkisiz hale getirilmesinde kullanmıştır. Propolis ilk kez eski çağlarda

Yunanlılar tarafından doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (11). Propolisin içeriği toplanan bitki kaynağına, arı ırkına ve arkeolojik koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Yapısında yaklaşık 150 kimyasal bileşik, 20'den fazla mineral madde, bal mumu, reçine ve polen bulunmaktadır (16). Propolisin en önemli biyolojik özelliği mikroorganizmalara karşı savunucu etkisidir (17). 60'dan fazla farmakolojik etkisi nedeniyle insanlar tarafından kullanılan doğal bir arı ürünüdür.

4.7.1. Propolisin Fiziksel Yapısı

Propolis reçineli ve yapışkan bir maddedir. Soğukta sert ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (136). Propolis 10°C' nin altında sert, katı ve kırılgan, 15–25 °C arasında ise yumuşak ve çok yapışkan olup, mum gibi elastik bir yapıdadır (137). Genel olarak 60–69 °C arasında bir erime noktasına sahiptir (138). Rengi toplandığı yöreye, kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak sarı yeşilden koyu kahverengine kadar değişebilmektedir (139, 140).

4.7.2. Propolisin Kimyasal Yapısı

Propolis, toplandığı bitkiye, bölgeye, mevsime ve koloniye bağlı olarak değişir. İçeriğinde farklı kimyasal özelliklere sahip bileşikler, vitaminler ve mineral maddeler içeren kompleks bir yapıdan oluşur. Aynı zamanda yaklaşık olarak %45-50 reçine, %25-30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen, %5 diğer maddeler ve organik kalıntıları içerir. (Tablo 1) (141). Suda az erirken, % 95'lik alkolde büyük ölçüde erir. Eter, kloroform, aseton ve diğer organik çözücülerde ise kısmen erir (137).

Tablo 1. Propolis ekstraksiyonu için kullanılan çözücüler ve elde edilen bileşenler

Su	Metanol	Etanol	Kloroform	Diklorometan	Eter	Aseton
Antosiyaninler	Antosiyaninler	Taninler	Terpenoidler	Terpenoidler,	Alkoloidler	Flavonollar
Niştastalar	Terpenoidler	Polifenoller	Flavonoidler	Taninler	Terpenoidler	
Terpenler	Saponinler	Polyacetylenes		Polifenoller	Kumarinler	
Saponinler	Taninler	Flavonollar		Polyacetylenes	Yağ asitleri	
Terponoidler	Xanthoxylle	Terponoidler		Flavonollar		
Poliipeptidler	Totarol	Steroller		Steroller		
Lektinler	Quassinoids	Alkoloidler		Alkoloidler		
	Laktonlar					
	Flavonlar					
	Phenones					
	Polifenoller					
	Poliipeptidler					
	Lektinler					

Propolis kompleksinde şimdiye kadar kimyasal analizler ile bilirlenen en az 300 bileşenin varlığı ortaya konulmaktadır. Bu organik bileşenlerden bazıları, fenolik bileşikler ve esterleri, flavonoidlerin (flavonoller, flavonlar, flavononlar, dihidroflavonoller ve kalkonlar), terpenler, beta-steroidler, aromatik asitler, aromatik aldehytler ve alkoller, seskuiterpenler, stilben terpenler ve kafeik asit fenil ester (CAPE) bulunmaktadır (142). Ayrıca propolisin içeriğinde alüminyum, bakır, civa, çinko, demir, flor, fosfor, kalay, kalsiyum, klor, kobalt, krom, kursun, magnezyum, mangan, molibden, nikel, potasyum, silisyum, sodyum gibi pek çok mineral de bulunmaktadır. Mangan ve çinkonun diğer 9 elemente göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Propolisin vitamin içeriği; A, B1, B2, B3, B6, C, E, nikotinik ve pantotenik asit değişik miktarlarda bulunmaktadır. Aynı zamanda propolis içerisinde sayıları 8-17 arasında değişen alanin, arjinin, fenilalanin, glikol, glutamik asit, histidin, lizin, lösin, prolin, serin, sistin ve triptofan gibi aminoasitlerde bulunmaktadır (143).

Tablo 2. Propolisin kimyasal bileşenleri

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar(%)
Reçine	Flavonoidler Terpenler Kumarinler Fenolik asitler ve esterleri	45–55
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	25–35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
Polen	Proteinler Serbest aminoasitler Vitaminler (A, B, C, E, PP, vs)	5
Diğer maddeler	Eser elementler (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, vs) Ketonlar Laktonlar Kinonlar Steroidler Şekerler	5

4.7.3. Propolisin Bitkisel Kaynakları

Propolis kimyasal yapısı önemli derecede kompleks bir yapı göstermekte ve bu özelliği toplandığı bölgenin bitki örtüsüne göre değişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda ise propolisin; genellikle, çam (*Pinus* spp.) reçineleri, huş (*Betula* spp.), kavak (*Populus* spp), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), söğüt (*Salix* spp), kızılğaç (*Alnus* spp), göknar (*Abies* spp), erik (*Prunus* spp), karaağaç (*Ulmus* spp), meşe (*Quercus* spp.) ve dişbudaktan (*Fraxinus excelsior*) elde edildiği ve propolisin bileşiminin bitki kaynağına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (144 - 146).

Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya'nın tropik olmayan bölgeleri gibi karasal iklime sahip bölgelerde kavak türleri propolisin başlıca kaynağıdır, ancak kavağın yetişmediği yerlerde arılar başka propolis kaynakları aramaktadır, örneğin Rusya'da Huş ağaçları

(*Betula verrucosa*), Brezilya’da *Baccharis* türleri propolis kaynağı olabilmektedir (139). İşlenmemiş propolisın toplandığı kaynağı göre çeşitlilik gösteren bileşiminde, %50 reçine, % 30 balmumu, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 organik artıkları da içeren çeşitli diğ er maddeler bulunmaktadır (146 - 149).

4.7.4. Propolisın Biyolojik Etkileri

Propolis sağık alanında ilk kez eski çağlarda Yunanlılar tarafından doğıal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (11). Yıllar boyunca propolis, insanlar tarafından değışik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (150). Propolisın biyolojik etkisi, polifenoller, flovonoid aglikonları, fenolik asit ve esterleri, kafeik asit ve esterleri, fenolik aldehitler ve ketonlar doğıal biyoaktif kimyasalları olarak atfedilmiştir (151, 152). Propolisın yapısında bulunan bazı bileşiklerin biyolojik aktiviteleri Tablo 3’ de gösterilmiştir.

Propolisın farmakolojik aktivitesi dört ana sınıfa ayrılabilir. Bunlar; biyolojik polimerlere bağlanma eğilimi, elektron taşınmasının hızlandırılması, ağır metal iyonlara bağlanması ve serbest radikalleri tutma kabiliyetidir. Bu özelliklerinden dolayı propolis; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, sitotoksik, immünomodülatör, antiülser, antihepatotoksik, lokal anestezik, antitümör, antikanser, immünostimülatör gibi biyolojik aktiviteler göstermektedir. Ayrıca, halk tıbbında popüler bir ilaç olarak, apiterapide, biokozmetikte ve ilaç sanayinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (137, 153 - 155).

Kafeik asit fenil esteri (CAPE), kanser hücrelerinin apoptoz metastazı ve radyasyon duyarlılığı gibi birçok farklı biyolojik özellikleri ile propolisın biyolojik yönden aktif bileşenlerinden olduğı tesbil edilmiştir (156). Propolis ekstraktı ile yapılan tedaviden sonra antikor üretimi, T lenfosit uyarımı, periferel lenfosit proliferasyonu ve fagositoz yüzdesinin arttığı rapor edilmiştir (157). Propolisın antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antiparazitik, antioksidan, antiinflamatuvar, sitotoksik, kondroprotektif, antitümörel, antiülseratif ve immünomodülatör özellikleri olduğı da bildirilmiştir (158).

Tablo 3. Propolisin yapısında bulunan bazı bileşikler ve biyolojik aktiviteleri

Kimyasal Madde	Etkileri
Flavonoidler	Kılcal damarların geçirgenliğini azaltma ve ateş düşürücü etki
Krizin	Antioksidan, antihemorajik ve antimikrobiyal etki
Apigenin	Antitümoral etki ve <i>Helicobacter pylori</i> ' ye karşı etki
Kuersetin	Gastrik ülserin iyileştirilmesi
Kempferid	Antiviral, antitümoral etki ve kılcal damarların güçlendirilmesi
Kamperol- 7, 4- dimetil eter	Spazmolitik etki
Ermani	Antimikotik etki
Galangin	Antimikotik etki
Pinochembrin	Bakteriyostatik ve antimikotik etki
Pinobanksin- 3- asetat	Antimikrobiyal etki
Pinostrobin	Antimikrobiyal etki
3, 4- dihidroksiflavanoidler	Lokal anestezi etki
Flavan- 3- ols	Kılcal damarları güçlendirici etki
Pectolinarinenin	Kılcal damarları güçlendirici etki
Luteolin	Spazmolitik etki
Luteolin'in 3, 4 - dimetil eteri	Antiviral etki, gastrik ülseri iyileştirici etki
Artepillin C	Spazmolitik
Eriodiktol	Antitümoral etki
Pinosylvin	Kalp yetmezliği önleyici ve iyileştirici etki
Ferulik asit	Antimikrobiyal etki
Isoferulik asit	Antibakteriyel etki, kollagenik etki
Benzoik asit	Antibakteriyel etki, <i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı etki
Sinamik asit	Bakteriyostatik, bakterisid ve antiseptik etki
P- kumarik asit benzil ester	<i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı etki
Kafeik asit	Antimikrobiyal etki
Prenil caffeat	Ateş düşürücü etki, antiviral ve antibakteriyel etki
Metil caffeat	Alerjen etki
Kafeik asit phenetil ester	Antitümoral etki
Clerodan' ın diterpenoit'i	Antitümoral etki
Uçucu bileşikler	Antitümoral ve antibakteriyel etki
	Ateş düşürücü etki ve antimikrobiyal etki

4.7.5. Propolisin Antioksidan Etkileri

Günümüzde propolisin araştırılan özelliklerinden biri de antioksidan etkisidir. Organizmada metabolik olaylar aşamasında kaçınılmaz bir şekilde ortaya çıkan serbest radikaller, hücresel yaşlanma ve buna bağlı olarak, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, artritis, parkinson, alzheimer gibi hastalıklara zemin hazırlarlar. Organizma ise başlıca antioksidan enzimler olan SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz), GPx (glutatyon peroksidaz), GR (glutatyon redüktaz) ile bunları temizler (159) .

Propolisin önemli bir bileşeni ve polifenolik bileşiklerden olan flavonoidlerin oranı propolisin tüm bileşenlerinin %25'inden fazladır. Flavonoidlerin propolis içindeki en etkili ve bol bulunan antioksidan madde olduğu belirtilmektedir. Serbest radikal temizleme özelliklerinden dolayı antioksidan özelliktedir ve lipit peroksidasyonunu inhibe ederler (160). Ayrıca, flavonoidlerin, antiinflamatuvar, antioksidan, serbest radikal temizleyici, antitümoral, hepatoprotektif, vasküloprotektif, antiülser, intestinal motilite ve sekresyon inhibisyonu, antiosteoporotik, antialerjik, antimikrobiyal ve immünomodülatuar özellikleri yayınlarda bildirilmiştir (161).

Yapılan çalışmalara göre, propolisin içerdiği kuersetin, flavonoidler, artepillin-C, kafeik asit ve CAPE gibi maddelerin anti tümöral etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (162, 163). Propolis uygun dozlarda kullanıldığında antikarsinojenik özellik gösteren bir yapıdadır, kanser tedavisinde de propolis ekstraktının kullanılabileceği belirtilmektedir (164). Ayrıca flavonoidlerin immün sistemi indükledikleri güçlü oksijen radikal temizleme özelliğinin olduğu da rapor edilmiştir (160). Propolis doku yenileyici, bakterisid ve fungisid özelliği ile kozmetikte çeşitli kremlerin yapımında da kullanılmaktadır (165).

Bütün bu faydalı özelliklerinin yanında propolisin toksik ve alerjik özellikleri de araştırılmış ve propolis kullanan kişilerde zehirlenme belirtisine rastlanmamıştır. Ancak, literatürde bazı alerjik reaksiyonların bildirildiği vaka raporları bulunmaktadır (154).

Propolisin en önemli antioksidan mekanizması; serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipit peroksidasyonuna neden olan polimerize zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile ROS (Reactive Oxygen Species)'ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (22, 166).

4.7.6. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler

Flavonoidler propolisten izole edilen bileşenlerin en geniş grubunu oluşturmaktadır. Ayrıca propolisin biyolojik aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludurlar (167). Günümüze kadar propolisten 38'den fazla flavonoid izole edilmiştir (136). Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6- C3- C6) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir. Böylelikle flavonoidlerin hidroksil gruplarının pozisyonu ve

sayılarının farklılığından dolayı antioksidan ve radikal yakalama fonksiyonları oldukça üst düzeydedir. Bu özellik, flavonoidler *in vivo/in vitro* olarak yapılan çalışmalarda kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada görev aldığı için sağlık alanında son zamanlarda tercih edilmektedir (168).

Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulmasının ve apoptozun indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, immun sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir (169, 170). Flavonoidler alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (136). Tablo 4’de propoliste bulunan polifenoller özetlenmiştir (171).

Tablo 4. Propolisin içerisinde bulunan polifenoller

Flavonlar	Flavonoller	Flavononlar	Dihidro –Flavoneller
Apigenin	Kaempferol	Pinosembrin	Pinobaksin
Akasetin	Kaempferid	Sakuranetin	Pinobaksin -3-asetat
Baisetin	Galangin	İsosakuranetin	Pinobanksin-7-metil eter
Krisin	İsohamnetin		
Luteolin	Ramnetin		
Tektokrisin	Mirisetin		
	Fisetin		
	Rutin		

Verilen bilgiler doğrultusunda çalışmamızda sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarına karşı propolisin koruyucu etkisinin araştırılması; oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını ve sisplatinin sıçan testis dokusunda meydana getirdiği histolojik ve apoptotik değişiklikler üzerinde propolisin iyileştirici etkisinin histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi planlandı.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

5.1.1. Deney Hayvanları

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve bu süreçten sonra çalışmaya başlandı (Tarih: 15.03.2015, Sayı: 1). Çalışmada kullanılan sıçanlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Çalışmada, 220 – 270 gr ağırlığında *Sprague dawley* cinsi 36 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenmesi, barınması ve deney süresince takibi için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan odalar kullanıldı. Çalışmada kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandığı için, deney sırasında sıçanlarda çevresel değişikliklerden kaynaklanan stres veya uyum problemi yaşanmadı.

5.1.2. Sıçanların Çalışma Süresince Bakımı ve Laboratuvar Şartları

Çalışmamızda, sıçanlar çalışma süresince her zamanki beslenme ve barınma koşullarında bulundular. Deney süresi boyunca laboratuvardaki sıcaklık ortalama 22 ± 2 °C, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak tutuldu. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda cerrahi araştırma merkezi hayvan odasında, uygun kafesler içinde barındırılarak serbestçe beslenmeleri ve su içmeleri sağlandı (içme suyu olarak, cerrahi araştırma merkezinde normal şartlarda da kullanılan çeşme suyu verildi ve standart sıçan yemi ile beslendi, ilave bir besin kullanılmadı). Çalışma süresince sıçanların barınmasında standart Tip III kafesler kullanıldı.



Resim 2. Deney hayvanlarının barınmasında kullanılan Tip III kafesler (A, B)

5.1.3. Çalışma Grupları

Çalışmada altı grup olup ve her bir grupta altışar adet sıçan rastgele olarak seçilip gruplara ayrıldı. Grupların özellikleri ve çalışma sırasında gruplardaki sıçanlara uygulanan işlemler aşağıdaki gibi düzenlendi.

1. Grup'a (kontrol) tek doz izotonik solüsyon i.p olarak uygulandı.
2. Grup'a (Sisplatin) tek doz 7 mg / kg sisplatin i.p. olarak uygulandı (172).
3. Grup'a (Propolis 50 mg/kg) deney süresi boyunca (14 gün) propolis 50 mg/ kg/gün oral yol ile uygulandı (173).
4. Grup'a (Propolis 100 mg/kg) deney süresi boyunca (14 gün) propolis 100 mg/ kg/gün oral yol ile uygulandı (174).
5. Grup'a (Sisplatin + Propolis 50 mg/kg) tek doz 7 mg / kg sisplatin i.p. olarak uygulandı, deney süresi boyunca (14 gün) propolis 50 mg/ kg/gün oral yol ile verildi.
6. Grup'a (Sisplatin + Propolis 100 mg/kg) tek doz 7 mg / kg sisplatin i.p. olarak uygulandı, deney süresi boyunca (14 gün) propolis 100 mg/ kg/gün oral yol ile verildi.

