



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE
OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL TESTİS HASARI
ÜZERİNE RESVERATROLÜN ETKİLERİ**

Sibel TÜREDİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON – 2012



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE
OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL TESTİS HASARI
ÜZERİNE RESVERATROLÜN ETKİLERİ**

Sibel TÜREDİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON – 2012

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 ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Sibel TÜREDİ

TEŞEKKÜR

Çalışmanın diğer bir anlamının da yardımlaşmak olduğunu öğrendiğim, yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini daima hissettiğim, bilimsel araştırmada sınırların kaldırılması gerektiğini anlamama yardımcı olan, tezimin hazırlanmasında büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam K.T.Ü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Esin YULUĞ'a, Yüksek lisans eğitimim sürecinde güler yüzünü, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocam K.T.Ü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e, azmini ve bilimselliğini daima örnek aldığım değerli hocam K.T.Ü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ersan ODACI'ya, Deney aşmasına katkıda bulunan değerli hocam K.T.Ü Tıp Fakültesi Fizyoloji Analim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a, KTÜ Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ömer KUTLU'ya, biyokimyasal parametrelerin incelenmesinde yardımlarını esirgemeyen K.T.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Araştırma Görevlileri Cemil KAHRAMAN ve Diler US'a, çalışmanın her aşamasında benim yanımda olan, yoğun ve yorucu tez hazırlama sürecimde bana anlayışla katlanan aynı dönemde yüksek lisans yaptığım değerli dostlarım Hatice HANCI'ya, Zehra TOPAL'a, doktora öğrencisi Ayşe İKİNCİ'ye ve K.T.Ü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapan tüm arkadaşlarıma, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, tüm sıkıntılarımda yanımda olan değerli aile üyelerime ve tez çalışmamı 2010.114.001.12 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne sonsuz saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

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 Sibel TÜREDİ'nin hazırladığı “Sıçanlarda Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Testis Hasarı Üzerine Resveratrolün Etkileri” 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 Doç Dr. Esin YULUĞ

Jüri Üyeleri

Doç Dr. Esin YULUĞ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Doç Dr. Ahmet ALVER

Tarih:/.../2012

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

Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

İÇ KAPAK

KABUL ve ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ i

TABLolar DİZİNİ iv

ŞEKİLLER DİZİNİ v

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ vii

1. ÖZET x

2. SUMMARY xi

3. GİRİŞ ve AMAÇ 1

4. GENEL BİLGİLER 3

4.1. Testis Embriyolojisi 3

4.2. Testis Anatomisi 5

4.3. Testis Histolojisi 6

4.3.1. Seminifer Tübüller 7

4.3.2. Seminifer Epitel 8

4.3.2.1. Sertoli hücresi 8

4.3.2.2. Spermatogenetik Hücreler 10

4.3.3. Spermatogenez 11

4.3.4. Spermatozoa 14

4.3.5. Seminifer Epitel Döngüsü 15

4.3.6. Kan Testis Bariyeri 15

4.3.7. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri 16

4.4. Testis Fizyolojisi 18

4.5. Epididimis 19

4.6. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem 21

4.6.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller 21

4.6.2. Antioksidan Sistem 22

4.6.3. Serbest Radikaller ve Testis Hasarı 24

4.7.	Apoptoz.....	24
4.8.	Dokso rubisin	26
4.8.1.	Dokso rubisinin Biyokimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması	26
4.8.2.	Dokso rubisinin Metabolizması ve Farmakokinetikleri.....	27
4.8.3.	Dokso rubisinin Yan Etkileri	28
4.8.4.	Dokso rubisin ve Testis Hasarı	28
4.9.	Resveratrol	29
4.9.1.	Resveratrolün Biyosentezi ve Metabolizması.....	31
4.9.2.	Resveratrolün Etkileri	31
4.9.2.1.	Antioksidan Aktivite	31
4.9.2.2.	Vazodilatör Etki	32
4.9.2.3.	Anti-İnflamatuar Etki.....	33
4.9.2.4.	Trombosit Agregasyon İnhibisyonu	33
4.9.2.5.	Anti-Tümoral Etki.....	33
4.9.2.6.	İskemi-Reperfüzyon Hasarından Koruyucu Etkisi	34
4.9.3.	Resveratrolün Testis Üzerine Etkileri.....	34
4.9.4.	Toksisite	35
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	36
5.1.	Deney sel Çalışma Aşaması.....	36
5.1.1.	Deney Hayvanları	36
5.1.2.	Laboratuvar Koşulları	36
5.1.3.	Deney sel Çalışma Planı	37
5.1.4.	Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	39
5.1.5.	Bouin Tespitinin Hazırlanışı	39
5.1.6.	Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması	40
5.1.7.	Kesitlerin Alınması	41
5.1.8.	Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	41
5.1.9.	Epididimiste Total Sperm Sayısı, Motilite, Canlılık ve Morfoloji Değerlendirmesi.....	43
5.2.	İmmünohistokimyasal İşlemler.....	45
5.2.1.	TUNEL Boyama	46
5.3.	Biyokimyasal İncelemeler ve Kullanılan Yöntemler.....	47
5.3.1.	Bradford Metodu.....	47
5.3.2.	Plazma MDA Tayini	47

5.3.3.	Doku MDA Tayini	48
5.3.4.	Dokuda SOD Tayini	49
5.3.5.	Dokuda Katalaz Tayini	51
5.3.6.	Doku GP-x Tayini.....	52
5.3.7.	Doku GSH Tayini	52
5.3.8.	Plazma Testosteron Tayini.....	53
5.3.9.	Glikoz-6- fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Ölçüm Yöntemi.....	53
5.3.10.	Sorbitol Dehidrogenaz (SDH) Ölçüm Yöntemi.....	53
5.4.	İstatistiksel Analizler	53
6.	BULGULAR.....	54
6.1.	Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular	54
6.2.	Morfometrik Bulgular	54
6.3.	Morfolojik Bulgular	55
6.4.	Semen Analizine Ait Bulgular	64
6.5.	Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	68
7.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	70
8.	SONUÇLAR	78
9.	KAYNAKLAR	80
10.	ETİK KURUL ONAYI.....	99
11.	ÖZGEÇMİŞ ve KİŞİSEL BİLGİLER	100

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Resveratrolün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	30
Tablo 2. Denek Grupları.....	37
Tablo 3. Deney Gruplarının Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar	54
Tablo 4. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	55
Tablo 5. Deney Gruplarına ait Johnsen Skoru ve Apoptotik İndeks Değerlendirmesi	60
Tablo 6. Sperm Analizine Ait Bulgular	64
Tablo 7. Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Parametrelere ait Bulgular	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Testis Genel Histolojik Yapısı	11
Şekil 2. Doksorubisinin Kimyasal Yapısı, (120).	27
Şekil 3. Trans ve Cis Resveratrolün Kimyasal Yapısı, (145).	30
Şekil 4. Deney Hayvanlarının Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler (A, B), Denek Gruplarına i.p. Enjeksiyon Uygulaması (C).	38
Şekil 5. Testis ve Epididimislerin Çıkartılması (A,B). Testislerin Epididimislerden Ayrılması (C), Testisin Makroskopik Görünümü (D).	40
Şekil 6. Makler Sayım Kamarası	44
Şekil 7. Makler Sayım Kamarasında Sperm Analizi	45
Şekil 8. Kontrol Grubuna (A) ait Testis Dokusu. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki testis dokusunda seminifer tübüller (*) ile aralarındaki interstisyel bağ doku (→) izlenmektedir (H&E, X200).	56
Şekil 9. DOX Grubuna (B ₁) Ait Testis Dokusu. Olgunlaşmamış germinal hücrelerin lümene dökülmesi (►), tübül duvarında vakuolizasyon (*) lümende spermatozoonların azlığı (↓) dikkat çekmektedir (H&E, X200).	57
Şekil 10. DOX Grubuna (B ₂) ait Testis Dokusu. Eozinofilik sitoplazmalı spermatogenetik hücreler (*), spermatozoa azlığı (↑) görülmektedir (H&E, X400).	57
Şekil 11. DOX+ RES (C) Grubuna ait Testis Dokusu. Lümende spermatozoa yoğunluğu (*), normal dağılımlı spermatogenetik hücreler (►), düzenli sınırlara sahip seminifer tübüller ve az sayıda lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübüller (↑) izlendi (H&E, X200).	58
Şekil 12. RES Grubu (D) ve DMSO Grubuna (E) ait Testis Dokusu Örneği. Seminifer tübüllerin kontrol grubuna benzer histolojik yapıda olduğu izlendi (H&E, X200).	59
Şekil 13. Kontrol Grubu (A) ve DOX Grubuna (B) Ait Testis Dokusunda Gözlenen Tunel (+) Hücreler (↑) (TUNEL X400).	61
Şekil 14. DOX+RES (C) Grubuna Ait Tunel (+) Hücreler (↑) (TUNEL X400).	62
Şekil 15. RES Grubu (D) ve DMSO Grubuna (E) Ait Tunel (+) Hücreler (↑) (TUNEL X400).	63
Şekil 16. Kontrol Grubu (A) ile DOX Grubuna (B) Ait Epididimisin Işık Mikroskopik Görüntüsü (H&E X400). (↑) Olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücreler.	65

Şekil 17.	DOX+RES Grubuna (C) Ait Epididimisin Işık Mikroskopik Görüntüsü (H&E X400).....	66
Şekil 18.	RES Grubu (D) ve DMSO Grubuna (E) ait Epididimisin Histolojik Görüntüsü (H&E X400).....	67
Şekil 19.	Sperm Analizi Görüntüleri. A: Ölü sperm; B: Canlı sperm.....	68

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ADAMs	: Metalloproteinaz
AI	: Apoptotik indeks
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMH	: Antimüllerian hormon
BSA	: Bovin Serum Albumin
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CoA	: Asetil koenzim A
CP	: Cisplatin
CRES	: Cystatin ile ilişkili epididimise özgü protein
Cu	: Bakır
Cu-SOD	: Bakır süperoksit dismutaz
C1q	: Kollektin
DEFB118	: β -defensin118
DHEA	: Androjen dehidroepiandrosteron
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOX	: Dokсорubisin
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
Fe	: Demir
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
GBG	: Gonadal steroid-bağlayıcı globülin
GnRH	: Gonadotropin serbestleştirici hormon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Rd	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyonlar

G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
HCl	: Hidroklorik asit
HIS	: Histidin
HOCl	: Hipoklorik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HRO2-	: Hidroperoksil
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₃PO₄	: Fosforik asit
H₂SO₄	: Sülfirik asit
IM	: Işık mikroskobu
i.p	: İntraperitoneal
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LH	: Luteinleştirici hormon
LPO	: Lipit peroksidasyonu
M	: Molarite
MAPK	: Mitojen aktif edilmiş protein kinaz
MDA	: Malondialdehid
StAR	: Steroidogenik akut regülatör protein
Mg	: Magnezyum
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MIS	: Mülleriyan inhibitör madde
Mn-SOD	: Manganez süperoksit dismutaz
M2A	: Monoklonal antikor
μ	: Mikron
N	: Normalite
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄.2H₂O	: Disodyum hidrojenfosfat dihidrat
OH	: Hidroksil
O₂⁻	: Süperoksit
PBS	: Phosphate buffer solution
PUFA	: Poliansature yağ asitleri

RES	: Resveratrol
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RO2	: Peroksil
rpm	: Dakidaki devir sayısı
SDH	: Sorbitol dehidrogenaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TBA	: Tiyoarbitürük asit
TDF	: Testis belirleyici faktör
TdT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
TEA	: Trietanolamin
TFA	: Trifloroasetik asit
TGF1	: Transforming growth faktör-1
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay
UV	: Ultraviyole ışını
2,5-HD	: 2,5-hexanedione
&	: Ve

1. ÖZET

Sıçanlarda Doksorubisin ile Oluşturulmuş DeneySEL Testis Hasarı Üzerine Resveratrolün Etkileri

Bu çalışmada doksorubisin'in sıçan testisi üzerindeki olumsuz etkilerine karşı resveratrolün koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Çalışma için 34 adet SpragueDawley cinsi erkek sıçan 5 gruba ayrıldı ve deney süresi 21 gün olarak belirlendi. Grup 1'e (kontrol grubu) tek doz %0.9 izotonik sodyum klorür, Grup 2'ye tek doz 10 mg/kg doksorubisin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Grup 3'e ise hem tek doz 10 mg/kg doksorubisin, hem de eşzamanlı 20 mg/kg/gün intraperitoneal resveratrol verildi. Grup 4'e sadece 20 mg/kg/gün resveratrol, Grup 5'e ise sadece resveratrol çözücüsü olarak kullanılan dimetil sülfoksit deney süresince uygulandı. Deney sonunda hayvanların tümü sakrifiye edilerek testisleri alındı ve epididimisleri ayrıldı. Testis ve epididimis doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelendi. Testiste seminifer tübül hasar değerlendirmesi Johnsen skorlama sistemi ile belirlendi. Testisteki apoptozisi değerlendirmek için TUNEL tekniği kullanıldı. Epididimal sperm analizinde sperm sayısı, motilite ve morfolojisi değerlendirildi. Biyokimyasal olarak kanda ve dokuda oksidatif stres parametreleri incelendi.

Histopatolojik olarak, Grup 2'nin testis dokusunda seminifer tübül bazal membranında düzensizlikler, lümende germinal epitel hücreleri, seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler ve açılmalar izlendi. Sperm analizinde; sperm sayısında, motilitesinde azalma ve morfolojisinde bozulma olduğu gözlemlendi. Grup 3'te bu histopatolojik bulgulara düzelme olduğu gözlemlendi. Grup 2'de lipid peroksidasyonu artmıştı. Grup 3'te ise lipid peroksidasyonu azaldı ve GP-x, GSH seviyeleri yüksekti.

Bulgularımız doksorubisinin testiküler fonksiyonu bozduğunu ve resveratrol tedavisinin bu toksisiteyi önleyebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak resveratrolün, kanser hastalarında doksorubisin tedavisi sonrasında oluşan testis toksisitesinde faydalı etkileri ile kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Doksorubisin, Oksidatif stres, Resveratrol, Sıçan, Testis

2. SUMMARY

Effects Of Resveratrol On Testicular Damage Experimentally Created With Doxorubicin In Rats

The aim of this study was to investigate the negative effects of doxorubicin on rat testes and to highlight the protective effect of resveratrol on these parameters.

Thirty-four male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups for an experiment of 21 days. Group 1 was administered single dose saline and served as control; Group 2 was single dose received intraperitoneal injections of doxorubicin (10mg/kg). Group 3 was administered both single dose doxorubicin (10mg/kg) and resveratrol (20 mg/kg/day). Group 4 only received intraperitoneal injections of resveratrol (20 mg/kg/day). Group 5 was only received intraperitoneal injections of dimethyl sulfoxide. At the end of the experimental period, the rats were sacrificed, all testes were removed and epididymis were separated. The histopathologic examination of testicular tissue and epididymis was performed with light microscope. Johnsen scoring system was used to determine the seminiferous tubule damage. The TUNEL technique was used to determine the apoptosis in testes. In addition epididymal semen quality was evaluated in terms of sperm count, motility and morphology. Oxidative stress marker levels as biochemical were evaluated in blood and tissues.

Histopathologically, testicular tissue showed seminiferous tubule irregularities in the basal membrane, germinal epithelial cells in the lumen, irregularities and vacuoles in the germinal epithelium of seminiferous tubules. Semen analysis was observed, sperm count, motility and increase in abnormal sperm rates. It was observed that Group 3 recovered in these histopathological findings. Decreased lipid peroxidation in Group 3 and GP-x, GSH levels were increased.

Our data indicate that doxorubicin treatment markedly impaired testicular function and that treatment with resveratrol might prevent this toxicity in rats. In conclusion, we think that resveratrol could be used with its beneficial effects testes toxicity after DOX treatment in cancer patients.