Deney grupları ve uygun işlemler Tablo 5' de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışma grupları ve özellikleri

Gruplar	Uygulama	Denek sayısı
1. Grup	Kontrol	6
2. Grup	Sisplatin	6
3. Grup	Propolis 50 mg/kg	6
4. Grup	Propolis 100 mg/kg	6
5. Grup	Sisplatin + Propolis 50 mg/kg	6
6. Grup	Sisplatin + Propolis 100 mg/kg	6

5.1.4. Propolisin İzole Edilmesi

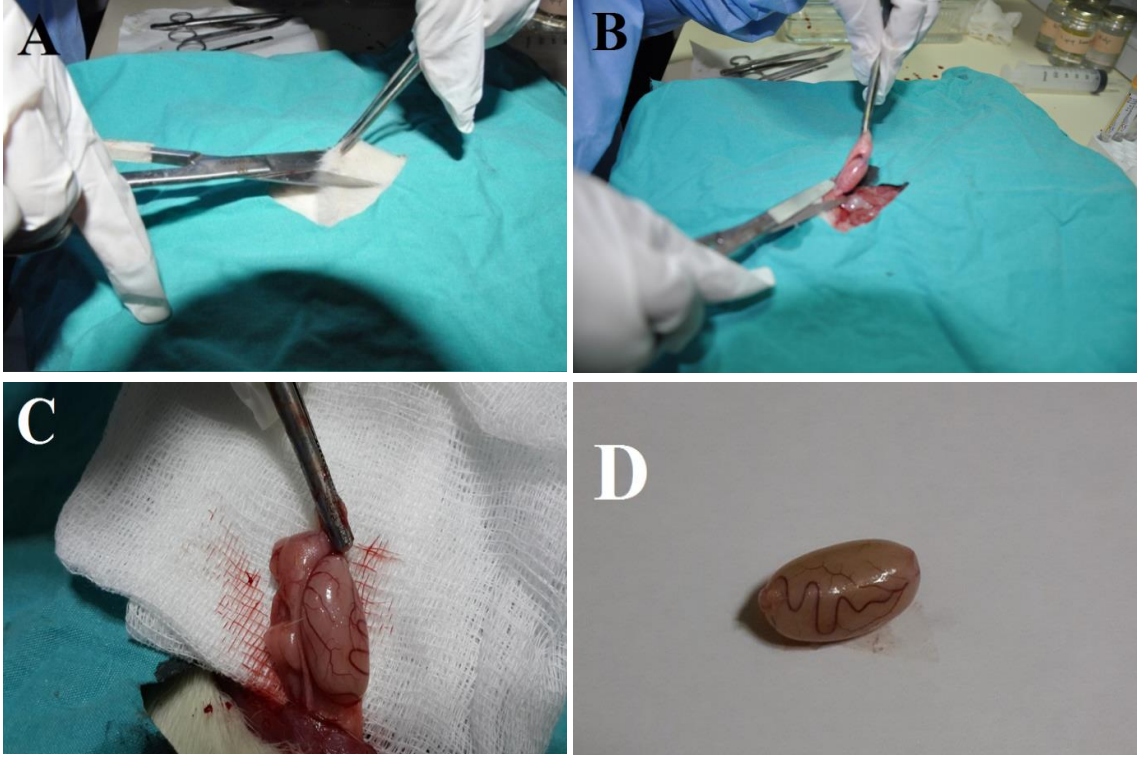
Fanus Gıda (Merkez/Trabzon) tarafından, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanarak temin edilen ve buzdolabında -20 °C'de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, öğütücüde toz haline getirdi ve -20 °C'de tekrar donduruldu. 10 g toz propolis balon jojeye alınarak ve son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı. Karışım iyice vortekslelendikten sonra 60 °C'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışım 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek, süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldükten sonra 0,22 mikrolitrelik filtrelerden geçirildi. Filtratlar daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20 °C'de, karanlıkta saklandı (136, 175).

5.1.6. Bouin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

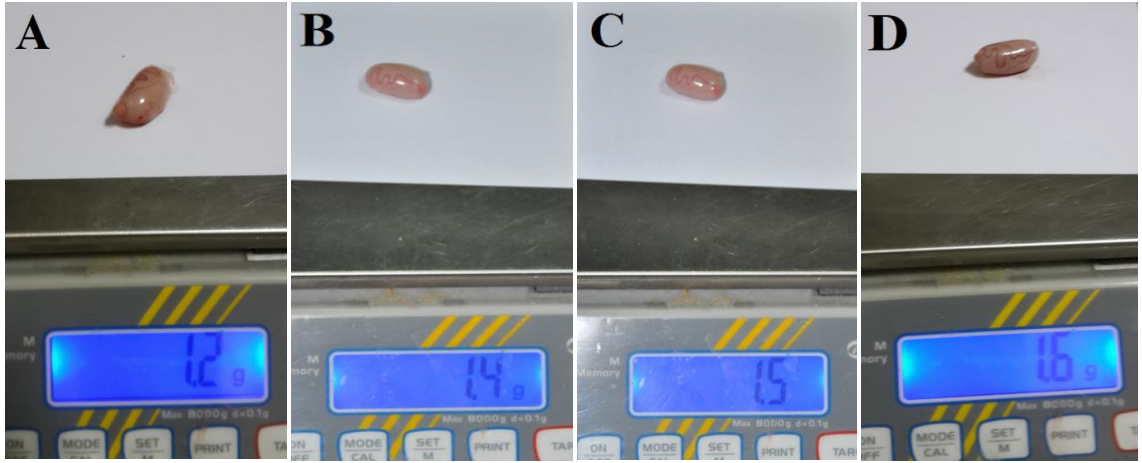
Testis dokusunun tespitinde kullanılacak Bouin solüsyonu şu şekilde hazırlandı. İlk önce 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi 75 ml formaldehit (% 37) ile karıştırıldı. Sonra üzerine yavaşça 5 ml glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı (176).

5.1.5. Testis Dokularının Elde Edilmesi

Tüm sıçanlar deney süresinin bitiminde (14 gün sonunda) tartıldıktan sonra derin anestezi eşliğinde kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edilerek steril şartlar altında testisler çıkarıldı (Resim 3). Trimlenerek etrafındaki dokularından (yağ dokuları ve eklenti bezlerinden seminal bez ile ventral prostat çıkarılarak) temizlenen testisler hassas terazide tartıldı. Veriler alındıktan sonra, sağ testisler vertikal olarak ikiye bölündü ve testislerin yarısı histolojik incelemeler için Bouin tespit solüsyonuna alındı.



Resim 3. Testislerin çıkarılması ve makroskopik görünümleri (A, B, C, D)



Resim 4. Testislerin ağırlıkları (A, B, C, D)

5.1.7. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alma ve boyama işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Burada, Bouin solüsyonuna alınan testis dokuları üç gün ışık almayan ve kuru oda sıcaklığındaki ortamda saklandı. Daha sonra aşağıdaki gibi sırası, süresi ve dereceleri verilen alkollerden ve ksilen basamaklarından geçirilerek parafin bloklar haline getirildi.

Tablo 6. Dokuların takibi

Dokuların Takibi	
İşlem	Süre
1. % 70' lik alkol	1 gün
3. % 96' lık alkol	1 gün
4. % 100' lük alkol	1 gün
5. % 100' lük alkol	1 saat
6. Ksilen	2 kez 5 dakika
7. Eritilmiş parafin içerisinde 58 °C (etüvde)	3 kez, 15 dakika bekletme ve sonra etüv içerisinde 2 saat inkübasyon.
8. Parafinde bloklama.	

5.1.8. Kesitlerin Alınması ve Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

Her gruptan alınan testis dokuları, Bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra yukarıdaki işlemlerden geçirildi. Öncelikle tam otomatik mikrotom (LEICA RM 2255, USA) yardımıyla dokuya ulaşana kadar 20 µm' lik kesitlerle parafin bloklar trimlendi ve dokuya varınca dokudan 5 µm' lik ince kesitler alındı. Kesitler 45 °C' de benmari içindeki sıcak su üzerinde kırışıkların açılması için bekletilerek lam üzerine alındı. Lam üzerine alınan dokular Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanması için zembile yerleştirilerek parafinin erimesi için bir saat 58 °C etüvde bekletildi ve dokular daha sonra sırasıyla aşağıdaki rutin histolojik takip işlem serilerinden geçirildi.

Tablo 7. Hematoksilen eozin boyama yöntemi

Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi	
İşlem	Süre
1. Ksilen	5 dakika
2. Ksilen	5 dakika
3. % 100' lük alkol	5 dakika
4. % 96' lık alkol	5 dakika
5. % 70' lik alkol	5 dakika
6. Distile su	2-3 dakika
7. Hematoksilen	35 saniye
8. Musluk suyu	5 dakika
9. Asit alkol	1 kez batırılıp çıkarıldı
10. Distile su	1 dakika
11. Amonyaklı su	10 saniye
12. Distile su	1 dakika
13. Eozin	30 saniye
14. Distile su	1 dakika
15. % 70' lik alkol	5 dakika
16. % 96' lık alkol	5 dakika
17. % 100' lük alkol	5 dakika
18. Ksilen	5 dakika
19. Ksilen	5 dakika
20. Entellan ile kapatılma.	

H&E ile boyanan kesitler Entellan ile kapatıldıktan ve kuruduktan sonra incelemeye hazır hale getirildi; preparatlarda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı ölçüldü. Ölçümler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji Laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskobunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Yine aynı mikroskopta seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alanlar incelendi; mikroskobik resimler çekildi ve çekilen fotoğraflar bilgisayara kaydedildi.

5.1.9. Epididimal Sperm Sayısı, Motilite, Vitalite ve Morfoloji Yönünden Değerlendirme

Erkek infertilitesi değerlendirilirken gerekli olan en önemli parametre sperm sayısının, hareketliliğinin, canlılığının ve morfolojisinin analiz edilmesidir. Günümüzde Neubauer hemositometre ve makler kamarası ile yapılan iki sperm analiz metodu geçerliliği vardır. Biz sayımlarımızı Makler kamarası (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel) ile yaptık. Makler kamarası 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm analizi için üretilmiştir. Kamaranın semen analizi yapıldığı kısım sperm hücrelerinin üst üste gelmesini önlemesi ve sadece yatay yönde hareket etmesini sağlamaktadır. Bu alan 10µm aralığındadır. Ayrıca sayımın yapılabilmesi için herbiri 0.1x0.1mm olan 10x10 şeklinde 100 kareden oluşmaktadır. Bu makler sistemi, sperm sayısını ve hareketliliğini hesaplamak için kolay bir yöntem sunmaktadır (177).

Morfoloji değerlendirme, Dr. Thinus Kruger ve arkadaşlarının yaptığı sperm morfolojisinin sınıflandırılması metodu ile yapılmıştır. Bu metoda göre % 4 ve daha fazla sayıda normal sperm hücresi olması halinde semen analizi morfolojik yönden normal statü de değerlendirilmiştir (178).

Çalışmamızda epididimden elde edilen spermelerin sayı, hareketlilik, canlılık ve morfoloji analizi şu şekilde yapılmıştır. Her grup ve gruplardaki her deney hayvanı için hazırlanmış petri kaplarına pH'sı 7,5 olan tris tampon çözümü içerisinde epididimisler parçalanarak 10-30 dakika sıcaklığı 37 C°'de bekletilip spermelerin yüzdürülmesi sağlandı. Ardından sperm sayısı ve hareketliliği için makler kamarasına bir damla (4-7µl) damlatıldı ve makler kamarasının kapağı kapatılarak ışık mikroskopunda (Olympus CX 31, Japan) 20X büyütmede 10 kare içerisinde hareketli ve hareketsiz sperm sayılıp 10^6 (milyon) ile çarpılarak sperm sayı analizi, hareketli ve hareketsiz spermelerin % oranı hesaplanarak motilite analizi yapıldı. Vitalite için lam üzerine 1 damla semen ve 1 damla %1'lik eozin-y damlatılarak karışması sağlandı lamel ile kapatılıp ardından her örnek için toplamda 100 adet olmak üzere canlı (eozin-y ile boyanmayan) ve cansız (eozin-y ile boyanan) sperm sayılarak canlılık analizi yapıldı. Morfolojik analiz için elde edilen semen örneği 3 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant kısmından 0,5 ml alınarak lam üzerine yayılıp kurutuldu. Daha sonra kurutulan preparatlar 3 dakika etanol fiksasyonunun ardından %1'lik eozin-y ile boyandı. Her deney hayvanı

için hazırlanan preperatlar faz atamanlı ışık mikroskobunda 100X büyütmede immersion yağı yardımı ile 200'er adet sperm sayıldı. Bu sayımda görülen normal yapıdaki spermilerin % oranı hesaplanıp morfojik analiz yapıldı (179).



Resim 5. Makler sayım kamerası ışık mikroskobu ve sperm sayımı

5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler

Çalışmada yer alan kontrol, sisplatin, propolis 50 mg/kg, propolis 100 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait sıçanların testis dokularındaki apoptozun değerlendirilmesi için TUNEL tekniği kullanıldı. Bu teknikle seminifer tübülün germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonu belirlendi. Homojen boyanmış kahverengi nukleuslu TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Her testiste 10 seminifer tübüldeki TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısına bakılıp apoptotik % (apoptotik indeks=AI) hesaplandı (180). Bu hesaplama aşağıdaki şekilde formülize edilebilir.

$$AI = \frac{\text{TUNEL (+) hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$$

5.2.1. TUNEL Boyama

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 8). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyama için In situ cell death detection kit, AP kullanıldı [11 684 809 910 Roche (Mannheim, Germany)]. Bu boyama için lam üzerine alınan 5 µm' lik kesitler bir saat boyunca 60 °C'lik etüvde deparafinize edildikten sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

Tablo 8. TUNEL boyama yöntemi

TUNEL Boyama Yöntemi	
<u>İşlem</u>	<u>Süre</u>
1. Ksilende inkübasyon (oda ısısı)	3 kez 5 dakika
2. % 100 etanol	2 kez 5 dakika
3. % 95 etanol	2 kez 5 dakika
4. % 70 etanol	2 kez 5 dakika
5. Distile su ile yıkama	
6. 20 µg/ml Proteinase K (oda ısısı)	15 dakika
7. PBS (phosphate buffer solution)' de yıkama	
8. % 3 H ₂ O ₂ ' de	15 dakika bekletme
9. Distile su ile yıkama	
10. PBS' de	2 kez 5 dakika bekletme
11. Large Volume UV (ultraviyole ışın) blok (oda ısısı)	10 dakika bekletme
12. 75 µg Terminal deoxinucleotidyl Transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplama ve 37 °C' lik etüvde PBS' de yıkama	1.5 saat nemli ortamda bekletme
13. 100 µl converter peroksidaz ile dokuyu kapatacak şekilde kaplama ve 37 °C' lik etüvde	1.5 saat inkübasyon
14. PBS' de	3 kez 5 dakika yıkama
15. 100 µl DAP ile	5 dakika karanlıkta oda ısısında beklet
16. Distile suda	1 kez 2 kez yıkama
17. H&E ile	15 saniye boyama ve çeşme suyu ile yıkama
18. % 70' lik etanol' de	2 kez 5 dakika bekletme
19. % 95 etanol' de	2 kez 5 dakika bekletme
20. % 100 etanol' de	2 kez 5 dakika bekletme
21. Ksilen' de	2 kez 5 dakika bekletme
22. Kurutulup kapatma	

5.3. Testis Hasarının Değerlendirilmesinde Skarlama Yöntemi

Testis dokusundaki histopatolojik hasar değerlendirilmesi için Johnsen Skarlama Sistemi (Tablo 9) kullanıldı (181). Skarlama H&E boyalı kesitlerde yapıldı.

Tablo 9. Johnsen skarlama sistemi

Johnsen Skarlama Sistemi
10 Olgun sperm hücreleri ile tanımlanmış spermatogenez
9 Düzensiz bir epitel ile birlikte bir miktar sperm hücresi
8 Birkaç sperm hücresi (<5-10)
7 Sperm hücreleri yok, spermatid var
6 Sperm hücreleri yok, birkaç spermatid var (<5-10)
5 Sperm hücreleri ya da spermatid yok, spermatosit var
4 Sperm hücreleri ya da spermatid yok, birkaç spermatosit var (<5)
3 Sadece spermatogonyum var
2 Sadece Sertoli hücreleri var
1 Tübüllerde hiç hücre yok

5.4. Biyokimyasal İşlemler

5.4.1. Ratlarda Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Rat serum örnekleri biyokimyasal analizler yapılana kadar – 80 C⁰’ de saklandı. Serum örneklerinde malondialdehit miktarı Yagi (1984) tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metodu kullanılarak tayin edildi. Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungustik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Deneyin yapılışı:

1. Bir deney tüpüne 150 µL serum, 1.2 mL H₂SO₄ ve 150 mL fosfotungustik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi.
2. Karışım 1500 g’ de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar vortekslendi.
4. Tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100 °C’ de inkübe edildi.

5. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g' de 10 dk. santrifüjlendi.
6. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3, 2, 1, 0.5 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak serum MDA miktarı nmol MDA/mL olarak belirlendi (182).

5.4.2. Ratlarda doku Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Rat dokularında MDA düzeyi Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen metod ile tayin edildi.

Örneklerin Hazırlanışı:

Dokular tartılarak 0,5 mL/L triton-X 100 içeren %1,15 KCl çözeltisi ile homojenize edildi (% 10 ağırlık/hacim). Homojenizasyon için 9500 rpm (4x10s, 4°C)' de Ultra-Turrax homojenizatör (model T25, Janeand Kunkel, Germany) kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

1. 500 µL homojenata 3 mL % 1'lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı.
2. Karışıma 1 mL % 0,672'lik tiyobarbitürik asit (TBA) eklendikten sonra 45 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi.
3. 2 mL n-bütanol eklendi.
4. Oda sıcaklığında 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Organik faz alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3, 2, 1, 0.5 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nmol MDA/gram ıslak doku olarak hesaplandı (183).

5.4.3. Testis Dokularında Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat testis dokularında Glutasyon seviyesi, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik assay kit (Cayman Chemical Company Cat. No: 703002,

Lot No: 0454835) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbansları VERSA (Designed by molecular Divices in California, USA) marka mikro pleyt okuyucuda 410 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar GSH $\mu\text{M/g}$ doku cinsinden verildi (184).

5.4.4. Rat Testis Dokularında Katalaz Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat testis dokularında katalaz seviyesi, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik assay kit (Cayman Chemical Company Cat. No: 707002, Lot No: 0456229) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbansları VERSA (Designed by molecular Divices in California, USA) marka mikro pleyt okuyucuda 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar CAT (nmol/min/mg protein) cinsinden verildi (185).

5.4.5. Rat Testis Dokularında Süperoksit Dismutaz Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat testis dokularında Süperoksit Dismutaz seviyesi, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik assay kit (Cayman Chemical Company Cat. No:706002, Lot No: 0456037) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbansları VERSA (Designed by molecular Divices in California, USA) marka mikro pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar SOD (U/mg protein) cinsinden verildi (186).

5.4.6. Rat Serumlarında Testosteron Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat serumlarında testosteron seviyesi, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Cayman Chemical Company Cat. No: 582701, Lot No: 0454461) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbansları VERSA (Designed by molecular Divices in California, USA) marka mikro pleyt okuyucuda 412nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar testosteron (pg/mL) cinsinden verildi.

5.5. İstatistiksel Analizler

Sayısal Verilerin değerlendirilmesi bilgisayar için istatistik programı (GraphPad Prism™ software version 5.0, La Jolla, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Grupların çoklu varyans analizinde Kruskal- Wallis testi kullanılmıştır. Post test analizler için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait sıçanların testis ve vücut ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 10’ da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda hem vücut hem de testis ağırlıklarında kontrol, sisplatin, propolis 50 mg/kg, propolis 100 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg, sisplatin + propolis 100 mg/kg grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 10. Deney gruplarının vücut ve testis ağırlığına ait ortalama ve standart sapmalar

Gruplar	Başlangıç vücut ağırlığı (g)	Bitiş vücut ağırlığı (g)	Testis ağırlığı (g)
Kontrol	260,2 ± 17,14	303,5 ± 23,49	1,467 ± 0,2658
Sisplatin	255,3 ± 19,41	258,8 ± 33,08	1,317 ± 0,09832
Propolis 50 mg/kg	225,0 ± 17,63	288,7 ± 18,86	1,483 ± 0,1329
Propolis 100 mg/kg	224,5 ± 14,88	287,7 ± 14,21	1,417 ± 0,09832
Sisplatin + Propolis 50 mg/kg	274,3 ± 10,39	268,2 ± 27,63	1,500 ± 0,2366
Sisplatin + Propolis 100 mg/kg	257,2 ± 9,988	267,5 ± 25,93	1,250 ± 0,1871

6.2. Morfometrik Bulgular

6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait sıçanların testis dokusu olan seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığına ait ölçüm sonuçları Tablo 11’de verilmiştir. Seminifer tübül çapı, sisplatin grubu kontrol, propolis 100 mg/kg, ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Germinal epitel kalınlığı, sisplatin grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

6.2.2. Johnsen Skorumlama Sonuçları

Deney gruplarının testis hasar değerlendirmesi Johnsen Skorumlama Sistemi ile hesaplandı. Sonuçlar Tablo 11’ de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, Sisplatin grubu diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Konrtol grubunda sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($p>0,05$). Tedavi grupları olan sisplatin + propolis 50 mg/kg grubunda sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p>0,05$).

Tablo 11. Çalışma Gruplarına ait histolojik analizlerin sonuçları ve değerlendirilmesi ($p<0,05$)

Gruplar	Seminifer Tübül apı	Germinal Epitel Kalınlığı	Johnsen Skoru
Kontrol	299,7 ^a ± 11,73	87,23 ^a ± 2,587	9,633 ^a ± 0,08165
Sisplatin	272,5 ± 9,412	71,15 ± 6,457	6,917 ^a ± 0,2858
Propolis 50 mg/kg	285,3 ± 12,73	78,77 ^{a,b,c} ± 4,785	9,033 ^{a,b,c,d} ± 0,1366
Propolis 100 mg/kg	294,4 ^a ± 6,240	87,63 ^a ± 1684	9,517 ^a ± 0,1169
Sisplatin + Propolis 50 mg/kg	282,5 ^{b,c} ± 9,947	81,59 ^{c a,b,c} ± 4,315	8,783 ^{a,b,c} ± 0,2229
Sisplatin + Propolis 100 mg/kg	293,7 ^a ± 8,779	84,08 ^a ± 3,849	9,367 ^{c a,b,d,e} ± 0,1033

^a Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$).

^b Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$).

^c Propolis 100 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$).

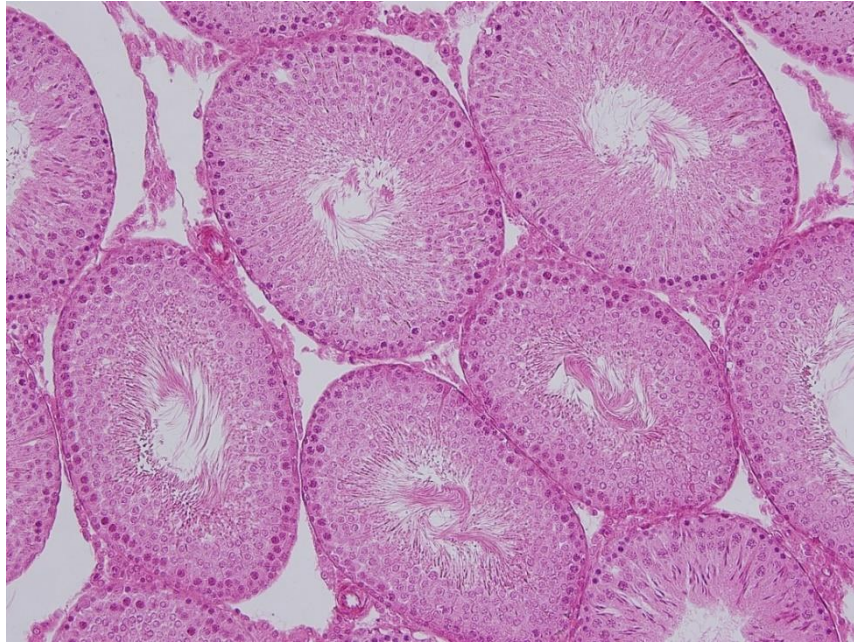
^d Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$).

^e Propolis 50 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$).

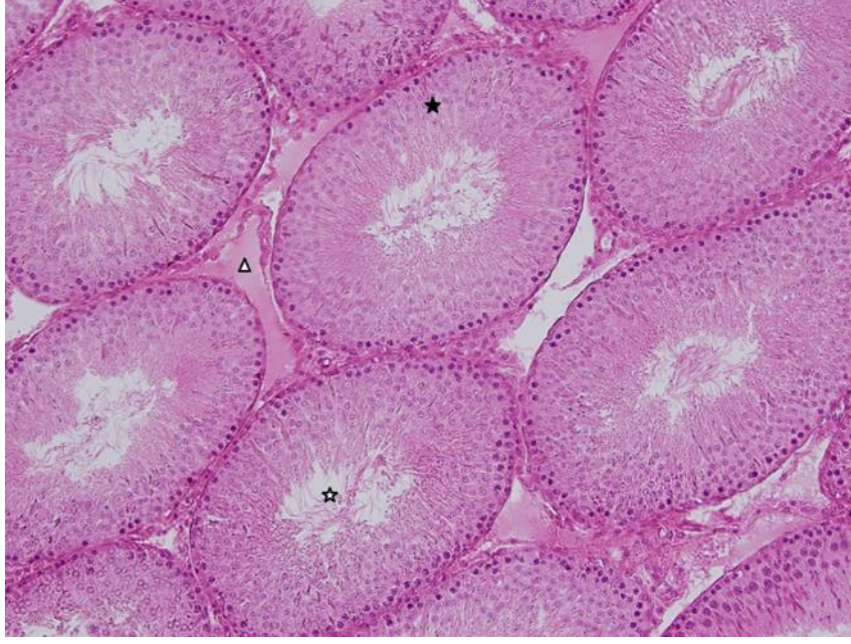
6.3. Morfolojik Bulgular

Testis dokusunun histopatolojik olarak değerlendirilmesinde; kontrol grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde seminifer tübüller içinde spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu ve normal morfolojide Leydig hücreleri gözlendi (Resim 6). Sisplatin grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde, seminifer tübüllerin lümeninde yoğun immatür germinal epitely hücreleri ve germinal epitelde yer yer açılmalar izlendi. İntertbler alanda yaygın ödem mevcuttu (Resim 7). Propolis 50 mg/kg grubuna ait sıçanların testis

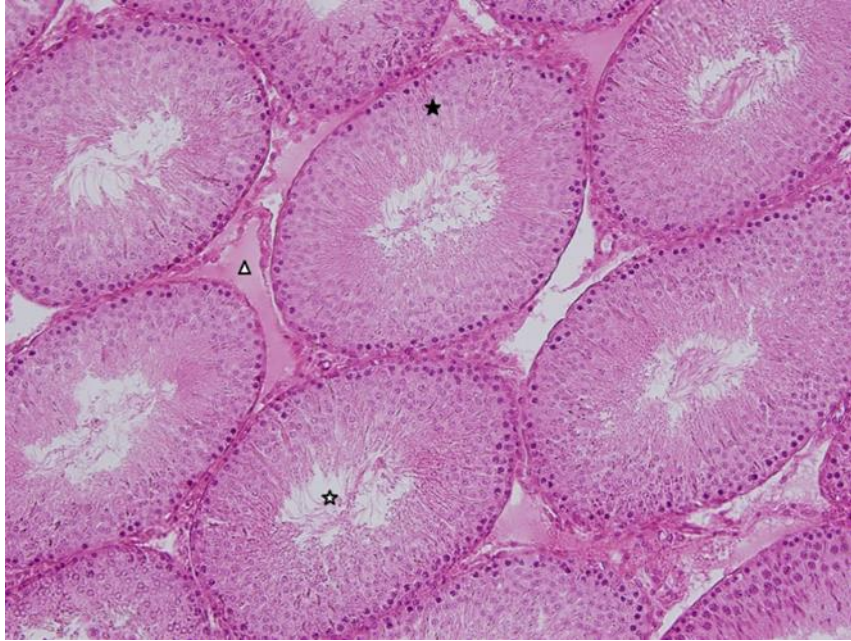
kesitlerinde seminifer tübüller içindeki spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alanda yer yer ödem olduğu görüldü (Resim 8). Propolis 100 mg/kg grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde, kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübüller içindeki spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu ve normal morfolojide Leydig hücreleri olduğu gözlendi (Resim 9). Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde bir kısım seminifer tübüllerin lümenine immatür germinal hücrelerin döküldüğü, diğerlerinin normale yakın yapıda seyrettiği görüldü. İntert b ler (interstisyel) alanda kısmi ödem izlendi (Resim 10). Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde seminifer tübüller içindeki spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, tübül yapısının bütünlüğünü koruduğu, az miktarda tübül lümeninde germinal epitel hücrelerinin bulunduğu izlendi. İntert b ler alanda az miktarda ödem görüldü (Resim 11).



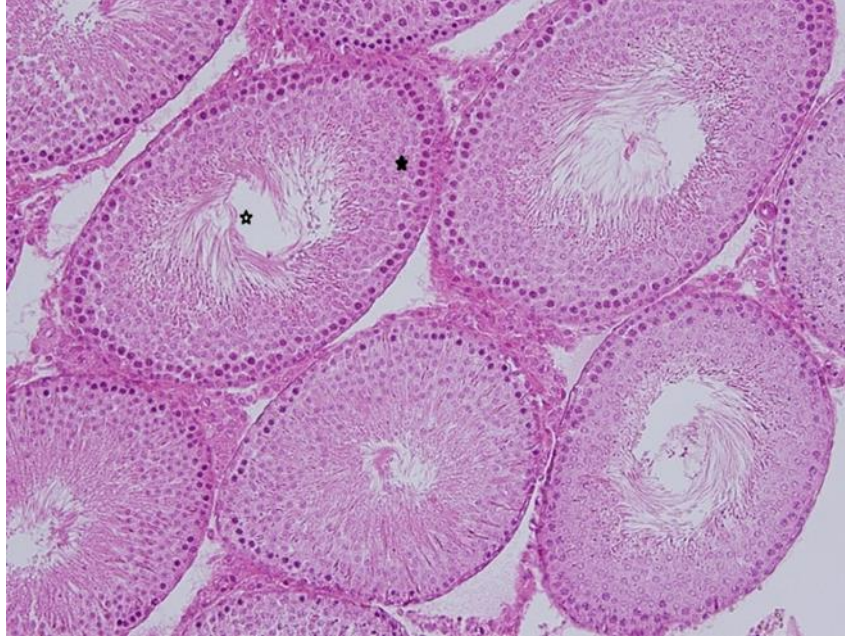
Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (H&E, X200)



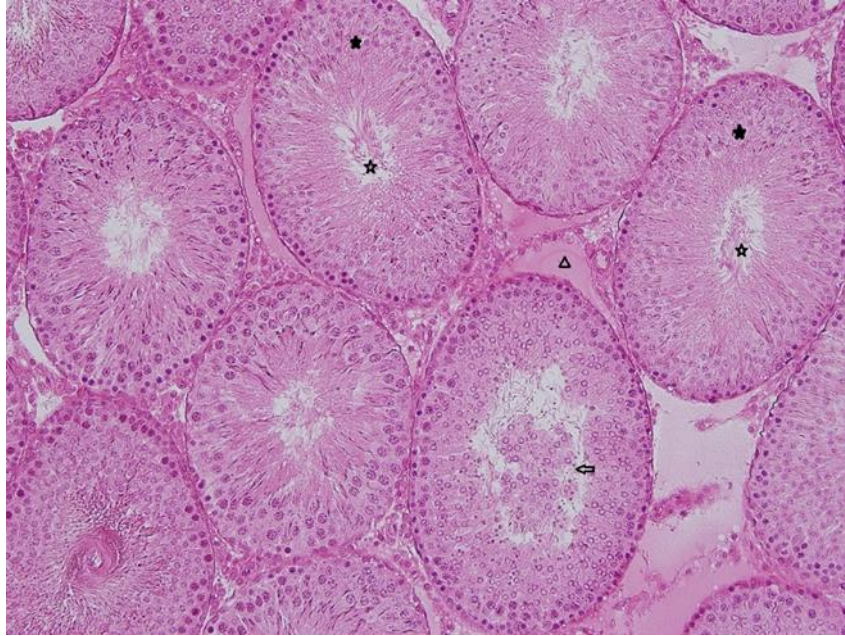
Resim 7. Sisplatin grubuna ait testis dokusu. Seminifer tübülün germinal epitelinde açılmalar (↓), Lümeneye dökülen germinal epitel hücreleri (⇐) ve ödem (Δ) (H&E, X200)



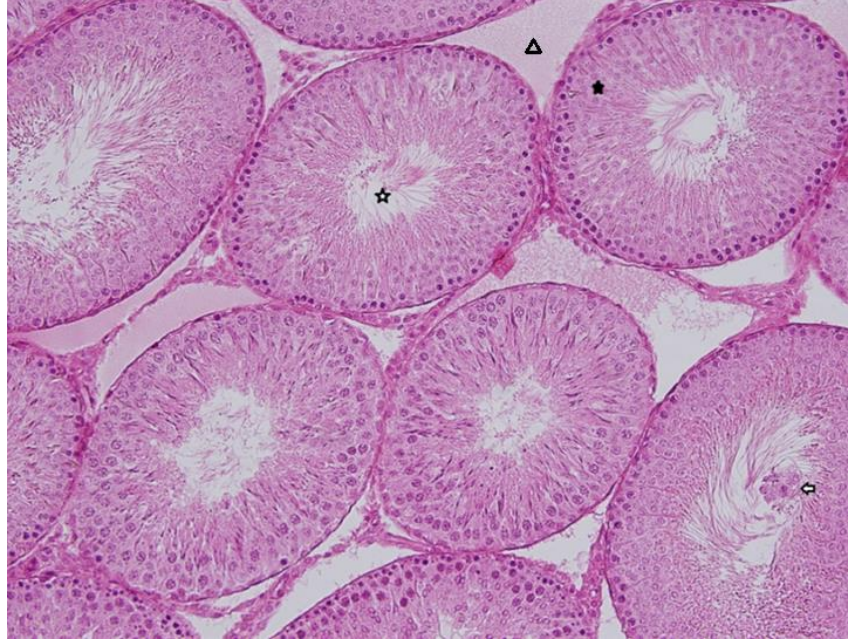
Resim 8. Propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (☆) ve ödem (Δ) (H&E, X200)



Resim 9. Propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (☆) (H&E, X200)



Resim 10. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (☆), lümene dökülen germinal epitel hücreleri (⇔) ve ödem (△) (H&E, X200)



Resim 11. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusu. Normal yapıdaki seminifer tübüller (★), spermatozoonlar (☆), lümene dökülen germinal epitel hücreleri (⇐) ve ödem (⇐) (H&E, X200)

Deney grupları testis dokularında TUNEL tekniği ile değerlendirilen AI sonuçları Tablo 12’de verildi. Bu değerlendirmeye göre; kontrol grubunda AI değeri sisplatin, propolis 50mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azdı. Sisplatin grubunda AI değerinin kontrol, propolis 50 mg/kg, propolis 100 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede arttığı görüldü.