Key Words: Doxorubicin, Oxidative stress, Resveratrol, Rat, Testes

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Antrasiklin antibiyotikler, en etkili ve en yaygın olarak kullanılan antineoplastik ilaçlar arasında yer alır (1). Doksorubisin antrasiklin grubuna dahil bir antibiyotik olup solid tümör tedavi protokollerinde en fazla yer alan ilaçtır. En sık akut lösemi, lenfoma, meme kanseri, akciğer, tiroid karsinomu gibi solid tümörlerde, Hodgkin hastalığı, non-Hodgkin lenfoma ve yumuşak doku sarkomalarında kullanılmaktadır (2, 3).

Doksorubisinin (DOX) uygulama dozları, farklı kanser hastalıklarında değişiklik gösterir. Doksorubisin, klinik olarak genellikle 3-4 haftada aralıklar ile 40-75 mg/m² lik bir dozda devamlı infüzyonla verilir. Hastalara verilen ilacın toplam dozu doksorubisinin yan etkileri ile uygunluk gösterir. Bu yüzden toplam doz, vücut yüzey alanının 550 mg/m²'sini aştığında doksorubisin hastanın kemoterapi tedavisinden çıkartılır(4).

Her ne kadar DOX kullanımı akut ve kronik yan etkilerinin bulunması ile tartışma yaratsa da kanser hastalarının tedavisinde oldukça önemlidir. İlacın intravenöz verilmesini takiben birkaç dakika ve hafta içinde gerçekleşen akut yan etkileri, bulantı, kusma, miyelosupresyon, ritim bozukluğu, hematopoietik supresyon, alopesi, kemik iliği supresyonu, mukozal ülser ve kilo kaybıdır. Bu etkiler geri dönüşümlüdür ve klinik olarak tedavi edilebilir (5, 6).

Yüksek antitümör etkinliğine rağmen doksorubisin testis toksisitesi de dahil olmak üzere çeşitli organ toksisitesine sebep olduğu için klinikte kullanımı sınırlanmaktadır. Bir dizi toksisite mekanizmaları olsa da majör patojenik toksisite sebebi olarak serbest radikal ürünleri gösterilmektedir (7).

Erkek fertilitesinde azalmada en genel sebep spermatogenetik hasardır. Oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir (8). Spermatozoada oksidatif stres sperm motilitesi ve canlılığa zarar verdiği için erkek infertilitesi ile yakın ilişkilidir (9). Spermatozoanın, mitokondriyal membranlardan zengin olan orta parçası serbest radikallerin primer hedefidir. Aksonemal hasara neden olan hücre içi ATP' deki hızlı kayıp ile sperm motilitesinde azalma ROS'un majör etki şekli olarak göz önüne alınmaktadır (10).

Pek çok kanser tipinin tedavisi için kemoterapide doksorubisinin önemi yüzünden, doksorubisinin yan etkilerini engellemek için büyük çaba sarfedilmektedir. Bu bağlamda kombine terapi, analogların kullanımı, dozaj optimizasyonu gibi bazı stratejiler uygulanmaktadır. Bununla beraber diğer bir yaklaşım da oksidatif stresi azaltmak için ilacın bir antioksidan ile birlikte verilmesidir. Diyet ve endojen antioksidanlar, okside edici serbest radikalleri yok ederek veya reaksiyona girerek hücrel hasarı önlemektedir (11).

Resveratrol (RES) (trans-3,4',5-trihidroksi-stilben), üzüm, yer fıstığı, dut, ahududu, yaban mersini gibi çeşitli bitkilerde bulunan doğal bir fitoaleksindir (12).Yapılan araştırmalarda anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-viral, anti-tümöral gibi özellikleri içeren geniş biyolojik aktivitelerinin olduğu gözlenmiştir. RES' in hidroksil radikallerini süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığıda ortaya konmuştur. Ayrıca testiste germ hücre apoptozisini anlamlı derecede azalttığı bilinmektedir (13, 14).

Çalışmamızın amacı, doxorubisinin testiste meydana getirdiği toksik hasarda oksidatif stresin rolünü belirlemek ve güçlü bir antioksidan olan resveratrolun bu hasarlanmada koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi, iki testis, spermin depolanmasını ve vücut dışına taşınmasını sağlayan bir kanal sistemi, bu kanala açılan eklenti bezleri ve penisten meydana gelir. Kanal sistemi, bezler ve penis erkek aksesuar üreme organlarını oluşturur (15, 16). Üreme organları yerleşim yerlerine göre iç üreme organları ve dış üreme organları olarak iki gruba ayrılır. İç üreme organları; testis, epididimis, duktus deferens, duktus ejaculatorius ve genital eklenti bezlerinden (vezikula seminalis, prostat, bulboüretral bez) meydana gelir. Dış üreme organlarını ise penis ve skrotum oluşturur (17).

4.1. Testis Embriyolojisi

Bir canlının gelişimi, üreme hücrelerinin fertilizasyonla oluşturdukları seks kromozomlarının kombinasyonları (XX, XY) ile belirlense de erkek veya dişi gonadlarına ait morfolojik özellikler embriyonal gelişimin 7. haftasına kadar ayırt edilemezler. Bu sürece farklılaşmamış safha, bu safhadaki gonadlara da farklılaşmamış gonad adı verilmektedir (18, 19).

Primordiyal germ hücreleri, büyük, yuvarlak ilkel üreme hücreleri olup epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç eder ve 4. haftada yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyonun içinde kalır. Bu olurken ilkel cinsiyet hücreleri arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. 6. haftada ilkel cinsiyet hücreleri alttaki mezenkime girer ve primer cinsiyet kordonlarına ulaşır. Burada germ kordonlarını yaparlar ve artık farklılaşmamış evre sona erer (20).

Gonadlarposterior abdominal duvarın mezotel köşesi (mezodermal epitel), altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu), primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alırlar (18). Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık oluşur. Parmak şeklindeki epitelial kordonlar –primer seks kordonları- altındaki mezenşim

içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe dönüşür, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse medulla testise dönüşür, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (20, 21).

Seks kromozom kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda, genellikle testisler gelişmektedir. Testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir (22, 23).

Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece ağısı görünümlü rete testis oluşur. Seks kordonlarının (seminifer kordonların) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. 12. haftada yoğun tunika albugineanın gelişimi, fötüste testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mesorchium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılaşırlar. Seminifer tübüller, intersitisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenkimden ayrılırlar. 8. haftadan başlayarak Leydig hücreleri, androjen hormonlarını (testosteron ve androstenediyon) salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar dış üreme organlarının erkek yönünde farklılaşmasını uymaktadır. İnsan koryon gonadotropin hormonu (hCG) testosteron üretimini uyarır. Testosteron hormonunun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşır. Testosterona ek olarak fötal testisler glikoprotein yapısında bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Seminifer tübüllerin, ergenliğe kadar olan dönem boyunca lümenleri bulunmaz. Ergenlikten başlayarak lümen gelişir ve seminifer tübülleri oluştururlar (20, 24).

Seminifer tübül duvarında Sertoli ve spermatogonia olmak üzere 2 tip hücre bulunur. Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişirler. Spermatogonia ise primordial germ hücrelerinden farklılaşırlar. Sertoli

hücreleri, fetal testiste seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktulileri (duktuli efferentes) oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (19, 20, 21).