Kontrol grubuna ait testis dokularında apoptoz az miktarda spermatogonyumlarda izlendi. Sisplatin grubunda apoptotik germinal hücrelerde yaygın olarak izlendi. Spermatogonyumlar yanında diğer spermatogenik hücrelerde ve seminifer tübül lümeninde izlenen germinal hücrelerinde de apoptoz gözlemlendi

Tedavi gruplarından sisplatin+propolis 50 mg/kg grubunda spermatogonyumların yanı sıra kısmen diğer spermatogenik hücrelerde de apoptoz gözlenirken, sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda ise kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edildi (Resim 12-17).

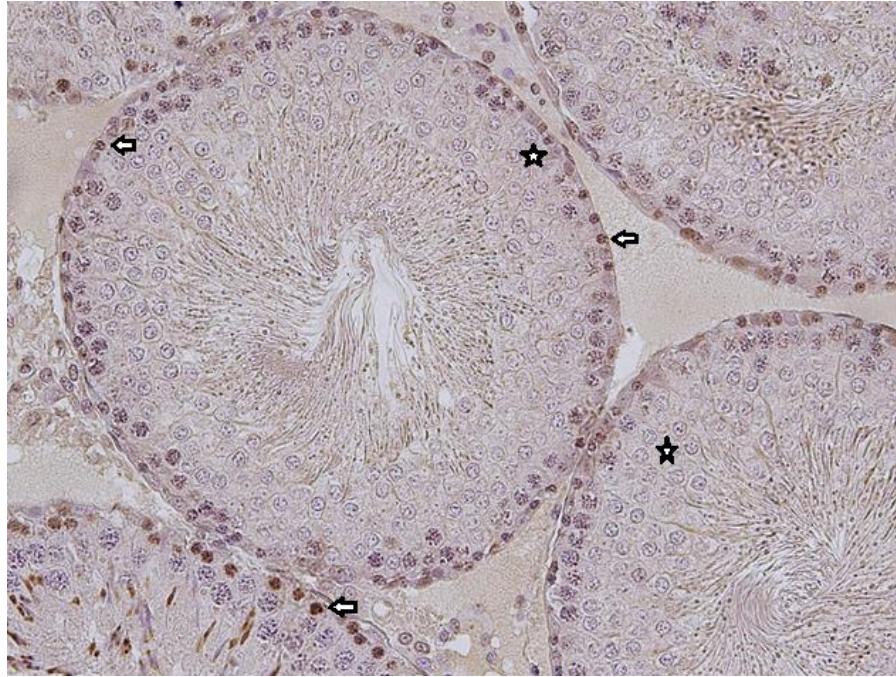
Tablo 12. Çalışma gruplarına ait apoptotik indeks değerlendirme sonuçları ($p<0.05$)

Gruplar	Apoptotik indeks
Kontrol	3,168 $\pm$ 0,8845
Sisplatin	25,04 ^a $\pm$ 1,145
Propolis 50 mg/kg	6,827 ^{a,b,c} $\pm$ 0,8557
Propolis 100 mg/kg	5,455 ^{b,c} $\pm$ 2,453
Sisplatin + Propolis 50 mg/kg	12,28 ^{a,b} $\pm$ 1,556
Sisplatin + Propolis 100 mg/kg	8,458 ^{a,b,c} $\pm$ 3,373

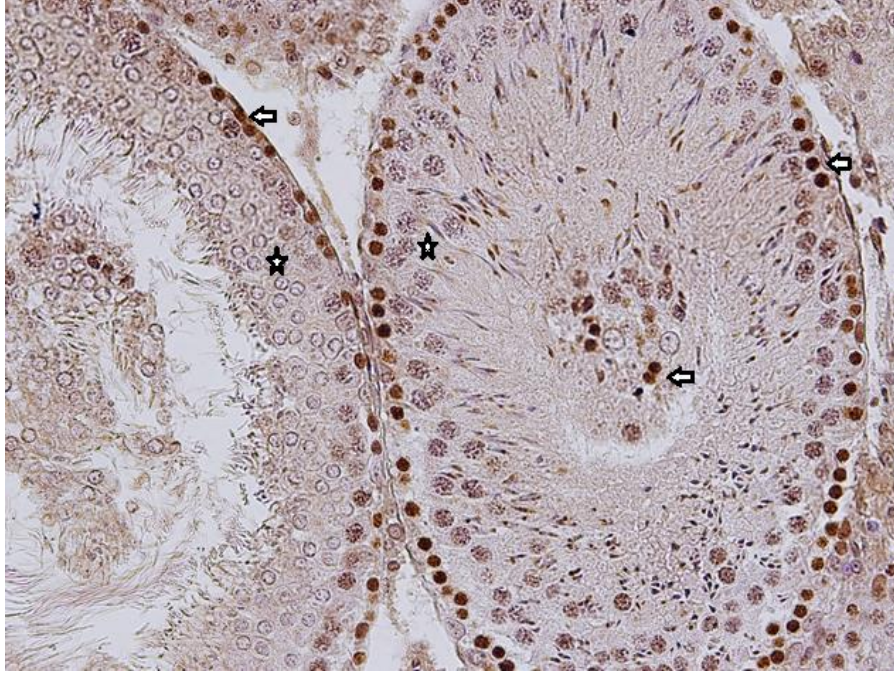
^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$).

^b Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$).

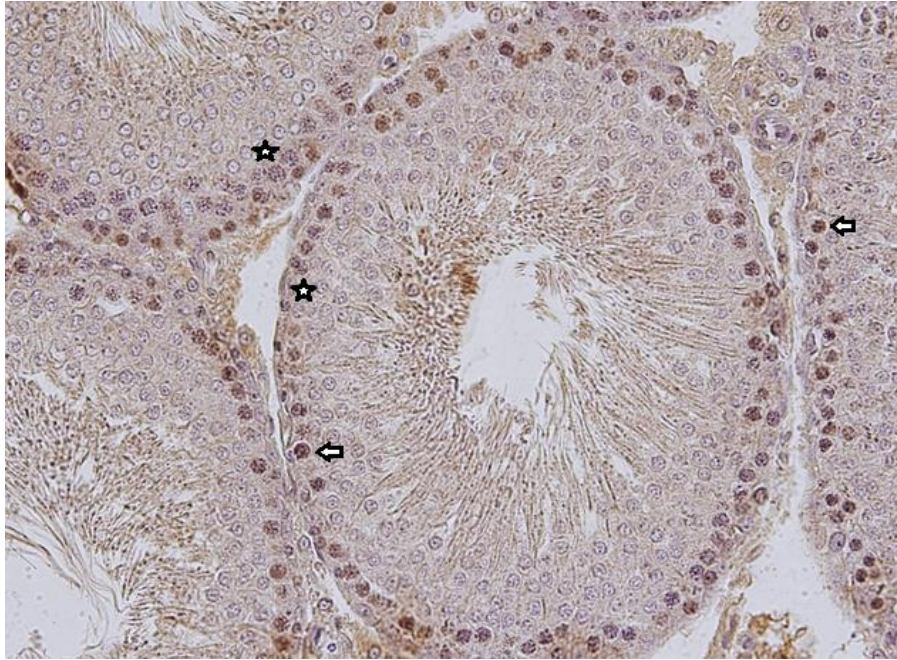
^c Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$).



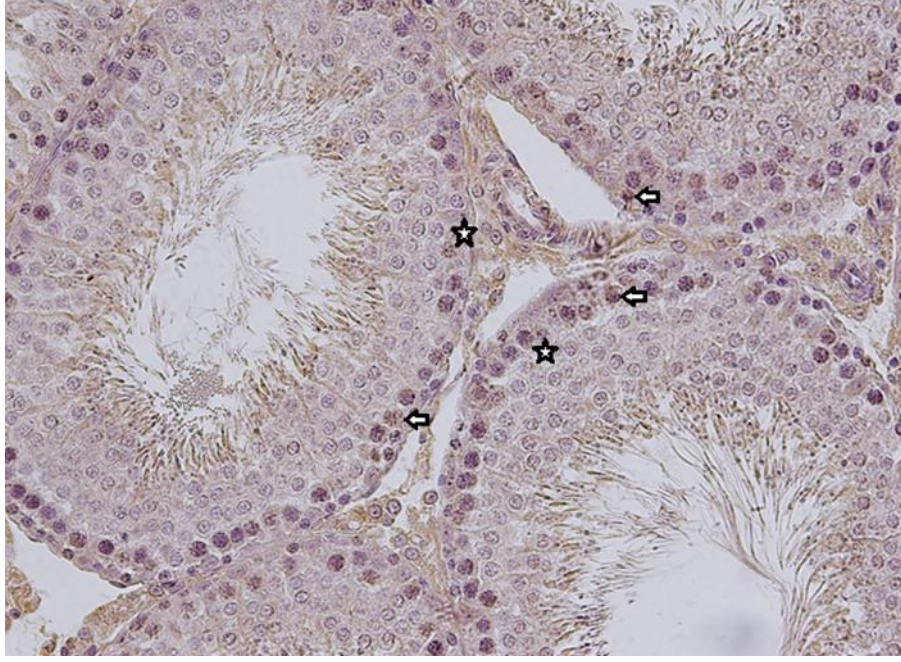
Resim 12. Kontrol grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (⇐), TUNEL (-) hücreler (☆) (TUNEL, X400)



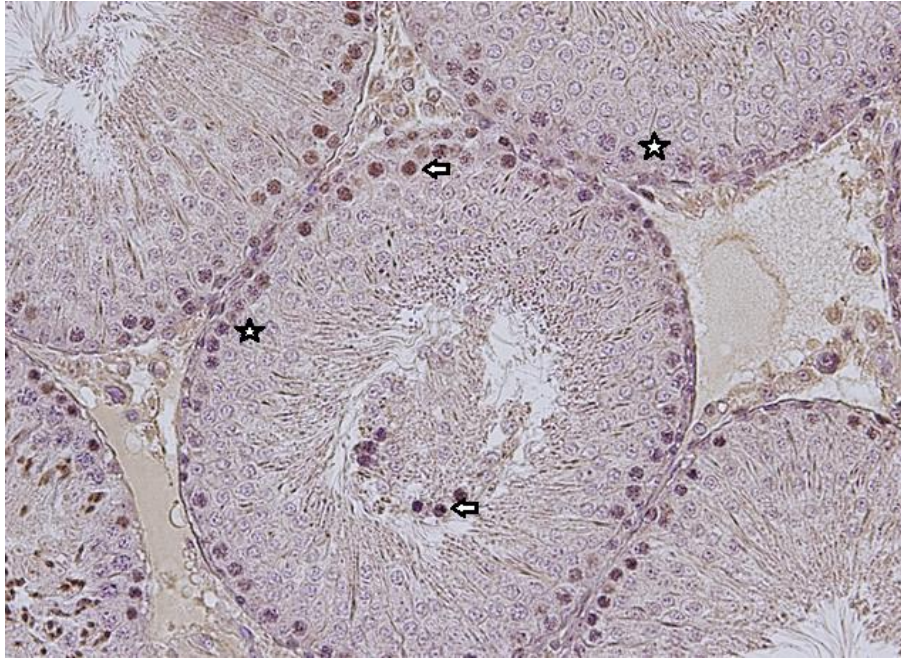
Resim 13. Sisplatin grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (↔), TUNEL (-) hücreler (☆) (TUNEL, X400)



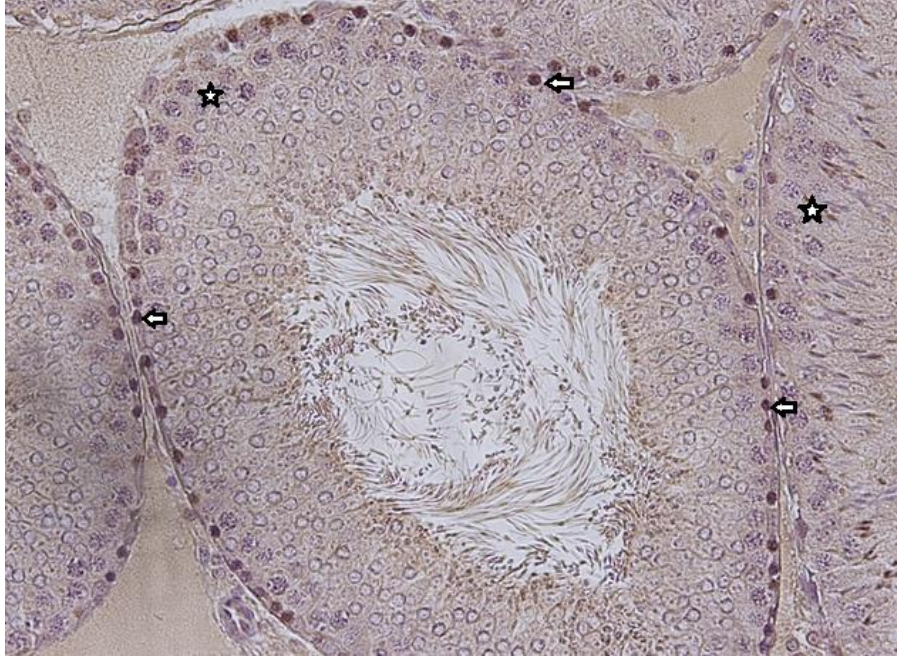
Resim 14. Propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (↔), TUNEL (-) hücreler (☆)(TUNEL, X400)



Resim 15. Propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (↔), TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)



Resim 16. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (↔) (TUNEL (-) hücreler (★) (TUNEL, X400)



Resim 17. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (↔) (TUNEL (-) hücreler (☆) (TUNEL, X400)

6.4. Semen Analizine Ait Bulgular

Semen analizine ait verilerin istatistiksel analiz sonuçları ve değerlendirilmesi Tablo 13'te verilmiştir. Sperm sayısı sisplatin grubunda kontrol, propolis 50 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Sperm hareketliliği sisplatin grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Anormal sperm morfolojisi kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede azalmış iken, sisplatin grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). Sperm canlılık değerlendirmesinde sisplatin grubu kontrol, propolis 50 mg/kg, propolis 100 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Ayrıca kontrol grubunda sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 13. Semen analizine ait bulgular

Gruplar	Sayı (x 10 6)		Hareketlilik (%)		Anormal		Canlılık (%)	
					Morfoloji oranı (%)			
Kontrol	21,83 ^a	± 5,672	62,35 _{a,c}	± 3,938	1,667 ^a	± 0,5164	60,33 ^a	± 5,125
Sisplatin	14,00	± 3,742	32,56	± 10,02	28,00	± 2,608	37,33 ^d	± 4,502
Propolis 50 mg/kg	24,17 ^a	± 5,382	60,75 _{a,c}	± 4,607	3,500 _{a,c,d,e}	± 0,5477	55,00 ^a	± 8,367
Propolis 100 mg/kg	22,83	± 2,041	61,92 _a	± 5,325	3,333 _{a,c,d,e}	± 0,5164	42,33 ^a	± 11,13
Sisplatin + Propolis 50 mg/kg	17,83 _{a,b}	± 2,714	54,59 _a	± 6,398	8,167 _{a,b,d,e}	± 0,7528	48,33 _{a,d}	± 4,274
Sisplatin + Propolis 100 mg/kg	18,50	± 4,087	61,35 _a	± 7,967	6,167 _{a,b,d}	± 1,169	52,00 ^a	± 9,789

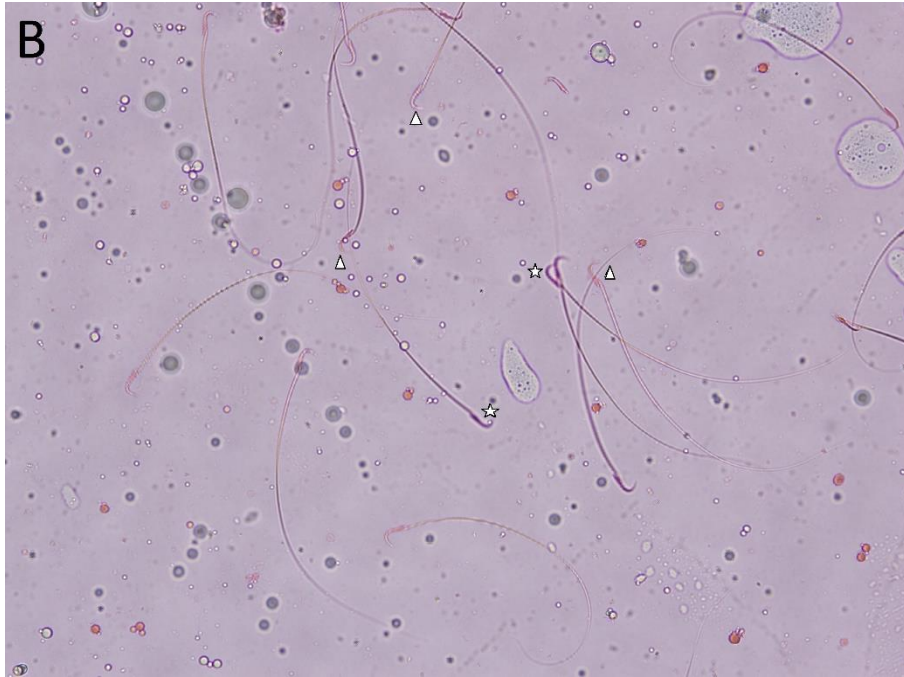
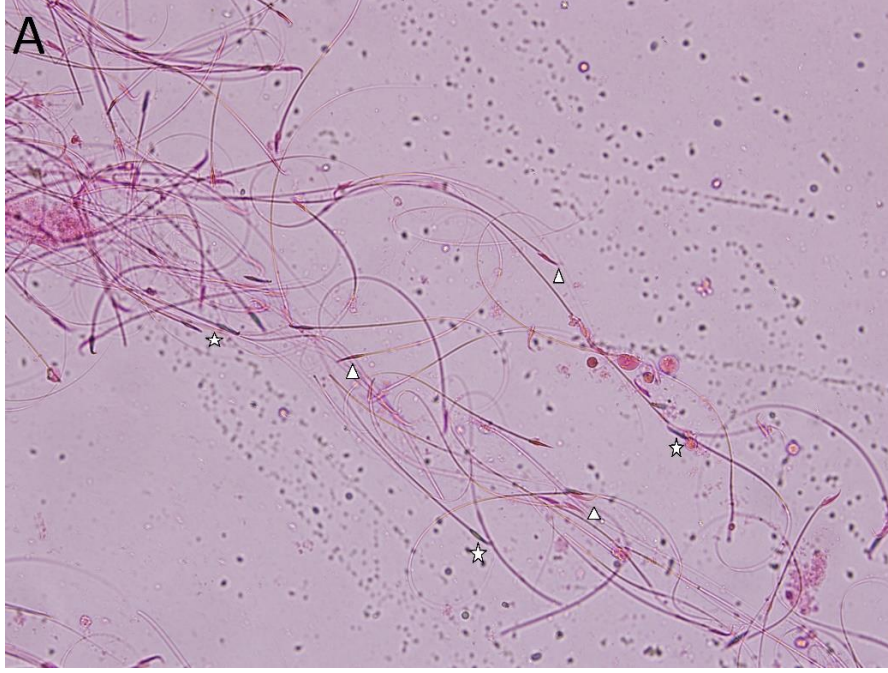
^a Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05.

^b Propolis 100 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05.

^c Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

^d Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

^e Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05.



Resim 18. Deney grubuna ait sperm hücreleri. Canlı (☆) ve cansız sperm hücreleri (Δ) (A, B) (eozin-y, X200)



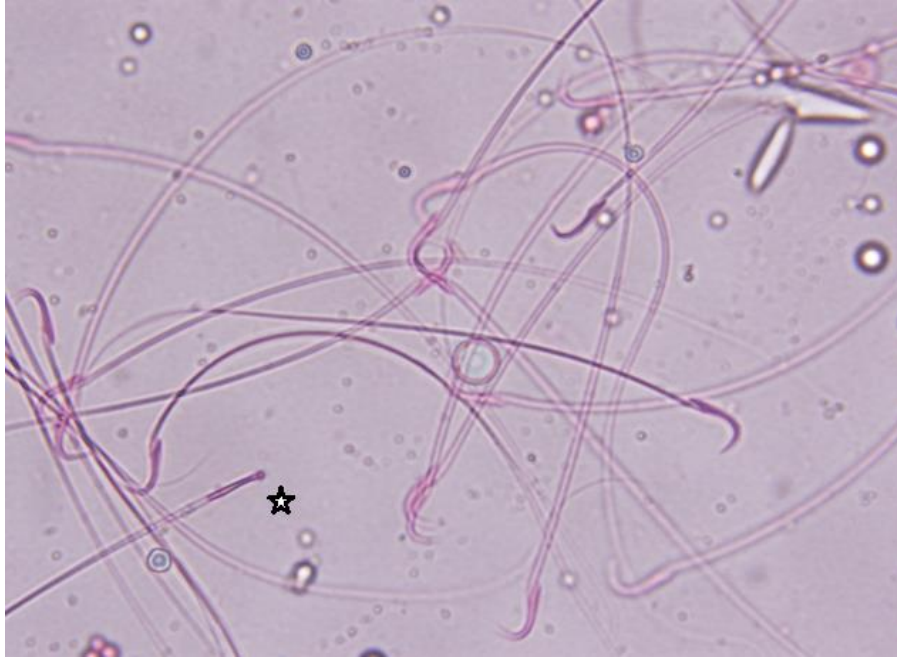
Resim 19. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki sperm hücreleri (eozin-y, X200)



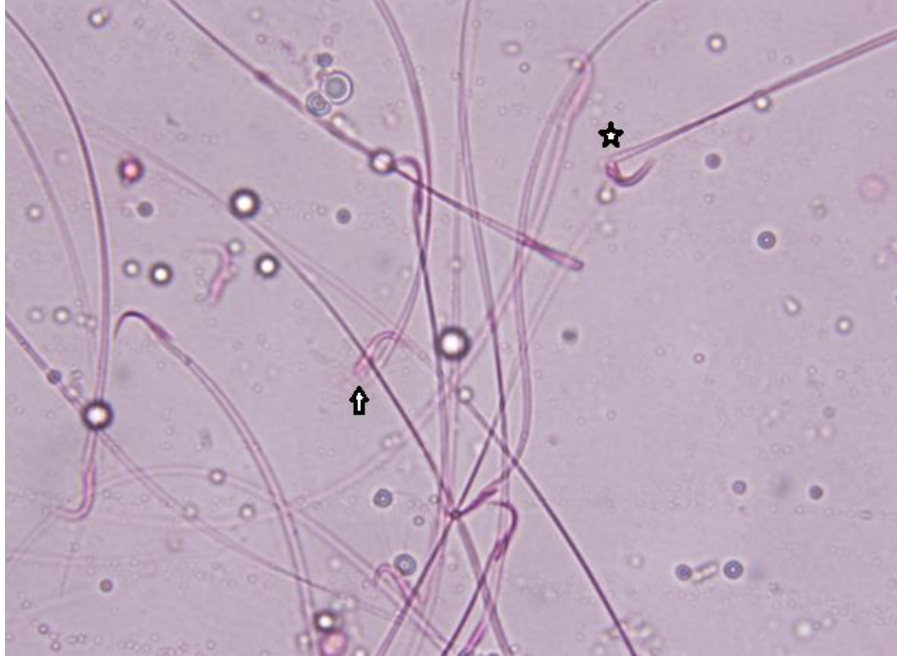
Resim 20. Sisplatin grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomali (☆) ve boyun anomali (↑) (eozin-y, X200)



Resim 21. Propolis 50 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomali (☆) (eozin-y, X200)



Resim 22. Propolis 100 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomali (☆) (eozin-y, X200)



Resim 23. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş anomalisi (☆) ve boyun anomalisi (↑) (eozin-y, X200)



Resim 24. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait sperm hücreleri. Baş onomalisi (☆) ve boyun anomalisi (↑) (eozin-y, X200)



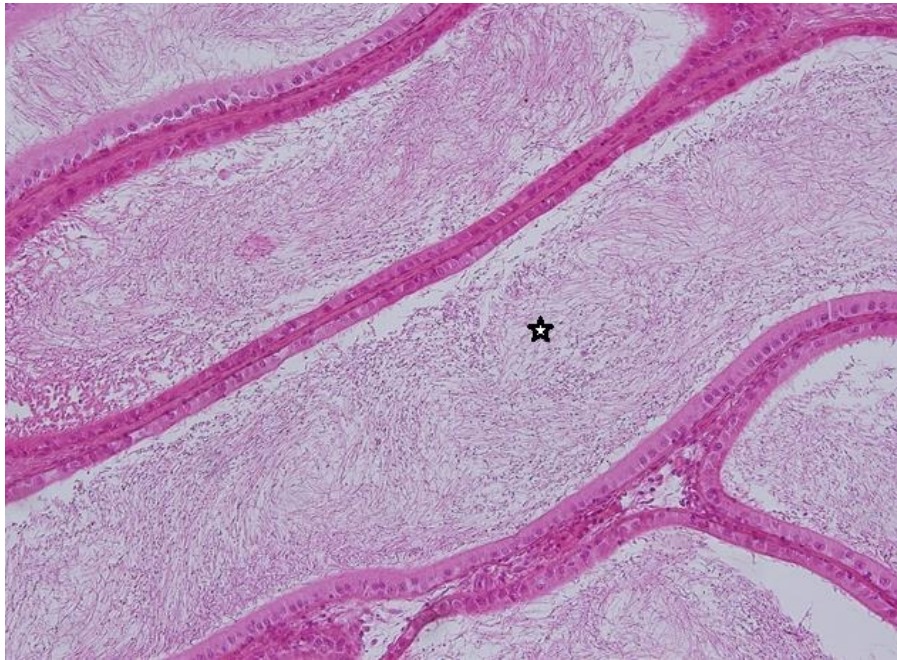
Resim 25. Kontrol grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (☆) (H&E, X200)



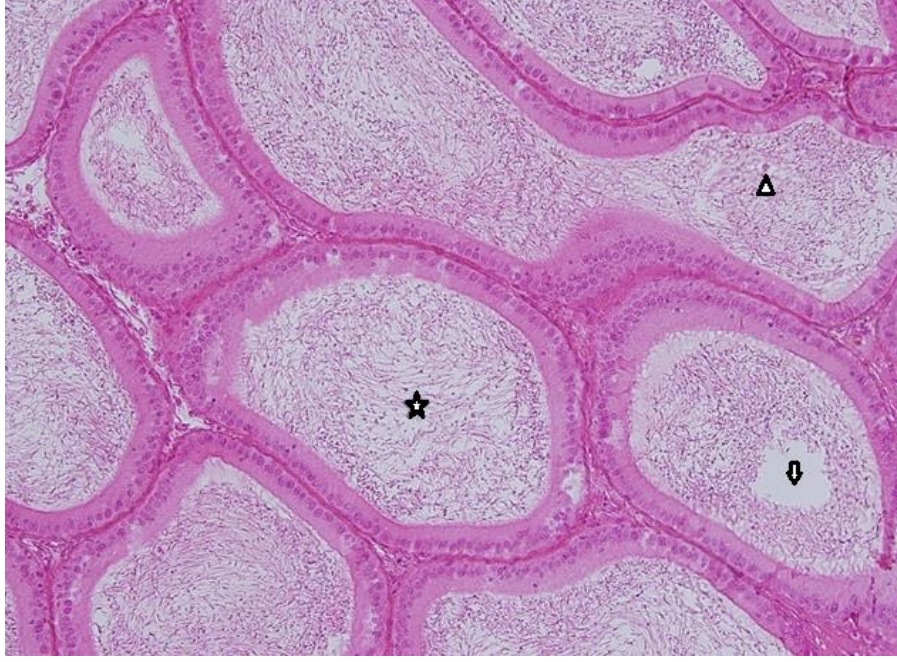
Resim 26. Sisplatin grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlarda azalma (↓) ve lümene dökülmüş spermatogenik hücreler (Δ) (H&E, X200)



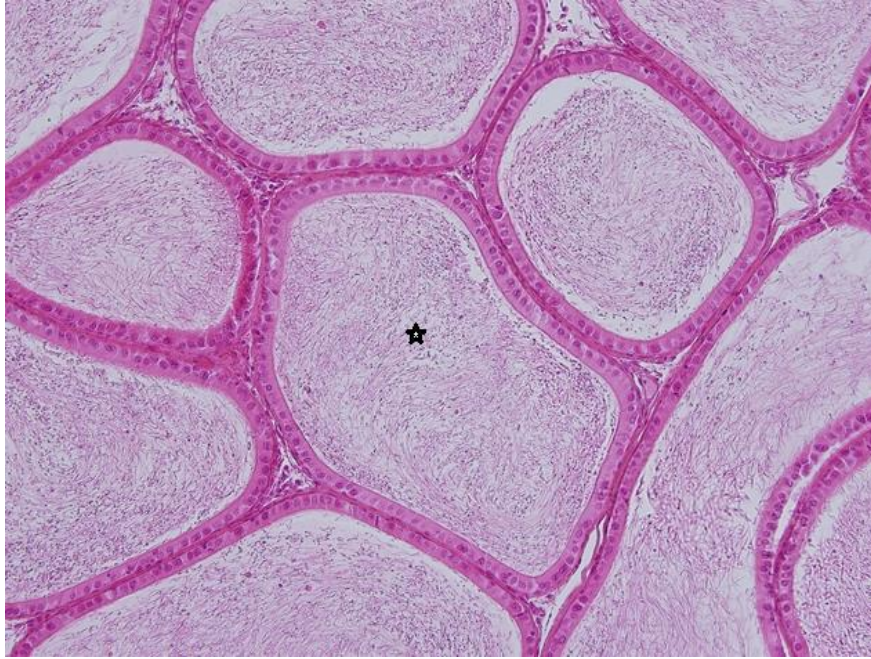
Resim 27. Propolis 50 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (☆)
(H&E, X200)



Resim 28. Propolis 100 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (☆)
(H&E, X200)



Resim 29. Sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (☆), spermatozoonlarda azalma (⇓) ve lümene dökülmüş spermatogenik hücreler (Δ) (H&E, X200)



Resim 30. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait epididimis dokusu. Spermatozoonlar (☆) (H&E, X200)

6.5. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Çalışmamızda deney gruplarından alınan kan örneklerinde serum MDA, serum testosteron ve doku örneklerinden doku MDA, doku SOD, doku CAT ve doku GSH sonuçlarına ilişkin bilgiler Tablo 14’da verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre serum MDA düzeyi; sisplatin grubunda, diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

Doku MDA’sı ise sisplatin grubunda propolis 100 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır. Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Tedavi grupları arasında ise sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda, sisplatin + propolis 50 mg/kg grubu göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

Doku SOD değerinde; sisplatin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Sisplatin ve kontrol ise grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

Doku CAT düzeyi; kontrol grubunda sisplatin, propolis 100 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Sisplatin grubunda kontrol, propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda diğer gruplara göre azalmıştır ($p<0,05$).

Doku GSH’da; sisplatin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

Serum testosteron düzeyinde; sisplatin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda kontrol, sisplatin, propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derece azalmıştır ($p<0,05$).