4.2. Testis Anatomisi

Testisler, erkekte temel üreme organı olup, sağlı sollu bir çift halde testis torbası (skrotum) denilen deri bir kese içinde asılı durumda bulunurlar. Her testis oval biçimde olup yanlardan basıktır. Testislerin büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle beraber, ortalama 4-5cm uzunluğunda, 2-3cm genişliğinde, 2-3cm kalınlığında ve 10-15 gr ağırlığındadır. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın, sağ testis sola göre % 10 daha ağırdır. Sol testis sağdakine göre biraz daha aşağıda yer alır (15, 17, 25). Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 2°C daha düşüktür (16). Erken fetal dönemde karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce kanalis inguinalis yoluyla skrotuma inerler (15, 17). Testislerin temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur. Testisler bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Bu yüzden şu tabakalarla kaplıdırlar (25, 26):

- a) Deri
 - b) Tunika dartos
 - c) Fasia spermatika eksterna
 - d) Fasia kremasterika
 - e) Fasia spermatika interna
 - f) Tunika vaginalis testis
- } skrotum

Testisin fasia medialis (iç yan yüz) ve fasia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı, extremitates superior (üst uç) ve extremitates inferior (alt uç) olmak üzere de iki ucu vardır. Testislerin üst ucunda appendix testis adı verilen küçük yassı bir yapı görülür. Paramesonefrik kanalın üst ucunun kalıntısı olan bu yapı kadınlarda tuba uterinanın abdominal ucuna karşılık gelmektedir. Testislerin arka kenarının dış kısmı boyunca

epididimis yer alır; funiculus spermaticus da margo posteriora tutunur. Testislerin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları visseral periton (epiorchium) ile örtülüdür. Periton arka kenarın sadece lateral kısmını örter. Tunica vaginalis; tunica albuginea ve tunica vasculosa ile sarılmıştır. Bu üç tabakaya capsula testicularis denir. Testis kapsülü sempatik ve parasempatik uyarılara yanıt vererek spontan kasılmalar yapar (25, 27). Tunica albuginea testisleri örten kalın, fibröz bir tabakadır ve testisin arka kenarından içeri girerek vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölmeye mediastinum testis denir. Mediastinum testis'in ön ve yan kısmından çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Bu uzantılar testis parankiminden geçerek tunica albuginea'nın iç yüzüne ulaşır ve testisi koni biçiminde lobuluslara böler (lobuli testis). Testis parankimini, lobuli testis içinde bulunan ve kıvrımlı şeklinden dolayı tubuli seminiferi contorti adı verilen kanalcıklar oluşturur. Her bir testis kanalcığı mediastinum testis yakınında tubulu recti adı verilen düz bir kanalcıkla uzanır. Bütün lobuluslardan gelen bu kanalcıklar metiastinuma sokulur ve burada rete testis denilen ağı oluşturur. Lobuli testislerde yapılan spermiumlar rete testis, duktuli efferentes adı verilen kanallar aracılığıyla epididimise gelir. Tunica vasculosa, testisin damar ağından oluşan ve tunica albuginea'nın iç yüzünü örten tabakasıdır (25, 27, 28).

Testisler abdominal aorta'dan çıkan arteria testicularis'ler ile kanlanır. Her bir testisin arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluştururlar. Plexus pampiniformis'i oluşturan venler daha yukarıda birleşerek vena testicularis'i oluşturur. V. Testicularis dextra v. Cava inferior'a v.testicularis sinistra v.renalis sinistra'ya dökülür. Lenfatikleri 4-8 adet toplayıcı trunkus şeklinde funiculus spermaticus içinde ilerleyerek nodi lymphatici ve nodi lymphatica aortici laterales ile sonlanır. Testisleri inerve eden sinirler 9-12 torakal spinal segmentten çıkarlar. Bu lifler plexus aorticus ve plexus renalis'ten ayrılarak a.testicularis çevresinde plexus testicularis'i oluştururlar (25, 26, 27, 29).

4.3. Testis Histolojisi

Testis erkek üreme sisteminin ana parçası olarak androjenlerin sentezi ile karakterize bir endokrin fonksiyon ve spermatogenez ile bir ekzokrin fonksiyona sahiptir (30, 31). Skrotum içinde yer alan testisler dıştan üç tabakalı kalın bir kapsülle

çevrilidir. Kapsülün dış tabakası tunika vajinalis, orta tabakası tunika albuginea, içte ise tunika vaskuloza olarak bilinen kan damarlarınca zengin gevşek lifli bağ dokusu bulunur. Organın arka yüzünden, bağ dokusu kalınlaşması mediastinum testis olarak bezin içine doğru uzanır. İnce bağ dokusundan oluşan bölümüne septula testis (septum) adı verilir, mediastinumdan tunika albugineaya kadar uzanır ve bu septumlar organı 250 adet testiküler lopçuklara böler. Her bir lopçuk 1-4 seminifer tübül içerir. Her seminifer tübül 150-250 µm çapında, 30-70 cm uzunluğunda ve son derece kıvrıntılıdır. Seminifer tübüller testisin ekzokrin kısmını oluşturur; hücre oluşturan bir bezdir, holokrin salgı ürünleri spermatozoalardır. Her lobülün uç kısmındaki seminifer tübüller daralarak tubuli rekti olarak bilinen kısa segmentler şeklinde uzanır ve bunlar sırayla rete testisle birleşir, anastomoz yapan rete testis kanalları duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanır (32, 33, 34, 35, 36).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübül bazal membran ve lamina propria olarak bilinen 2 farklı tabakadan ve karmaşık bir germinal epitel tabakasından meydana gelir. Bazı yazarlar lamina propriyanın, bazal membranın bir üyesi olduğunu düşünürler. Bazal membran seminifer epitel ile direkt ilişkilidir ve sertoli hücreleri tarafından sentezlenen laminin, kollajen tip I, kollajen tip IV içerir. Lamina propria üç eş merkezli bölgeden oluşur. Orta ve dış tabakada peritübüler salgı yapan 3-7 katmanlı ince uzun basıklaşmış hücreler görülür. İç tabakada (lamina interna) seminifer epitelin bazal membranabitişik, kalın, dispozisyonlu bol miktarda kollajen içerir. Ortabölge (myoid katman) 3-5 katmandan oluşan myoid hücreleri veya miyofibroblastolarak adlandırılan modifiye düz kas hücreleri ile kaplıdır (36, 37). Bu hücreler bütün memeli türlerinde bulunmaktadır. Fakat peritübüler miyofibroblastların (myoid hücre) dokudaki organizasyonları türe göre değişir. Fare, hamster ve sıçan gibi laboratuvar kemirgenlerinde; testiste myoid hücre sadece tek katman olarak görünür. Bu hayvanlarda hücreler, epitel hücreleri olarak kompleks kavşakları birleştirir. Öte yandan insanlarda ve bazı diğer hayvanlarda seminifer tübülün bazal tabakasında pek çok hücresel tabaka mevcuttur. Myoid hücreler bol miktarda, türe özgü bir şekilde hücrelere dağıtılan aktin filamentleri içerir. Sıçanlarda bir myoid hücre içindeki filamentler seminifer tübülün uzun eksenine hem

daireysel hem de uzunlamasına çalışır. Ayrıca bu hücreler aktin, miyozin, desmin, vimentin gibi hücre iskeleti proteinleri içermektedir (38, 39). Peritübüler hücreler testis tübülünün kasılma aktivitesinde bulunurlar ve non-motil sperm taşınmasından sorumludur. Ayrıca sertoli hücreleri ile mezenkimal epitelin etkileşimini sağlar. Hem hücre dışı matriks elemanlarının birikimi hemde parakrin agonistlerinin salgılanmasını sağlar. Bu parakrin antagonistlerinin en ilginç PModS olarak bilinir (40, 41).

4.3.2. Seminifer Epitel

Seminifer tübülü döşeyen epitel, Sertoli ve spermatogenetik hücrelerini içeren iki tip hücreden meydana gelmektedir (32).

4.3.2.1. Sertoli hücresi

Sertoli hücreleri bazal membran üzerine oturan uzun, silindirik ve düzensiz şekilli hücrelerdir. Bu hücreler ‘hemşire hücre’ olarak ta bilinir ve germ hücrelerinin gelişmesinde yapısal destek sağlamaktadır (42, 43). Puberteye kadar ana hücreler olup puberteden sonra seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10’unu oluşturur. İleri yaştaki erkeklerde germinal epitel hücrelerinin sayısı azaldığı zaman sertoli hücreleri tekrar seminifer epitelin önemli bir bileşeni olmaya başlar (35, 44). Yetişkin sıçanlarda sertoli hücre sayısı her bir testis için yaklaşık 20- 46 milyon arasındadır. Bu sayı tavşanlarda 24 milyon, farelerde 110 milyon, insanlarda da 41 milyondur (45).

Yapılan stereolojik bir çalışmada 3 aydan 10 yaşına kadar olan süreçte Sertoli hücrelerinin toplam sayısı geç fetal dönemden itibaren 260 milyondan 1500 milyon olacak şekilde önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bir başka artışta erişkinlerde (25 yaşından daha büyük) pubertede Sertoli hücre sayısının 3700 milyona kadar ulaşmasıdır. Bu belirteçler doğumdan sonra gerçekleşen Sertoli hücre nüfusunun niteliksel ve niceliksel olarak değişim gösterdiğini düşündürmektedir (45). Diğer bir çalışmada olgunlaşmamış Sertoli hücre markırı olan monoklonal antikor (M2A) prepubertal dönemde M2A pozitif reaktivite gözlenirken postpubertal dönemde gözlenmemiştir. Bu markır testis gelişimi sırasında Sertoli hücresinin olgunlaşması etkileyen faktörleri incelemek için yararlı olabileceği görüşüne varılmıştır (46).

Sıçanlarda Sertoli hücrelerinin proliferasyonu fetal yaşamın 16. gününde başlar ve doğuma iki gün kala maksimuma ulaşır. Postnatal 15. günde Sertoli hücresi sayısı maksimum sayıya ulaşır ve doğumdan sonra da elektromikrografilerde epitelin bazalinde gözlenmeye başlar (47).

Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerin duyarlı olduğu birçok faktöre karşı dayanıklıdır. Örneğin inmemiş testis vakalarında, vücut ısısına maruz kalan testislerde spermatogenik hücreler dejenere olurken Sertoli hücrelerinde dejenerasyon görülmez (35, 48). Sertoli hücreleri geniş ve düzensiz çekirdekli oval yapıda, epitelin bazaline yerleşik durumdadır. Fakat yüzeyinde bir veya daha fazla içe doğru katlantı olabilir. Yaklaşık 9 ila 12 µm ortalama boyutludur. Homojen bir nükleoplazmaya sahip olup, ökromatik yapıdadır. Sitoplazması eozinofilik yapıdadır. Çekirdekçikle beraber çekirdek zarı altında kümelenmiş iki belirgin kromatin yoğunlaşması çoğu memelide özgün olan tripartide (üçlü) görünüşünü oluşturur. Sitoplazma düz ve granüllü endoplazmik retikulum, bol miktarda mitokondri, lizozomlar, lipid inklüzyonları, heterofajik vakuoller, yaygın bir golgi aygıtı ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) içerir. Işık mikroskopunda incelendiği zaman kromatinden yoksun olduğu için soluk renkte görünürler. Ayrıca bazı Sertoli hücrelerinde onlara özgü Charcot-Böttcher kristaloidleri bulunur. Bunlar ince, 10-25 µm uzunluğunda fusiform yapılarıdır ve bazen ışık mikroskopunda görülebilirler (47, 49).

Sertoli hücrelerinin bazolateral kısımları birbiriyle zonula okludens türü sıkı bağlantılar kurarak kan testis bariyerini oluştururlar. Böylece zonula okludenslerin altında ve üstünde iki bölme şekillenir. Bazal membranla zonula okludensler arasındaki alana bazal (ekstratubuler) kompartıman, zonula okludenslerden itibaren tubul lümeni tarafındaki alana ise adlüminal (intratubuler) kompartıman denir. Spermatogoniyumlar ve preleptoten spermatositler bazal bölümde yer alırken preleptoten sonrası primer spermatositler, sekonderspermatositler ve spermatidler adlüminal bölümde yer alırlar. B tipi spermatogoniyumların mitotik bölünmeleriyle oluşan genç spermatositler bazal kompartmanda bulunur. Gelişme halinde olan bu hücreler zonula okludens adı verilen sıkı bağlantı noktalarını geçerek adlüminal kompartımana ulaşırlar (35, 48, 50).

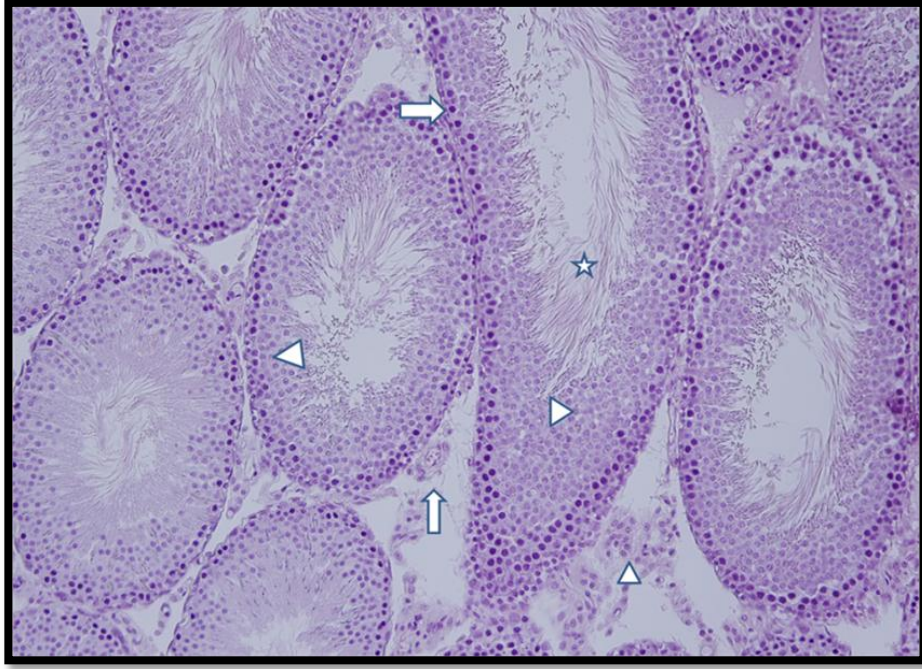
Sertoli hücrelerinin fonksiyonları (36, 45, 49, 51):

1- Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek:
Her sertoli hücresi gelişmekte olan 30-50 germ hücresini destekler.

- 2- Spermiyogenezin sonunda atılan artık cisimcikleri fagosit etmek,
- 3- Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, spermiyasyon sürecinde, seminiferöz tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,
- 4- Seminiferöz tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak,
- 5- Follikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemek. Bu protein, seminiferöz tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar.
- 6- Anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen; inhibin ve uyarıcı aktivin adı verilen peptidleri salgılamak,
- 7- Anti-Müllerian (Müllerian inhibe edici) hormonu üretmek. Bu hormon embriyonik gelişim sırasında, erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlar.
- 8- Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri vasıtasıyla irtibatlıdır. Sertoli-Sertoli bağlantı komplekslerinin kan-testis bariyerini oluşturmaktadır.
- 9- Testiküler transferrinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alırlar. Testiküler transferrin de bir proteindir ve üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılmaktadır.

4.3.2.2. Spermatogenetik Hücreler

Spermatogenetik hücreler seminifer tübüllerde bazal lamina ile lümen arasında yerleşik 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş hücre serileridir. Bu hücreler bazal laminadan lümenine doğru; spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoalar şeklinde yerleşmiştir (Şekil 1). Bu germ hücreleri ontogenik olarak farklı hücre tipleri değildirler. Fakat erkek germ hücreleri birbirini izleyen evrelerde sürekli bir değişim sürecindedirler (32, 48).



Şekil 1. Testis Genel Histolojik Yapısı

Spermatozoa (★) İnteristisyel Alan (▲), Leydig Hücresi (↑), Spermatogonium (⇨), Spermatid (▷), Primer Spermatisit (◁).

4.3.3. Spermatogenez

Seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezis, spermatogoniumdan spermatozooya kadar süren evredir. Bu sıçanlarda testisin her gramından günlük 10^7 olgun spermiyumun üretildiği oldukça organize bir süreçtir (52).Spermiyum oluşuncaya değin spermatogenezisin tüm evreleri spermatogenetik hücre katmanlarında gerçekleşir. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu fenamon üç faza ayrılabilir:

- **Spermatisitogenez** olarak adlandırılan evrede, spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatisitler meydana gelmektedir.

- **Mayoz evresi;** Spermatisitlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatisitlerin olduğu evre mayoz adını almaktadır.

- **Spermiyogenez** ise spermatisitlerin özenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoları oluşturduğu safhadır (49, 53).

Spermatogenezi başlatan ilk hücre seminifer tübülün bazal membranındaki spermatogoniumlardır. Bu hücreler yenilenebilen ve farklılaşan hücrelerdir. Spermatogonial kök hücrelerden köken alan spermatogoniumlar, puberte ile birlikte mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Puberte döneminde insan seminifer epitelinde rutin histolojik boyamalarda çekirdeklerinin görünümüne göre üç tip spermatogonium ayırt edilir (35, 54).