Tablo 14. Biyokimyasal analiz sonuçları

Gruplar	Doku MDA	Serum MDA	SOD	CAT	GSH	Serum Testosteron
Kontrol	1453 ^a ± 281,0	0,5067 ^b ± 0,09266	1,873 ± 0,1623	146,9 ^a ± 29,38	44,34 ± 2,656	314,4 ^a ± 60,09
Sisplatin	1617 ^a ± 247,0	2,020 ± 0,7106	1,767 ± 0,1635	93,37 ^{a,c} ± 8,723	44,88 ^a ± 6,574	307,2 ^a ± 58,45
Propolis 50 mg/kg	1380 ^a ± 244,0	0,6917 ^b ± 0,2491	2,298 ^{b,c} ± 0,07705	176,6 ^{a,b} ± 39,25	55,21 ± 23,77	400,8 ^{a,b,c} ± 52,87
Propolis 100 mg/kg	1220 ^{a,b} ± 248,0	0,4817 ^b ± 0,06676	2,165 ^{b,c} ± 0,1390	109,4 ^{a,b,c,d} ± 11,65	56,74 ^c ± 9,479	316,1 ^a ± 74,57
Sisplatin + Propolis 50 mg/kg	1372 ^a ± 474,6	0,4567 ^b ± 0,1985	2,243 ^{b,c} ± 0,1019	85,69 ^{a,c,d,e} ± 9,712	43,25 ^e ± 4,305	268,0 ^d ± 102,5
Sisplatin + Propolis 100 mg/kg	518,3 ± 289,6	0,5400 ^b ± 0,1049	2,193 ^{b,c} ± 0,1275	62,69 ± 10,63	39,59 ^{c,e} ± 4,626	219,7 ± 46,16

^a Sisplatin + propolis 100 mg/kg ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

^b Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

^c kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

^d Propolis 50 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

^e Propolis 100 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sisplatin, 1970’li yıllarda kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir (119). İlk olarak germ hücreli tümörlerde kullanılmıştır (124). Yaygın olarak akciğer, testis, over, böbrek, mesane gibi birçok solid tümörde etkili bir antitümöral ilaç olarak kullanılmaktadır (3, 187). Hücresel DNA molekülleri ile kovalent bağ oluşturarak kanser hücrelerinin çoğalmasına engel olur, vücuttaki gelişimlerini ve yayılımlarını yavaşlatır. Replikasyon, transkripsiyon ve apoptoz teşvik ederek hayati işlemleri sonlandırmasıyla kanser hücrelerini öldürür (4). Bütün bu işlevler sırasında organlarda ve sistemlerde toksik etkiler oluşturur. Bunun toksisitesi ve taşıdığı minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla gözardı edilir. Testis kanserlerinde yüksek tedavi edici etkisine rağmen, sisplatin spermatogenez üzerinde ciddi olumsuz etkilere, kromozomal ve morfolojik anomalilere ve hatta azoospermiye yol açar (5). Germ hücre apoptozunda artış gösterir, aynı zamanda üreme organ ağırlıklarında azalmaya ve spermatojenik hücrelerde dejenerasyona neden olabilir (6 - 8). Kemoterapötik ilaçların zararlı etkilerine karşı spermatogenik hücreler oldukça duyarlıdır ve kök hücre topluluğunda onarılamayan bir hasar oluşturarak kalıcı infertiliteye yol açabilir (8, 9, 23, 24).

Sisplatin uygulaması ardından genellikle testiküler hasar, oksidatif strese artış, serbest radikal üretimi ve antioksidanların tükenmesine yol açtığı bildirilmiştir (9). Sisplatin kaynaklı testis hasarı altında yatan mekanizma biyokimyasal ve fizyolojik doku bozukluklarından kaynaklanan oksidatif stres oluşumunu içerir. Bu nedenle, sisplatine dayalı testis hasarına karşı çeşitli antioksidanlar test edilmiştir (9). Antioksidanlar hücrede serbest radikalleri temizleyerek genetik bilgiyi içeren DNA ile etkileşimini önleyen koruyucu mekanizmalara sahiptir (188).

Propolis bal arıları tarafından toplanan doğal ürün olmakla beraber metabolik olaylar içinde yer alan, oksidatif stresi inhibe eden, membranlarda süperoksit ve lipid peroksitlerinin aktivitelerini azaltan doğal bir antioksidandır (19 - 22). Yapılan çalışmalarda propolisteki flavonoidler ve bunlarla ilgili bileşiklerin serbest radikal temizleme etkisi en fazla olan bileşikler olduğu gösterilmiştir (18). Çalışmamızda sisplatin toksisitesi sonrasında oluşan testis hasarını azaltabilmek amacıyla verilen propolis tedavisinin testis üzerindeki koruyucu rolü araştırıldı. Çalışmamızın

makroskopik, histolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda ortaya çıkan sonuçları değerlendirilmiştir.

Agarwal ve Said ile Otalla ve arkadaşlarının deney hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmalarda Sisplatinin hayvan ağırlıkları üzerinde hiç bir etki oluşturmadığı, ancak germ hücre tüketimine bağlı olarak testis ağırlıklarında belirgin derecede bir azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (189, 190). Çalışmamızda tüm grupların hayvan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamış, aynı şekilde testis ağırlıklarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Atessahin ve arkadaşları ile Aldemir ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda sisplatin kullanımına bağlı olarak seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında azalma gözlediklerini belirtmişlerdir (6, 172). Çalışmamızda sisplatin uygulanan erkek sıçan testis dokusunda sisplatin etkisinin morfolojik olarak değerlendirmesi amacıyla seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre seminifer tübül çapı, sisplatin grubunda kontrol, propolis 100 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Germinal epitel kalınlığı ise sisplatin grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığının sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna kıyasla arttığı fakat aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Daha önce yapılan çalışmalarda, yetişkin erkek sıçanlara sisplatin verilmesinden sonra spermatogenik fonksiyonlarda akut hasarlara neden olduğu ama bu etkinin geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir. Morfolojik olarak sisplatin kullanımına bağlı olarak seminifer tübülün germinal epitel tabakasında açılmalar, interstisiyel alanda boşluk artışı, Leydig hücreleri morfolojisinde bozulma gözlediklerini belirtmişlerdir (191 - 195). Bizim çalışmamızda da sisplatinin testis dokusu üzerinde morfolojik hasar oluşturduğu görüldü. Sisplatin grubunda; seminifer tübülün germinal epitelde açılmalar, germ hücre düzeninde bozulmalar, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücre döküntüleri görüldü. Ayrıca interstisiyel alanda ödem izlendi. Seminifer tübüldeki hasar Johnsen kriterlerine göre değerlendirildiğinde en fazla hasarın sisplatin grubunda olduğu bulundu. Oluşan bu hasarın sisplatinin spermatogenezi olumsuz yönde etkilemesine bağlı olabileceğini düşünüyoruz. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre sisplatin grubunda

hasar kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ($p<0,05$). Sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarında hasar sisplatin grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ($p<0,05$). Bu azalışın sisplatin toksisitesine karşın tedavi için antioksidan olarak verilen propolis eksratlarının testistiküler yapıyı hasara karşı korumasına bağlı düşüncesindeyiz.

Yapılan çalışmalarda, testis germ hücresi ölümünün apoptoz yoluyla meydana geldiğini gösterilmiştir (196). Çelik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda spermatogonyum gelişimi esnasında oluşan düzelemeyecek seviyedeki hasarların eliminasyonu amacı ile spontan apoptoz olduğu ve bunun fizyolojik bir olay olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca kemoterapi, radyasyon, sıcaklık ve hormonal manipülasyonlar gibi bir takım dış uyaranların da apoptoza yol açtığı ve apoptozu artırdığı gösterilmiştir (197). Sawhney ve arkadaşları çalışmalarında, sisplatinin akut dozuna maruz kalmış farelerde germ hücre apoptoz oranını artırdığını göstermiştir. Ayrıca sisplatin uygulanması sonucunda seminifer tübüldeki spermatidler, spermatositler ve spermatogonyumlardada apoptotik hücreler olduğunu görmüşler (198). Amr ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda da sisplatinin testiküler hasarında apoptozun önemli bir rolü olduğu, Sertoli hücrelerinde ve testiküler germ hücrelerinde apoptoza yol açtığı kayıt edilmiştir. Sisplatinin testiküler hasarı indüklemesi ile p53 geninin aşırı ekspresyonuna neden olduğu ve DNA hasarını tetikleyerek hücre döngüsünü geçici olarak durdurduğu veya apoptoza neden olduğunu belirtilmiştir (199). Yulug ve arkadaşlarının yaptığı testis hasarı ve anti oksidan tedavili çalışmada deney grubunda kullanılan antikanser ajanın apoptozu önemli derece artırdığı ve tedavide kullanılan antioksidanın bu apoptozu önemli derece azalttığını göstermiştir (200). Çalışmamızda deney grupları testis dokularındaki apoptoz TUNEL tekniği ile değerlendirildi. TUNEL yöntemi uygulanan gruplarda, nükleusları kahverengiye boyanmış hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre; kontrol grubundaki sıçanların seminifer tübüllerinde gözlenen spontan apoptoz, ağırlıklı olarak spermatogonyumlarda gözlemlendi. AI değeri kontrol grubunda sisplatin, propolis 50 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede azdı. Sisplatin grubunda ise kontrol, propolis 50 mg/kg, propolis 100 mg/kg, sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg gruplarına göre anlamlı derecede arttığı görüldü. Sisplatin grubunda apoptoz sadece spermatogonyumlarla sınırlı değildi.

Diğer germinal epitel hücrelerinde ve lümene dökülen germinal epitel hücrelerinde de apoptoz mevcut idi. Bu durum sisplatinin apoptozu artırdığını göstermektedir. Yine elde edilen sonuçlara göre tedavi gruplarında (sisplatin + propolis 50 mg/kg ve sisplatin + propolis 100 mg/kg) apoptoz sisplatin grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum bize propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg ile tedavi uygulanan gruplarda testiküler hasarı anlamlı derecede azalttığını göstermiştir. Yine tedavi grupları arasında propolis 100 mg/kg, propolis 50 mg/kg' ye göre anlamlı derecede apoptozu azaltmıştır. Bu durum bize tedavi için verilen propolis 100 mg/kg'nin propolis 50 mg/kg' ye göre tedavide daha etkili olduğunu göstermiştir. Tedavi gruplarından; sisplatin + propolis 50 mg/kg grubunda spermatogonyumların yanı sıra kısmen diğer spermatogenik hücrelerde de apoptoz gözlenirken sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda ise kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edildi. Bu durum bize sisplatin ile birlikte verilen propolisin testiste hasar oluşumunu azaltarak tedavi ettiğinin göstergesi olmuştur.

Malondialdehit (MDA) lipid hidroperoksitlerinin yıkımı sonucu oluşan biyoaktif aldehitlerin en önemlilerindendir. Reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile karbon merkezli radikal oluşur ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipid hidroperoksitler meydana gelir. Oluşan bu bileşikler oluştukları hücrede ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar meydana getirir. Lipid hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA' da artış meydana gelir. MDA'nın bu durumu lipid peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilir (201).

Nieva ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Arjantin propolisinde antioksidan aktivite ile flavonoidin etkin biçimde ilişkili olduğu gösterilmiştir (202). Ayrıca flavonoid içeriği ve inhibe olan MDA seviyesi arasında pozitif ilişki olduğunu tesbit etmişlerdir. Bunların yanında flavonoid içeriğinden başka, propolisin diğer bileşenlerinin de antioksidan özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (203). Hoşnuter ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada propolisin önemli bileşenlerinden olan CAPE'in, MDA düzeyini lipid peroksidasyonunu inhibe ederek azalttığını, reaktif oksijen bileşenlerini azaltıcı yönde etki gösterdiği, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz aktivitelerini baskı altına alarak antioksidan özellik gösterdiğini belirtmişlerdir (204).

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; doku MDA'sı sisplatin + propolis 100 mg/kg grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında sisplatin + propolis 100 mg/kg grubu MDA seviyesi, sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Serum MDA'sı ise sisplatin grubunda, diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). MDA'nın anlamlı derecede artması siplatinin oksidatif stresi artırdığını göstermektedir. Doku MDA seviyesinin 100 mg/kg propolis tedavi grubunda sisplatin grubuna göre derecede düşük olması lipid peroksidasyon düzeyini azalttığını göstermektedir. Serum MDA'sının ise propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg tedavi grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı derecede düşük olması tedavinin lipid peroksidasyon düzeyini azalttığını göstermektedir. MDA seviyelerinde ki bu azalmanın, tedavi edici olarak kullanılan propolis ekstratlarının testis dokusunda antioksidan etki göstererek, reaktif oksijen radikallerinin temizlediği, lipid peroksidasyonunu azaltıcı yönde etki ettiği görülmüştür.

Propolis, her iki tedavi grubunda da MDA düzeylerini kontrol altında tutarak, testis dokusunda siplatinin etken olduğu oksidatif stresi azaltmıştır. Tedavi edici olarak verilen 100 mg/kg propolis ekstraktının testis dokusunda 50 mg/kg propolis ekstraktına göre daha etkin olduğu görülmektedir. Daha önceden Hoşnuter ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmanın bulguları da bizim bulgularımızı desteklemektedir (204).

Organizmada gerek metabolik olaylar gerekse dış etkilere kaynaklanan reaktif oksijen türleri oluşmaktadır ve bunların organizmada meydana getirdiği hasarı önlemek için pek çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalar antioksidanlar veya antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılırlar. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin hücresel bileşenler olan protein, karbonhidrat ve lipidlerin oksidasyonu ile oluşacak zararın önlenmesini sağlamaktadır (205). Bu antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler. Antioksidanlar reaktif oksijenlerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma sistemi ile etkisiz hale getirebilirler. Hücre dışı savunma sistemini, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli moleküller oluştururken, hücre içi savunma sisteminde asıl savunmayı reaktif oksijenleri toplayıcı enzimler olan antioksidanlar oluşturur. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon (GSH) gibi enzimler antioksidanları oluşturarak hücre

içindeki primer korunma sistemini oluştururlar. Böylece organizma için zararlı oksijen türlerini ortadan kaldırır (205 - 208).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sisplatinin üreme organları üzerine olumsuz etkilerine karşı çeşitli bitki ekstratlarının antioksidan koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir (209 - 211). Amr Amin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sisplatin toksisiteli sıçanlarda testis MDA düzeyi anlamlı derecede artmıştır. Testis dokuları üzerinde sisplatinin güçlü oksidatif etkisi nedeniyle SOD ve CAT aktiviteleri anlamlı derecede düşmüştür (210).

Propolis ile polifenolik bileşiklerinin enzimatik antioksidanlardan SOD, CAT aktivitelerini ve enzimatik olmayan antioksidan sistemde ise GSH seviyesini artırmaktadır (211). Beytur ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sisplatin uygulayarak testiste oksidatif stres oluşturulan gruplarda CAT, SOD ve GSH aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulduklarını bildirmişlerdir (212). Sebai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada lipopolisakkarit uygulanan gruplarda endojen antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunduğ belirtilmiştir (213). Yine aynı şekilde Aldemir ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da bu çalışmaları destekler niteliktedir (172).

Daha önce yapılan çalışmalarda ki gibi (172, 212, 213) bizim çalışmamızda da sisplatin grubunda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre azalmakla birlikte aralarında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). SOD aktivitesi Propolis 50 mg/kg ve propolis 100 mg/kg tedavi gruplarında sisplatin grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Bu artışın sisplatin ile oluşturulan testis hasar modeli ile deney hayvanlarının savunma sisteminde, serbest oksijen radikal üretimini artırdığını, oluşan oksidatif strese cevap olarak SOD'un arttığı kanaatindeyiz. Çalışmamızdaki CAT aktivitesinin istatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde; sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken, sisplatin grubu sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Sisplatinin tedavisi enzimatik olarak SOD ve CAT değerlerini azaltıp antioksidan sistemleri bozduğu için, sisplatin tedavisinden önce antioksidan tedavisine başlanması tedavide daha iyi sonuç verebilir düşüncesindeyiz.

Glutasyon (GSH) organizmada toksik metabolitler için önemli koruyucu mekanizmalarından biridir. Glutasyon serbest radikaller, peroksit, lipid peroksitleri ve

ağır metaller gibi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücrel bileşenlerin zarar görmesini engelleyen önemli bir antioksidandır. Hücreler içinde okside edilerek indirgenmiş glutatyon oranı genellikle hücrel toksisitenin ölçüsü olarak kullanılır (214, 215).

Türedi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada testiküler hasara karşı uygulanan antioksidan tedavide deney grubunda GSH seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derece artmıştır (216). Ahmed ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sisplatin enjeksiyonundan önce verilen E vitaminin GSH'yı anlamlı derecede artırdığı görülmüştür (217). Fakat bizim çalışmamızda GSH seviyesinde sisplatin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Propolis 100 mg/kg tedavi grubunda GSH aktivitesi sisplatin grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). GSH seviyesinde düşüş doku hasarına sebep olmaktadır (218, 219). Bizim çalışmamızda sisplatin hasarına karşı tedavi gruplarındaki GSH aktivitesindeki azalmanın, propolisin antioksidan aktivitesinin yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Testosteron androjen grubu ait steroid bir hormondur. Memelilerde testosteron birincil olarak, erkeklerde testislerde üretilirken dişilerde ovaryumda az miktarda üretilir. Bu hormon erkeklik hormonu olarak da bilinir ve erkeklik karakterlerinin (sperm üretimi, sekonder seks karakterlerini gelişimi gibi) oluşmasında önemli rol oynar. Testosteronun olumsuz yönde etkilenmesi sonucu yukarıdaki işlevlerin yerine getirilmesinde ciddi problemler oluşur ve erkek infertilitesi bunların en başında gelmektedir (70).