- 1- Koyu A tipi spermatogonyumlar; küçük ve kubbe şeklinde hücrelerdir. Çekirdek oval ve heterokromatiktir. Seminifer epitelin kök hücresi olduğu düşünülmektedir. Hücre döngüsüne girmezler, depo hücrelerdir. Mitozla bölünerek yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumları yaparlar.
- 2- Açık A tipi spermatogonyumlar; çekirdek ökromatiktir ve çekirdekçikler çok belirgindir. Mitokondriyonlar, az sayıda Golgi kompleksi, birkaç granüllü endoplazmik retikulum tübülusu ve ribozomlar kapsarlar. Testosteron etkisiyle mitozla bölünürler ve B tipi spermatogoniumları oluştururlar. Bu hücreler B tipine dönüşmeden önce sırasıyla A₁, A₂, A₃, A₄ ve daha sonra ara spermatogoniumları yaparlar.
- 3- B tipi spermatogoniumlar; merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip, küre biçiminde çekirdek içerirler. B tipi spermatogoniumlar, primer spermatositleri oluştururlar (48).

Primer spermatositler; bu hücreler birinci mayoz bölünmenin başlamasından önce adlüminal kompartımana göçerler. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde kangal oluşturma sürecinin değişik evrelerinde kromozom bulunması ile tanınırlar. Bu hücreler oluşumlarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Bu aşama yaklaşık 22 gün sürdüğünden kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu dönemdeki hücrelerdir. Mayoz öncesinde DNA'sını kopyalayan bu hücrelerde kromozom sayısı (4n) ve DNA miktarı (2d) iki katına çıkar. Örneğin insanlar da birinci mayozun profaz evresi sonrasında her biri iki kromatide sahip 46 kromozomu belirlemek mümkündür. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasından sonra sekonder spermatositler oluşur (32, 44, 45, 48).

Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatositler, 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücrelerdir. Spermatositler, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adlüminal bölümünde

yer alırlar. Böylece, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan ikinci mayoz bölünmeye giderler. Sekonder spermatositlerin bölünmesi; 23 kromozom taşıyan iki hücrenin, spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploit sayıda kromozom içeren spermatitler oluşur (55). Spermatitler yaklaşık 7-8 µm çapında, küçük, yuvarlak şekilli ve haploit sayıda kromozom taşıyan hücrelerdir. Yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında ve yine adluminal bölgede yerleşmişleridir. Spermatitler, spermiyogenezis denilen hücresel bir değişim geçirirler. Spermiyogenezis, spermatozoon üretiminin son aşamasıdır ve spermatitlerin, son derece özelleşmiş hücreler olan spermiyuma dönüşmesi sürecidir. Spermatidin, olgun spermiyum haline (spermatozoon) dönüştüğü bu süreç, dört ayrı evrede ayrılır:

1. Golgi Evresi: Granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenen ve döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimler, Golgi kompleksinde PAS-pozitif yapıdaki proakrozomal granüller şeklinde birikir. Daha sonra bu granüller birleşerek, membranla sınırlı bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek, oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken, hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sarar.

2. Şapka Evresi: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozomal şapkanın altında yer alan çekirdek kılıfı porlarını yitirerek kalınlaşır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır.

3. Akrozomal Evre: Bu evrede, hücrenin akrozomu içeren ön bölümü seminifer tübülün bazaline bakar. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır. Çekirdeğin uzaması ve yoğunlaşması, mikrotübüllerden oluşan silindir benzeri bir yapıyla kolaylaştırılır. Bu yapıya manşet denilir. Sentriyollerden hücre yüzeyine dik duranı, spermiyumun kuyruğunu yapacak bir flagellum oluşturur. Diğeri, kuyruğun başlangıç çevresinde bir kuşak oluşturacak şekilde göç eder. Aynı sürede sitoplazma flagellum çevresinde hareket edip onu sarar. Mitokondriyonlar kuyruğun başlangıç bölümü çevresinde spiral olarak yerleşip spermiyumun gövdesini yaparlar. Spermiyumun kuyruğu motor bir işleve sahiptir. Mitokondriyonlar bunun için gerekli olan enerjiyi sağlar.

4. Olgunlaşma (Matürasyon) Evresi: Spermiyum olgunlaşıp kuyruklu hale gelince olgunlaşma sürecini tamamladığı Sertoli hücresinden ayrılır ve lümende serbestleşir. Geri kalan sitoplazma artıkları Sertoli hücrelerince fagosite edilir (32, 36, 44, 48, 49) .

4.3.4. Spermatozoa

Ortalama 60-65 µm uzunluğunda olan olgun spermiyum, baş ve kuyruktan oluşmaktadır (49):

-Baş: Yaklaşık 4,5-5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır ve plazma membranı ile sarılıdır. Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaştırmış biçimli ve yoğun bir yapıdadır. Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter ve lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluronidaz ve yanısıra nöraminidaz) içerir. Akrozomal enzimler oositi saran korona radyata ve zona pellusida'ya spermiyum girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır (35).

-Kuyruk: Boyun, orta, esas ve son parçalar olarak dört kısımdan oluşur. Boyun yaklaşık 5 µm uzunluğunda, çekirdeğe tutunmuş proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolü bulunduran dar bir parçadır. Kuyruğun orta parçası yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Boyun ile esas parça arasında uzanır. 9+2 mikrotübül yapısında filagellum kapsar. Çevrede spiral mitokondriyon halkası vardır. Bu parçada filagellum çevresinde ayrıca kuyruk sonuna doğru incelerek kaybolan dokuz tek kalın fibril daha vardır. Esas parça yaklaşık 45 µm uzunluğunda, kuyruğun en uzun parçasıdır. Annulus adı verilen mitokondriyon sarmalın son dönümünün altında yoğun bir halka olan son halkadan itibaren başlar, mitokondriyon sarmalı içermez. Yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve fibröz bir kılıftan oluşur. Hem aksonem ve hem de fibröz kılıf, spermiyumun öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanması nedeniyle sadece aksonem kapsar ve kuyruğun en kısa parçasıdır (32, 35, 44, 48).

4.3.5. Seminifer Epitel Döngüsü

Seminifer epitelyum siklusu; epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan maturasyon değişiklikleri dizisini ifade eder (56). İnsanda ve sıçanlarda spermatogenez süreci belirgin şekilde benzerlikler içerse de bazı farklılıklar vardır. Sıçanlarda spermatojenik döngü her 12.9 günde bir başlarken bu süre insanlarda her döngü arasında 16 gün bulunmaktadır. Ayrıca sıçanlarda bir spermatojenik siklusun tamamlanması için 52-54 gün gerekirken insanlarda bu süre 65 gündür. Sıçanlarda spermatogonial farklılaşma 12. gün sonlarında, insanlarda da 16. gün de başlar ve spermatositlerin gelişimi için sıçanlarda 14 gün insanlarda ise 25 gün gereklidir. Spermiyogenezis, sıçanlarda haploid germ hücrelerinden elongate sperme dönüşüm 7-14 gün, insanlarda ise bu süreç 8-14 gün almaktadır (57, 58).

4.3.6. Kan Testis Bariyeri

Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları sıkı bağlantı kompleksleri aracılığı ile birbirlerine bağlıdır ve kan-testis bariyerini oluştururlar. Kan-testis bariyerinin amacı, gelişmekte olan germ hücrelerini immun sistemden ve zararlı maddelerden korumaktır. Böylece seminifer tübül bazal ve adluminal olmak üzere iki kompartmana ayrılır (59, 60).

Spermatogonya ve prelepton spermatositler içeren adluminal kompartımandır. Buraya vasküler kompartmandan madde geçişi serbesttir. İkinci kompartman bunun üzerinde yer alır ve vasküler sistemden izole edilmiştir. Seminifer epitel hücreleri ve komşuluğundaki Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, büyük hidrofilik moleküllerin, özellikle proteinlerin intersellüler aralığa geçmesine engel olurlar. Testisin ekzokrin çıkış kapısı rete testistir. Seminifer tübüllerden rete testise geçiş bölümünde, Sertoli-benzeri hücrelerce oluşturulan ve valf etkisi yapan özel bir dizilim vardır. Bu nokta, kan-testis bariyerinin bittiği, otoimmün orşitlerin ilk olarak belirgin hale geldiği yerdir. Buradan sonra epididim içerisinde yolculuğuna devam ederek maturasyonunu sağlayan spermatozoa, fertilizasyon kabiliyetini de kazanmış olur. Kan-epididim bariyeri kan-testis bariyerinden farklıdır. Epididimde moleküllerin

permeabilite sınırlaması yaşla beraber azalır. Bu özellikle epididimisin korpus bölümünde gözlenir (61).

Spermatogoniumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Seksüel olgunlaşma, immünolojik yeteneğin gelişmesinden daha sonra meydana geldiğinden, farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı (antijen) olarak algılanmaktadır. Bu durum, germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı başlatmaktadır. Ayrıca bu bariyerler seminifer tübül içerisinde normalde bulunmayan ve kan komplementleri olarak bilinen immunglobulinler, makrofajlar ve diğer lökositlerin girişini önler ve bu nedenle serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikoru bulunan hastalarda herhangi bir fertilite bozukluğu görülmemektedir. Bunlara ek olarak baskılayıcı T-lenfositleri (CD+8) de spermatozoon antijenlerine karşı oluşabilecek oto-immunizasyonun engellenmesinde önemli bir role sahiptirler (62, 63).

4.3.7. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, pencere kapillerler ve lenf damarları ile doludur. Bağ dokusu değişik tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte başka bir tip hücre daha işlevsel olarak belirgin hale gelir. Bu, yuvarlak ya da çokgen şekilli, çekirdeği merkezde ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik sitoplazması bulunan bir hücredir. Bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir ve steroid salgılayan hücre özellikleri gösterir (36).

Leydig hücreleri, kendi adını taşıyan Franz Leydig tarafından 1850 yılında keşfedilmiştir (64). Leydig hücreleri memeli testisinde interstisyel alanda tek tek yada gruplar halinde yerleşmiş testosteron üreten, spermatogenezi ve seminifer tübülleri destekleyen hücrelerdir. Genelde kapiller damarlara yakındırlar (64, 65, 66). Bu hücreler karakteristik tübüler kristal mitokondriyonlar ve gelişmiş bir granülsüz endoplazmik retikulum içerir. Bu hücrelerin sitoplazmasında sadece insanlarda ve vahşi çalı sıçanlarında görülen Reinke kristaloidleri de görülmektedir. Puberte ile birlikte görülmeye başlayan ve yaşlılıkta sayıları artan bu oluşumların fonksiyonları bilinmemektedir (48).

Leydig hücresi, fetal ve yetişkin Leydig hücresi olmak üzere iki farklı jenerasyonda tanımlanır. Bu hücreler arasında morfolojik ve biyokimyasal açıdan farklılıklar olmasına rağmen her iki hücre çeşidi androjen üretmek için benzer özel fonksiyonlara sahiptir. Fetal tip Leydig hücreleri, fetal ve neonatal yaşam boyunca erkeğe ait primer seks karakterlerinin oluşmasından sorumludur. Bunları pubertal erkeğe ait özelliklerden sorumlu yetişkin tip Leydig hücrelerinin oluşması takip eder (67).

Yetişkin Leydig hücreleri neonatal testisin interstisyel alanında mezenşimal kök hücrelerden farklılaşarak gelişmeye başlar. Yetişkin Leydig hücreleri 4 farklı aşamada tanımlanır. Bunlar kök Leydig hücreleri, progenitor Leydig hücreleri, immatür Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleridir. Kök Leydig hücreleri farklılaşmamış hücrelerdir. Belirsiz, kendini yenileme, farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Kök Leydig hücrelerinden progenitor Leydig hücreleri elde edilir. Bunlar iğsi şekilde hücrelerdir ve LH hormon reseptörü pozitifdir, yüksek mitotik aktiviteye sahiptirler ve çok az testosteron üretirler. Progenitor Leydig hücrelerinden immatür Leydig hücresi gelişir. Bunlar yuvarlak yapılı bol miktarda endoplazmik retikulum içerirler. Bir miktar testosteron içerir fakat yüksek seviyede testosteron metaboliti üretmezler. Bu hücrelerin bir tek bölümü yetişkin Leydig hücrelerini üretirler. Yetişkin Leydig hücreleri çok yüksek seviyede testosteron üreten son dönem farklılaşmamış hücrelerdir (68).

Testisin endokrin kısmını meydana getiren bu hücrelerin en önemli görevi androjenlerin özellikle de testosteronun sentezi ve salgılanmasıdır. Leydig hücrelerince üretilen testosteron, embriyonal dönemde; gonadların normal bir şekilde gelişiminden, pubertal dönemde; sperm üretimi ve aksesuar cinsel bezlerinin sekresyonunun başlaması ile sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden ve erişkinlerde; spermatogenezin, sekonder cinsiyet karakterlerinin ve cinsel salgı bezlerinin fonksiyonlarının devam ettirilmesinden sorumludur (48).

Erkeklerde serum testosteron seviyesinde bir düşüş olduğu zaman vücut kompozisyonu, duygu durumu, enerji düzeyi, kas gücü, cinsel ve bilişsel işlevlerde değişiklikler meydana gelmektedir (68, 69). Testosteron sentezi sırasında plazma kolesterolü hücreye girer, asetil koenzim A (CoA) tarafından esterleştirilir ve sitoplazmada lipid damlacıkları şeklinde depolanır. Düz endoplazmik retikulumda yağ asitleri kolesterole dönüştürülür. Kolesterol, yağ damlacıklarından mitokondriyonlara

steroidogenik akut regülatör protein (StAR) aracılığıyla taşınır ve pregnenolon üretilir. Düz endoplazmik retikulumdaki enzimler pregnenolon'u progesteron'a ve onu da testosterona dönüştürür. Leydig hücrelerince üretilen iki daha az öneme sahip androjen dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenediondur (35, 68).

4.4. Testis Fizyolojisi

Testis dış ve iç salgı yapan bileşik tübüler bir bezdir. Kıvrıntılı seminifer tübüllerinde spermlerin holokrin salgı ürünü olarak atılması testisin dış salgı işlevini oluştururken, Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması iç salgı işlevini oluşturmaktadır. Testosteron yüksek lokal etkiyle seminifer tübüllerdeki spermatogeneze görevlidir ve kana geçerek erkek üreme sistemine yardımcı bezlerin (prostat, vesikula seminalisler, bulboürethral bezler) işlevini de etkiler. Ayrıca erkeğe özgü ikincil cinsiyet özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, mükümler vücut şekli) ortaya çıkmasından sorumludur (70, 71).

Normal erişkin erkeklerdeki testosteronun salgılanma hızı 4-9 mg/gün'dür. Plazmadaki testosteronun %98'i proteinlere bağlıdır: %65'i gonadal steroid-bağlayıcı globülin (GBG) veya seks steroidi-bağlayıcı globülin olarak bilinen β -globuline, %33'ü ise albumine bağlıdır. Plazma testosteron düzeyi erişkin erkeklerde yaklaşık 525ng/dl'dir ve bu değer yaşla birlikte azalır (72).

Testislerin esas hormonu olan testosteron 17. karbonda bir -OH grubu taşıyan 19 karbonlu bir steroiddir. Erkeklerde testosteronun %95'i testisin Leydig hücrelerinde kolesterolden, %5'i de adrenal korteksten salgılanan androstenediondan sentezlenir. Testosteron salgısı ön hipofizden salınan LH (lutein yapıcı hormon) denetimi altındadır. LH'nın leydig hücrelerini uyarması, petek LH almacı ve Gs aracılığıyla cAMP yapımında meydana gelen bir artış içerir. cAMP, protein kinaz A'yı harekete geçirerek, kolesterol esterlerinden kolesterol yapımını ve kolesterolün pregnolona dönüşümünü artırır (72).