İnsanlarda infertilite üzerine yapılan bir çalışmada, spermatogenik bozukluklar, testosteron seviyesinin çok düşük olması ya da normal sınırların en alt limitinde olması, ayrıca bu duruma LH'nin seviyesinin yükselmesi de eşlik ettiği belirlenmiştir (218). Maines ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda plazma testosteron seviyesindeki azalmanın sisplatin kaynaklı olduğu ve GnRH ile normal düzeyine gelebileceği bildirilmiştir. Buna istinaden kemoterapötik ilaçların sadece testise androjen hormon metabolizmasına değil, hipotalamus seviyesinde de baskılayıcı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sisplatin kaynaklı plazma testosteron seviyesinin düşüklüğü, sıçan testislerindeki LH reseptörlerinin ve sitokrom P-450'nin depresyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir (220).

Türedi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada deney grubu plazma testosteron seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derece azalmış, tedavi grubunda da anlamlı derece artmıştır (216). Bizim yaptığımız çalışmada plazma testosteron seviyesi, deney grubunda kontrol grubuna göre azalmakta, fakat bu azalma anlamlı derecede değildir. Bununla birlikte propolis 100 mg/kg tedavi grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Bizim çalışmamızda propolis testiküler dokuda MDA, SOD ve CAT seviyelerini düzenlemekle birlikte GSH ve testosteron seviyelerine olumlu etki ettiği söylenemez.

Amr Amin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada erkek sıçanlarda sisplatin toksisitesinin deney grubunda sperm konsantrasyonunu ve hareketliliğini anlamlı derecede azaltmıştır. Tedavi grubunda ise sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinin anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir (210). Rezvanfar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda sisplatin grubunda sperm sayısı, hareketliliği ve canlılığı önemli derece azalmış ve anormal sperm yapısının önemli derece arttığını bildirmişlerdir (221). Türedi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Doxorubicin deney grubunda sperm konsantrasyonu ve motilitesi önemli ölçüde azalmış anormal sperm oranını anlamlı derece artırmıştır. Resveratrol uygulanan tedavi grubunda ise anlamlı derece düzelme olduğu kaydedilmiştir (216). Yousef ve arkadaşının yaptığı çalışmada erkek sıçanlarda alüminyum klorür ($AlCl_3$) ile oluşturulan testis hasarının propolis ile tedavisi sonucunda, sperm konsantrasyonu ve motilitesinde düşüş hafifletilmiş ve ölü ve anormal sperm oranı önemli ölçüde azaltılmıştır (222). Bizim çalışmamızda semen analizine ait verilerin istatistiksel analiz sonuçlarına göre sperm sayısı sisplatin grubunda kontrol, propolis 50 mg/kg tedavi grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Sperm hareketliliği; sisplatin grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır. Ayrıca, propolis 100 mg/kg tedavi grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Anormal sperm morfoloji oranı sisplatin grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı derecede artmıştır. Sperm canlılığı sisplatin grubunda kontrol ve her iki tedavi grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır.

Çalışmamızda ilk gün tek doz 7 mg/kg sisplatin verilmesi ve ondört günlük sürenin sonucunda sisplatin'in testis dokusunda apoptozu indüklediği ve histolojik yapıyı bozduğu saptandı. Doğal bir ürün olan ve antioksidan etkiye sahip propolisin on

dört (iki farklı dozda) gün süreyle verilmesi sonucu sisplatinin testiste oluşturduğu bu hasarları önemli ölçüde düzelttiği görüldü.

Sisplatin ile birlikte verilen propolisin deney hayvanlarının testislerinde, sisplatin grubunda görülen dejenere tübül epiteline göre, yapılarını normale yakın korumuş olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte sisplatin + propolis 50 mg/kg grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde bir kısım seminifer tübüllerin lümeninde immatür germinal hücreler, intertübüler alanda kısmi ödem ve germinal epitelde az miktarda açılmalar olduğu gözlemlendi. Ama sisplatin + propolis 100 mg/kg grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde seminifer tübüller içindeki spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, tübül yapısı bütünlüğünün ve intertübüler alan bütünlüğünün korunduğu, daha az miktarda ödem görüldüğü izlendi.

Sonuç olarak, kanser tedavisi için kullanılan sisplatin histopatolojik ve biyokimyasal analizlere göre testis dokusunda hasara yol açmıştır. Özellikle sisplatin uygulandıktan sonra verilen 100 mg/kg propolis tedavisinin bu hasarı azalttığı gözlenmiştir. Propolisin sisplatin kaynaklı testis hasarı üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için, farklı propolis dozu ve uygulanma süresi olan çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Türker A, Kayaalp SO (2002). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji’de. Hacettepe-Taş Kitapçılık. Ankara; 380-415.
2. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, Collingwood M, Williams CJ (2001). Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 358: 781-786.
3. Ahmed EA, Omar HM, Elghaffar SKAS, Ragb MM, Nasser AY (2011). The antioxidant activity of vitamin c, DPPD and l-cysteine against cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food and Chem Toxicol* 49: 1115–1121.
4. Johnson SW, Ferry KV, Hamilton TC (1998). Recent insights into platinum drug resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 1: 243–254.
5. Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC (1980). Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med* 93: 109– 114.
6. Atessahin A, Sahna E, Turk G, Ceribasi AO, Yilmaz S, Yuce A, Bulmus O (2006) Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 41: 21–27.
7. Elwell KE, Hall C, Tharkar S (2006). A fluorine containing bipyridine cisplatin analog is more effective than cisplatin at inducing apoptosis in cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* 14: 8692–8700.
8. Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Eribas AOC, Yuce A (2008). 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* 89: 1474–1481.
9. Atessahin A, Karahan I, Turk G, Gur S, Yilmaz S, Ceribasi AO (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 21: 42–47.

10. Karataş S (1998). Sıçanlarda kadmiyum klorür'ün (CdCl_2) testis dokusuna etkisi. Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
11. Hegazi AG, Faten K, Abbd El H (2001). Egyptian propolis: 1- antimicrobial activity and chemical composition of upper egypt propolis. *Z Naturforsch C* 56: 82-88.
12. Hamdy MH, El- Banby MA, Khakifa KI, Gad EM, Hassanein EM (1989). The antimicrobial effect of honey in the management of spetic wounds. In *Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates*, Cairo, Egypt. 6-10 Kasım 1988, London, UK; International Bee Res Association (1989) 80-87.
13. Zumla A, Lulat A (1989). Honey-aremedy rediscovered. *J R Soc Med* 82: 384-385.
14. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160:189-95.
15. Marcucci MC, Rodriguez J, Ferreres F, Bankova V, Groto R, Popov S (1998). Chemical composition of Brazilian propolis from Sao Paulo State. *Z Naturforsch C* 53: 117-119.
16. Hegazi AG, Faten K, Abbd El H, Fayrouz AM (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C* 55: 70-5.
17. Matsuna T, Jung SK, Matsumoto Y, Saito M, Morikawa J (1997). Preferential cytotoxicity to tumor cell of 3,5 – diprenyl- 4 hydroxycinnanic acid (Artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res* 17: 3565-3568.
18. Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J, Shani J (1990). Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int J Radiat Biol* 57: 461-65.
19. Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S (1996). Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biol. Pharm. Bull* 19: 1479–484, 25.

20. Isla MI, Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA (2001). Antioxidant activity of argentine propolis extracts. *J of Ethnopharm* 76: 165-170, 130.
21. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem* 103: 729-733.
22. Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem* 80: 29-33.
23. Ahmed EA, Omar HM, Elghaffar SKA, Ragb SMM, Nasser AY (2011). The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and l-cysteine against cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 49: 1115–1121.
24. Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC (2006). Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med* 93: 109– 114.
25. Gartner LP, Hiatt JL (2000). *Color Atlas of Histology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins.
26. Sancak B, Akşit D, Cumhuri M, İlgi S, Kural E, Taner D, Başar R, Önderoğlu S, Tuncel M, Taşçıoğlu B, Yener N, Durgun B, Çelik H, Atasever A, Sargon MF, Sürücü HS, Erbil M, Aldul M, Özkul E (2002). *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar* (Ed. Sancak B, Cumhuri M). İkinci baskı. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Vakfı, Metu Press, Ankara.
27. Clement P, Giuliano F (2015). *Anatomy and physiology of genital organs - men. Handbook of Clinical Neurology*. 130: 19-37.
28. Sarsılmaz M (2000). *Anatomi. Nobel Kitabevi*, Ankara.
29. Gartner LP, Hiatt JL (2007). *Color textbook of histology*. 3. Baskı. Saunders Company, Philadelphia, 489-501.
30. Aktümsek A (2006). *Anatomi ve fizyoloji insan biyolojisi*. 3. Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 9.
31. Sancak B, Cumhuri M (2002). *Fonksiyonel Anatomi*. 2. Baskı. Ankara, 291-292.
32. Cumhuri M, Yener N, Tuncel M (2001). *Temel Anatomi*. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık, Ankara, 287-291.

33. Moore KL, Dalley AF (2007). Kliniğe yönelik anatomi. Çeviren: Şahinoğlu K, 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
34. Yıldırım M (1997). İnsan Anatomisi Sistemik Bilgiler TUS Çalışma Soruları ve Yanıtları Seçilmiş Resimler Kısa Sözlük. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri.
35. Moore KL, Agur AMR. Temel Klinik Anatomi (2006). Çeviri editörü: Elhan A, 2. Baskı. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 135.
36. Snell RS (2004). Klinik anatomi. Çeviren: Yıldırım M, 6. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 236.
37. Arıncı K, Elhan A (2006). Anatomi. 1. Cilt. Güneş Kitabevi, Ankara, 975-7467.
38. Odar ŞV (1986). Anatomi. Hacettepe Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara, 458.
39. Tamam L, Kulan E, Özpoyraz N (2003). Lityum ve tiroid bozuklukları, Çukurova Üniversitesi. Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı, Adana, 12.
40. Hatiboğlu MT (2005). Anatomi sözlüğü. 6. Baskı. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 112-113.
41. Bozdoğan S (2012). Erişkin erkek sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
42. Burukoğlu D, Bayçu C (2008). Protective effects of zinc on testes of cadmium-treated rats. Bull Environl Contam Toxicol 81: 521-524.
43. Dere F (1999). Anatomi atlası ve ders kitabı. Nobel tıp kitabevleri, Adana.
44. Muro EP, Derk RC, de Leo'n JH (2001). Differential effects of octylphenol, 17 bestradiol, endosulfan, or bisphenol A on the steroidogenic competence of cultured adult rat leydig cells. Reprod Toxicol 15: 551-560.
45. Sternberg SS (1997). Histology for pathologist. Lippincott-Raven, New York.
46. Şimşek E (1992). Anatomi fizyoloji. Hacettepe taş kitapçılık, Ankara.
47. Akay MT (2004). Sitoloji. 4. Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara, 5.
48. Leesen TS, Leesen CR, Paparo AA (1988). Text/Atlas of Histology. W.B.Saunders Company, 160.

49. Aydıner ÇY (2005). Deneysel testis torsiyonunda doku hasarının önlenmesinde n-asetilsisteinin rolü. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne.
50. Moore KL (2009). İnsan embriyolojisi. Çeviren: Dalkılıç H, Yıldırım M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 262-265.
51. Sadler TW (2011). Langman Medical Embryology. Langman Tıbbi Embriyoloji. 11th ed. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 246-261.
52. Park JM (2005). Urogenital Sistemin Normal ve Anormal Gelişimi. Editör: Alan BR, E Darracott V, Alan JW. Campbell Uroloji. Güneş Kitabevi, 1737-1801.
53. Tağa S (2008). Çukurova bölgesindeki infertil erkeklerde Y kromozomu (AZF genleri) mikrolelesyonlarının saptanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Adana.
54. Kashimada K, Koopman P (2010). Sry: The master switch in mammalian sex determination. Development 137: 3921-3930.
55. Barsoum BI, Yao HH (2010). Fötal leydig cells: Progenitor cell review maintenance and differentiation. J Androl 31: 11-15.
56. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y (2000). Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. Anat Res 258: 210-220.
57. Tam PP, Snow MH (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. J Embryol Exp Morphol 64: 133-47.
58. McLaren A (2003). Primordial germ cells in the mouse. Dev Biol 262: 1-15.
59. Töhönen V, Ritzén EM, Nordqvist K, Wedell A (2003). Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. Endocr Dev 5: 1-23.
60. De Rooij DG, Anton G J (1998). Spermatogonial stem cells. Curr Opin Cell Biol 10: 694-701.
61. De Rooij DG, Russell LD (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl 21: 776-98.

62. Drumond AL, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H (2011). Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* 142: 145–155.
63. McGuinness MP, Orth JM (1992). Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. *Anat Rec* 233: 527–537.
64. Töhönen V, Ritzén EM, Nordqvist K, Wedell A (2003). Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. *Endocr* 3: 1–23.
65. Oakberg EF (1971). A new concept of spermatogonial stem-cell renewal in the mouse and its relationship to genetic effects. *Mutat Res* 11: 1–7.
66. Ross MH, Pawlina W (2011). Male reproductive system. *Histology: A Text and Atlas*. 6th Edition. China, 784-828.
67. Tegelenbosch RA, de Rooij DG (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 290:193-200.
68. Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). *Histopathological Evaluation of The Testis*. 1st Edition. Cache River Press, 1-58.
69. Chen J, Wu S, Wen S, Shen L, Peng J, Yan C, Cao X, Zhou Y, Long C, Lin T, He D, Hua Y, Wei G (2015). The mechanism of environmental endocrine disruptors (DEHP) induces epigenetic transgenerational inheritance of cryptorchidism. *Plos One* 2: 10-16.
70. Junqueira LC, Carneiro J (2009). *Basic Histology, text & atlas*. Temel Histoloji Text & Atlas. 11 th ed. Çeviren: Solakoğlu S, Aytekin Y, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 418-433.
71. Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K (2009). Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Phil Trans R Soc B* 365: 1537-1556.

72. Karan M, Timurkaan S, Aydın A (2006). Erişkin sincaplarda (*Sciurus vulgaris*) testislerin ışık mikroskopik yapısı. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 20: 185-187.
73. Eroschenko VP (2011). di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Onuncu baskı. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 351-374.
74. Enders GC, Henson JH, Millette, CF (1986). Sertoli cell binding to isolated testicular basement membrane. J Cell Biol 103: 1109-1128.
75. Fawcett DW, Jensh RP (2002). Concise Histology, arnold Publisher. 2nd Edition. New York, 73.
76. Erdoğan D, Görgün M, Hatipoğlu T, Ilgaz (2007). Özel Histoloji. 2. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 156-172.
77. Khaki AA, Tubbs RS, Shoja MM, Rad JS, Farahani RM, Zarrintan S, Nag TC (2006). The effects of an electromagnetic field on the boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat: a light and transmission electron microscope study. Folia Morphol 65: 188-194.
78. Johnsen L, Petty CS, Neaves WB (1980). A comparative study of daily sperm production and testicular composition in human and rats. Biol Reprod 22: 1233-1243.
79. Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 532-550.
80. Skakkebek NE, Heller CG (1973). Quantification of human seminiferous epithelium I. histological studies in twenty one fertile men with normal chromosome complements. J Repord Fert 32: 379-389.
81. Gubari S (2008). Karbosulfanla kontamine besin almanın sıçan testisi üzerine kronik etkilerinin ince yapı düzeyinde araştırılması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana.

82. Farsak F (2011). Medulla spinalis yaralanmasının testis ince yapısına etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana.
83. Magre S, Jost A (1984). Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7831-7834.
84. Griswold MD (1995). Interactions between germ cells and sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 52: 211-216.
85. Silva AS, Villasenor RMV, Marquez SR, Gonzales MH, Jaime HB, Garcia XG, Montiel JLC (2013). Testosterone levels and development of the penile spines and testicular tissue during the postnatal growth in Wistar rats. *Advances in Sexual Medicine* 3: 1-9.
86. Sternberg SS (1997). *Histology for pathologist*. Lippincott-Raven, New York.
87. Gartner LP, Hiatt JL (2007). *Color Textbook of Histology*. 3. Baskı. WB Saunders Company, Philadelphia, 489-511.
88. Ross MH, Pawlina W (2006). *Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 5. Edition. Lippincott W&W Philadelphia, 784-829.
89. Abraham L (2006). Üreme Sistemi. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Çeviren: Demir R, 1. Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara, 531-564.
90. Johnsen L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 60-61: 471-480.
91. Rajeswary S, Mathew N, Akbarsha MA, Kalyanasundram M, Kumaran B (2007). Protective effect of vitamin E against carbendazim-induced testicular toxicity-histopathological evidences and reduced residue levels in testis and serum. *Arch Toxicol* 81: 813-821.
92. Ovalle WK, Nahirney PC (2009). *Netter Essential Histology*. Netter Temel Histoloji. 1st ed. Çeviren: Sevda MÜFTÜOĞLU, Figen KAYMAZ, Pergin ATILLA, Güneş Kitabevleri, İstanbul, 378 -388.

93. Salama AF, El-Bahr SM (2007). Effect of curcumin on cadmium-induced oxidative testicular damage in rats. *J Med Res Inst* 28: 167-73.
94. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colon E, Svechnikova I, Söder O (2010). Origin, development and regulation of human leydig cells. *Horm Res Paediatr* 73: 93-101.
95. Fawcett DW, Jensch RP (2002). *Concise histology*, arnold Publisher. 2nd Edition. New York, 73.
96. Kierszenbaum AL (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Çeviren: Demi R, Palme Yayıncılık, Ankara, 618.
97. Ross MH, Pawlina W (2006). *Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 5. Edition. Lippincott W&W, Philadelphia, 729-747.
98. Özdem S, Akbaş SH, Gültekin M (2006). Yeni Spektrofotometrik lityum ölçüm yönteminin uygulaması ve analitik değerlendirilmesi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 101-106.
99. Jackson T (2006). *Elements of Lithium*. Marshall Benchmark, New York, 12-13.
100. Graham SD, Keane TE, Glenn JF (2010). *Glenn's urological surgery: Anatomy of the epididymis, vas deferens, and seminal vesicle*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 356.
101. Jones RC (April 1999). To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl* 22: 57-67.
102. Solakoğlu Z (2009). Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni: Klinik fizyopatoloji. *Klinik Gelişim* 22: 20-25.
103. Demirbağ Z, Sezen K (2009). *Hücre Biyolojisi*. Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon; 235-240.
104. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K (1994). Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 30: 2068-2141.
105. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.

106. Zhao TY, Zou SP, Knapp PE (2007). Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. *Neurosci Lett* 412: 34–38.
107. Öztürk F (2002). Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 9: 143-148.
108. Mak T (2003). The E. Donnal Thomas Lecture Apoptosis: This death that makes life live. *Biol Blood Marrow Transplant* 9: 483-488.
109. Altunbaş K, Özden Akkaya Ö, Yağcı A, Öznurlu Y (2009). Horozların testislerinde yaşlanmaya bağlı olarak şekillenen apoptozisin belirlenmesi. *Kocatepe Vet J* 2: 7- 11.
110. Saygin M, Caliskan S, Karahan N, Koyu A, Gumral N, Uguz AC (2011). Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health* 27: 455-463.
111. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251–306.
112. Tomatır AG (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 23: 499–508.
113. Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6: 1028-1042.
114. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171
115. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-CalvoM (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem* 272: 17907 - 17911.
116. Güneş HV (2006). *Moleküler Hücre Biyolojisi. İkinci Baskı. Kaan Kitabevi, Eskişehir*; 388-391.
117. Olinski R, Wedrychowski A, Schmidt WN (1987). In-vivo DNA-protein cross-linking by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 47: 201-205.

118. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205:698-707.
119. Kelland L (2007). The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7: 573-584.
120. Wang D, Lippard SJ (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4: 307-320.
121. Rossof AH, Slayton RE, Perlia CP (1972). Preliminary clinical experience with cisdiamminedichloroplatinum (II). *Cancer* 30: 1451-1457.
122. Pizzo PA, Poplack DG (2006). *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
123. Alp Özkan (2009). *Pediatric Oncology*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
124. Rosenberg B (1985). Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 55: 2303-2319.
125. Giaccone G (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59: 9-17, 37-38.
126. Pasetto LM, D'Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S (2006). The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol* 60: 59-75.
127. Holzer AK, Samimi G, Katano K (2004). The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 66: 817-823.
128. Nakai YY, Konishi KK, Chang KC, Ohashi K, Morisaki N, Minowa Y (1982). Ototoxicity of the anticancer drug cisplatin, An experimental study. *Acta Otolaryngol* 3: 227-232.
129. Jordan P, Carmo-Fonseca M (2000). Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57: 1229-1235.
130. Welters MJP, Fichtinger-Schepman AMC, Baan RA (1999). Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: Correlation between platinum

- content, DNA adduct levels and drug sensitivity in-vitro and in-vivo. Br J Cancer 79: 82-88.
131. Rosenberg B (1999). Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in cisplatin. Editor, Lippert B, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, Switzerland, Wiley-VHC, Basel, 144.
 132. Gunes D, Kırkım G, Demiral P, Mutafoğlu K, Serbetcioglu B, Olgun N (2009). Platinum-induced ototoxicity in children and adolescents with cancer. Int Adu Otol 5: 345-355.
 133. Blakley BW, Gupta AK, Myers SF, Schwan S (1994). Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 120: 541-547.
 134. Lippert B (1999). Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, WileyVCH, Zurich 3-183.
 135. <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/CISPLATI.pdf>. (02 Jul 2014)
 136. Silici S (2003). Propolisin bazı antimikrobiyal ve farmakolojik aktiviteleri üzerine bir araştırma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootečni Ana bilim dalı, Adana, 86, 69-73.
 137. Seven İ, Aksu T, Tatlı Seven P (2007). Propolis ve hayvan beslemede kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 18: 79-84.
 138. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksosite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
 139. Silici S (2008). Farklı botanik orijine sahip propolis örneklerinde biyolojik olarak aktif bileşiklerin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 24: 120-128.
 140. Kutluca KS, Genç F (2007). Farklı balarası (*Apis mellifera*) ırk ve yöntemleri ile üretilen propolis örneklerinin reçine miktarları. U Arı Drg, 52-57.
 141. Karaman İ (2009). Propolisin kırık iyileşmesi ve oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Kayseri.

142. Barlak Y (2009). Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomikine etkisi. Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
143. Kutluca S, Genç F, Korkmaz A (2006). Propolis. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitim Serisi Yayını 2: 6-30.
144. Bankova V, Marcucci M, Castro S (2000). Propolis recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, 31: 3-15.
145. Albayrak S (2002). *Leishmania tropica* üzerine kayseri propolisinin antileishmanial aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
146. Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Ceyran G (2002). Önemli bir arı ürünü: propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 2: 10-23.
147. Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Topçuoğlu N (2006). Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester ve sinnamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi* 45: 83-92.
148. Bankova V (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 100: 114-117.
149. Bankova V (1998). Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *J Ess Oil Res* 10: 693-696.
150. Ghisalberti EL, Jefferies PR, Lanteri R, Matison J (1978). Constituents of propolis. *Experientia* 34: 157-158.
151. Orsolic N, Basic I (2003). Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol* 84: 265–273.
152. Russo A, Longo R, Vanella A (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73: 21-29.
153. Eser B (2009). Ratlarda metotreksatin yol açtığı intestinal mukoza hasarı ve oksidatif stres üzerine propolisin etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

154. Özcan F (2006). Propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
155. Sahinler N, Kurt Ş, Kaftanoğlu O (2003). Propolisin kireç hastalığı üzerine etkileri. Uludağ Bee Journal 37-39.
156. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA (2008). Functional properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. J Food Sci 73: 117-124.
157. Ziaran HR, Rahmani HR, Pourreza J (2005). Effect of dietary oil extract of propolis on immune response and broiler performance. Pakistan J Biol Sci 8 (10): 1485-1490.
158. Kafadar İH (2009). Deneysel septik artrit modelinde eklem kıkırdağı hasarı üzerine intraartiküler uygulanan propolisin etkileri. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri.
159. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. Food Chem 103: 729-733.
160. Öztürk İÇ, Öztürk F, Gül M, Ateş B, Çetin A (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. Cell Biochem Funct 27: 309-315.
161. Giulia DC, Mascolo N, Angelo AL (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 65: 337-53.
162. Deschner EE, Ruperto J, Wonk G (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azocy methanol induced colonic neoplasia. Carcinogenesis 12: 771-775.
163. Verma AK, Johnson JA, Gould MN (1998). Inhibition of 7,12-demthylbenz (a) anthracene and N-nitrosomethylvera-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. Cancer Res 48: 5754-5758.

164. Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* 76: 545-558.
165. Krell R (1996). Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
166. El-khawaga O, Salem T, Elshal M (2003). Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin Chim Acta* 338: 11-16.
167. Polat G, Koçan D (2006). Propolis ve Antimikrobiyel Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 24-26 Mayıs 2006, 1003-1006.
168. Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954–3962.
169. Çapanoğlu Güven E, Toydemir Otkun G, Boyacıoğlu D (2010). Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda* 35: 387-394.
170. Atasever B, Akgün Dar K, Edem Kuruca S, Turan N, Seyhanlı V, Meriçli A (2003). *Cyanara syrica*'dan elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 32: 143-150.
171. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH (2002). Effects of compounds found in Propolis on *Streptococcus Mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1302-1309.
172. Aldemir M, Okulu E, Kosemehmetoglu K, Ener, Topal F, Evirgen O, Gurleyik E, Avcı A (2013). Evaluation of the protective effect of quercetin against cisplatin-induced renal and testis tissue damage and sperm parameters in rats. *Andrologia* 10: 1111-12197.
173. Fathy Ahmed Fetouh, Azab El Saied Azab (2014). Ameliorating effects of curcumin and propolis against the reproductive toxicity of gentamicin in adult male guinea pigs: Quantitative analysis and morphological study. *American J Life Sci*: 138-149.

174. Saleh, Eman M (2012). Antioxidant effect of aqueous extract of propolis on hepatotoxicity induced by octylphenol in male rats. *Acta Toxicol*; 68-81.
175. Turan I (2011). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
176. Demir R, Yılmaz S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 9-10.
177. Makler A (1980). The improved 10 mic. Chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 33: 337-338.
178. Kruger TF et al. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 46: 1118-1123.
179. Trivedi P, Tripathi DN, Jena GB (2011). Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat. Role of NFjB,P38 AND CASPASE-3. *Food Chem Toxicol* 49: 838-847.
180. Potten CS (1996). What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 11: 1743-8.
181. Johnsen S G (1970). Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*1: 2-25.
182. Yagi K (1984). Assay of blood plasma or serum. *Methods of Enzmology* 109:328-331.
183. Uchiyama M, Mihara M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
184. Afzal M, Afzal A, Jones A, Armstrong D (2002). A rapid method for the quantification of GSH and GSSG in biological samples. *Methods Mol Biol* 86: 117-22.
185. Aebi H (1974). *Methods of enzymatic analysis*. Editor: Bergmeyer HU, Catalase, NewYork, Academic Press: 673-684.

186. Sun Y, Oberley LW, Li A (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497–500.
187. Boekelheide K (2005). Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* 34: 6–8.
188. Halliwell B, Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231-255.
189. Agarwal A, Said TM (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod* 9: 331-45.
190. Otalla M, Suomalainen L, Pentikainen MO, Kovanen P, Tenhunen M, Erkkila K (2004). Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. *Biol Reprod* 70: 759-67.
191. Drasga RE, Einhorn LH, Williams SD, Pastel DN (1983). Fertility after chemotherapy for testicular cancer. *J Clin Oncol* 1: 179-183.
192. Berthelsen JG (1984). Sperm counts and serum follicle stimulating hormone levels before and after radiotherapy and chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Fertil Steril* 41: 281-287.
193. Lange PH, Narayan F, Vogelzang NJ, Shafer RB, Kennedy BJ, Fraley EL (1983). Return of fertility after treatment for nonseminomatous testicular cancer: changing concepts. *Urol* 129:1131-1135.
194. Meistrich ML, Finch M, Da Cunha MF, Hacker U, Au WW (1982). Damaging effects of 14 chemotherapeutic drugs in mouse testis cells. *Cancer Res* 42: 122-131.
195. Meistrich ML, Chawla SF, Da Cunha MF, Johnson SL, Plager C, Papadopoulos NE, Lipshultz LI, Benjamin RS (1989). Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. *Cancer* 63: 2115-2123.
196. Karaguzel E, Kutlu O, Yulug E, Mungan S, Kazaz IO, Tok DS (2012). Comparison of the protective effect of dipyridamole and acetylsalicylic acid on

- long-term histological damage in a rat model of testicular ischemia–reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 47: 1716–1723.
197. Çelik ÖK, Aras A, Tuğan D, Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M, Haydaroğlu A (2004). Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. *T Klin J Med Sci* 24: 142-146.
198. Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH (2005). Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J mice. *J Androl* 26: 1.
199. Amr A, Alaaeldin AH, Amr K, Sayel D (2008). Herbal extracts counteract cisplatin mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl* 10(2): 291-297.
200. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C (2013). Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats. *Scientific World Journal*. AID; 489659, 6p. doi: 10.1155/2013/489659.
201. Oksante Ar-Ge Laboratuvarı (2012). Available from: <http://www.oksante.com.tr/oksantest.pdf>
202. Nieva MI, Isla MI, Sampietro AT (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
203. Nieva MI, Isla MI, Sampietro AT (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 76: 165-170.
204. Hoşnüter M, Gurel A, Babuccu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 30: 121–125.
205. Çolak E (2011). Karbon tetrakloridin (CCl₄) indüklediği karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerine *Cynara scolymus* L. yaprağı ekstraktının etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1 2 7.
206. Gutteridge JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 12, 1819-1828 p.
207. Thomas MJ (1995). The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working. *Crit Rev Food Sci Nut* 35: 182, 21-39.

208. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 31: 51-56.
209. Azu OO, Duru FIO, Osinubi AA (2011). Long-term treatment with *Kigelia africana* fruit extract ameliorates the testicular toxicity following cisplatin administration in male Sprague-Dawley rats. *J Med Plants Res* 5: 388–397.
210. Amr Amin, Christeena Abraham, Alaaeldin A. Hamza, Zeinab A. Abdalla, Shaikha B. Al-Shamsi, Saina S. Harethi, Sayel Daoud (2012). A Standardized Extract of *Ginkgo biloba* Neutralizes Cisplatin-Mediated Reproductive Toxicity in Rats. *J Biomed Biotechnol.* ID; 362049: 11. doi:10.1155/362049.
211. Eser B (2009). Ratlarda metotreksatın yol açtığı intestinal mukoza hasarı ve oksidatif stres üzerine propolisin etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı*, 81.
212. Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguzturk H, Yılmaz F (2012). Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 207–213
213. Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Boughanmi N, Ben-Attia M (2010). Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1078–1083.
214. Pastore A, Piemonte F, Locatelli, M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G (2003). Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem* 47: 1467–1469.
215. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata V, Casini AF (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66: 1499–1503.
216. Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Kutlu Ö, Kahraman C (2014). Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Exp Toxicol Pathol* 67: 229-235.
217. Ahmed EA, Omar HM, ElghaVar SKH, Ragb SM, Nasser AY (2011). The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 49: 1115–1121.

218. Nieschlag E, Wickings EJ, Mauss J (1979). Endocrine testicular function in vivo and in vitro in infertile men. *Acta Endocrinol* 90: 544–51.
219. Eklöw L, Moldéus P, Orrenius S. *Eur J Biochem* (1984). Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea 1;138(3):459-63.
220. Maines MD, Sluss PM, Mumtaz I (1990). Cis-platinum-mediated decrease in serum testosterone is associated with depression of luteinizing hormone receptors and cytochrome P-450 SCc in rat testis. *Endocrinology* 126: 2398-2406.
221. Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M (2013). Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 266: 356–365.
222. Yousef MI, Salama AF (2009). Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1168–1175.

9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ**

Çalışmasının Adı : “Sıçanlarda Sisplatin Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Propolisin Koruyucu Etkisinin Araştırılması”
Çalışmacılar : Prof.Dr.Esin YULUĞ, Yük.Lis.Öğr.Özkan YILDIRIM, Doktora Öğr.Sibel TÜREDİ, Y.Doç.Dr.Gökçen KERİMOĞLU, Arş.Gör.Dr.Gökşen Derya REİS KÖSE, Doç.Dr.Ahmet MENTEŞE, Prof.Dr.Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Arş.Gör.Selim DEMİR, Doç.Dr.Ömer KUTLU
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji

Etik Kurul Dosya No 2015/ 4	Etik Kurul Toplantı Tarihi 10/02/2015	Etik Kurul Toplantı No 2015/02	Etik Kurul Karar No 3
--	--	---	--------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Etem ALHAN’ın başkanlığında toplanıp; “Sıçanlarda Sisplatin Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Propolisin Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (10.02.2015)

Prof. Dr. Etem ALHAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : YILDIRIM, Özkan
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 17/11/1983-Yomra
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 462 377 50 99
Faks : 0 462 377 1 21
E-Posta : biyozkan@yahoo.com
Yazışma adresi : KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Fatih Lisesi	2002

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1. Biyolog	Özel Karadeniz Hastanesi Tüp Bebek Merkezi	2007-2008 2009-2010
2. Biyolog	Clinart Kadın Hastalıkları ve Tüp Bebek Merkezi	2009-2010
3. Biyolog	KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi	2010-Halen

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Guven S, Kart C, Unsal MA, Yildirim O, Odaci E, Yulug E (2013). Endometrial injury may increase the clinical pregnancy rate in normoresponders underwent long agonist protocol intracytoplasmic sperm injection cycles with single embryo transfer. *Fertil Steril* 173: 58-62.
2. Guven S, Kart C, Unsal MA, Yildirim O, Odaci E, Yulug E (2011). Mean blastomer diameter may predict the clinical pregnancy in long agonist protocol intracytoplasmic sperm injection cycles with single embryo transfer. P-174 Abstracts of the 27th Annual Meeting of ESHRE, Stockholm, Sweden, 3 July – 6 July, 2011.