Ön hipofiz tarafından salgılanan diğer bir gonadotropin olan FSH ise, Sertoli hücrelerini etkileyerek ABP (Androjen bağlayıcı protein) salgılanmasını sağlar. Böylece spermatogenez için gerekli oranda testosteronun yerel etkisi sağlanır. Bu etki spermatogenezin başlaması için gereklidir. Germ hücrelerinin azalması FSH salgısını

uyarır. Testisle hipotalamohipofizer sistem arasında çalışan bir negatif feedback kontrol mekanizması vardır. Testosteron düzeyinin artması, hipotalamusun gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH)'unu inhibe eder, bunun sonucunda ön hipofizden LH ve FSH salınması azalır. Testosteron ön hipofizde LH salgılayan hücreleri direkt olarak da inhibe edebilir. FSH salgılanması Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonuyla durdurulur (73).

İnhibin, subünitine disülfid köprüleriyle bağlanmış inhibin A ve inhibin B' den oluşur. Bu subünit protein grubunun, transforming growth faktör-1 (TGF1) ile benzer yapısal özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (74). Yapılan in vitro çalışmalar sonucunda inhibin hormonu Leydig ve Sertoli hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve steroidogenezisin düzenlenmesinde otokrin ve parakrin olarak davranır. Fakat in vivo çalışmalarda henüz bu sonuca karar verilememiştir (75). Erkek çocuklarda testiküler fonksiyonunun biyokimyasal göstergesi olarak kullanılmakta; Sertoli hücrelerinin varlığı ve fonksiyonunun belirteci olarak kabul edilmektedir (94). İnhibin B, testis hasarında (radyasyon, kemoterapi v.b.), gonadal disgenezis sendromunda ve iki taraflı nonpalpabl testislerde, testis dokusunun varlığını göstermek amacıyla kullanılmıştır (76). FSH salgısını inhibe eden inhibin olduğu gibi, aktive eden de aktivin'dir. Aktivin için testiste primer kaynak peritübüler myoid hücrelerdir. Aktivinin tam olarak fonksiyonu çözülemese de yetişkinlerde erken testis gelişimi sırasında testis fonksiyonu ve büyüklüğüne karar vermede önemli görevi olduğu düşünülmektedir (77).

4.5. Epididimis

Epididimis (epididymis), her bir testisin arka kenarına yarım ay şeklinde yapışmış iki küçük organdır. Üst kısmı daha kalındır; aşağıya doğru inceliklenir. Epididimisin üç parçası vardır: Baş (caput epididymis), gövde (corpus epididymis) ve kuyruk (cauda epididymis). Epididimisin baş kısmı, testisin üst ucuna dayanır. Gövde, testisin arka kenarına, kuyruk ise alt uç üzerindedir. Epididimis ortalama 5-6 m uzunlukta ve 400 µm çapında yumak yapmış bir borudur. Epididimisin baş kısmına, testisten çıkan 12-15 duktülü efferentes testis açılır (17, 78).

Epididimis, spermiyum olgunlaşması, ejakülasyona kadar spermiyum depolanması, kuyruğuna doğru peristaltik hareketlerle spermiyum taşınmasını sağlayan

oldukça kıvrıntılı bir kanaldır (35). Epididim kanal sistemine kadar olan yolda spermiyumlaroldukça hareketsiz oldukları halde epididim içindeki asit ortamda en az 10 gün, en fazla 3-5 hafta bekleyebilirler ve ovumudölleyebilecek olgunluğa erişirler (17). Kanalı, kan damarları ve düz kas hücrelerinden zengin sıkı bağ dokusu sarar. Epididim lümeni, yuvarlak biçimli bazal ve yüksek boylu prizmatik hücrelerden oluşan yalancı çok katlı epitelle (epithelium pseudostratificatum columnare) döşelidir. Hücreler bazal membran üzerine otururlar. Epitel katın altında düz kas katı (tunica fibromuscularis) ve çevrede bağ dokusu (tunica adventitia) bulunur (79). Epididimisin proksimalindeki düz kas tabakası yavaş ritmik kasılmalar ile spermatozoanın duktus deferense doğru hareketini sağlar. Distali, düz kas hücreleri, sempatik sinir sistemi tarafından ejakulasyon sırasında epididimisin alt kısmında yoğun kasılmalar üretir (50).

Duktus epididimis epitelinde β -defensin118 (DEFB118), cystatin ile ilişkili epididimise özgü (CRES) protein, disintegrin, metalloproteinaz (ADAMs), protein 4, P100 proteini, HIS protein, CD52 gibi pek çok protein bulunmaktadır (80, 81, 82, 83).

Epididimis epiteli stereosilyalı esas, bazal, apikal, berrak, halo ve koyu hücreleri içerir (84, 85). Bu hücrelerde holokrin hücre tipleri olarak görülmektedir (86). Esas hücreler epididimde en çok bulunan hücre tipidir (87). Bazal laminadan lümene uzanan prizmatik şekilli hücrelerdir. Bu hücreler ayrıca Sertoli hücrelerince ortadan kaldırılamamış olan artık cisimleri ve bozulan spermiyumları fagosite eder. Apikal bölümlerinde dallanan stereosilyalar bulundururlar. Çekirdekleri uzunca ve çentiklidir (79). Epididimis içinde sentez, absorbsiyon ve sekrete işlemlerinde majör rol oynar ve bu özelliğini de organel yönünden zengin olmasından alır (88). Sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozom ve veziküller bulunur. Ayrıca kan-epididim bariyerinin şekillenmesinde esas hücrelerin rolü olduğu söylenmektedir. Bu bariyerde post- pubertal dönemde antijene karşı otoimmün cevabın önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (87, 89). Baş bölgesinde hücreler uzundur ve kuyruğa doğru giderek kübikleşir. Hücreleri glikoproteinden zengin salgı oluştururlar. Endositoz ve pinositozu simgeleyen yapılar içerirler. Ayrıca Gliserofosfokolin denilen ve spermiyumların kapasitasyonunu baskılayan bir madde salgırlarlar (79). Bazal hücreler epididimde ikinci en bol hücre tipidir. Bazal laminaya oturan piramidal şekilli hücrelerdir. Esas hücrelerin farklanmamış öncülleri olarak kabul edilirler. Fonksiyonları tam olarak çözülmemesi bu hücrelerin reaktif oksijen radikallerine karşı spermatozoaları koruyucu olabileceği

söylenmektedir. Berrak hücreler duktus epididimisin kuyruk bölgesinde görülürler. Spermiyumlardan sitoplazmik artıkların uzaklaşmasını ve luminal içeriğin alınmasını sağlarlar (89).

Apikal hücreler diğerlerinden daha az bulunurlar ve duktus epididimisin baş bölgesinde izlenirler. Sitoplazmaları mitokondriyonlardan zengindir. Göç eden hücre özelliği taşırlar ve epididimisin her yerinde görülmektedirler (89, 90). Halo hücreler intraepitelyal lenfositlerdir ve epididimis immünolojik engelinin önemli bileşenleridir (91).

4.6. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

4.6.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres, pro-oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulması sonucu lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkarak organizmada hücresel hasara yol açan ve birçok hastalığın patogeneğinde kritik öneme sahip olan bir olaydır (92).

Serbest radikaller yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom gruplarıdır (93). Bu eşleşmemiş elektron nedeni ile serbest radikal molekülü kararsız konumdadır ve kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Bu nedenle serbest radikalın kimyasal aktivite potansiyeli yüksektir (94). Serbest radikallerin artması oksidatif strese sebep olur ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Ayrıca mitokondrideki aerobik solunum ve kapiller geçirgenliğinin bozular, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır (95). Bu nedenle oksidatif stres, yaşlanma sürecinden (96), kanser (97), renal yetmezlik (98), infertilite (99) gibi birçok hastalığın etyolojisinde kritik rol oynamaktadır.

Oksidatif streste etkili olan reaktif oksijen türleri olarak süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (RO_2), hidroperoksil (HRO_2^-) gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asiti (HOCl) gibi nonradikal türleri sayabiliriz. Serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşması radikal zincir reaksiyonları ile diğer ürünlerin üretimine yol

açarlar. Süperoksit radikali, organizmada NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz gibi çeşitli oksidazlar aracılığı ile ve bazı koşullarda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile oksijenin bir elektron redüksiyonu sonucu oluşur. Ayrıca ATP sentezi için gerekli olan normal oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrial elektron transport zinciri tarafından üretilir. Normal şartlar altında O_2^- antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla elimine edilir. O_2^- mitokondride manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD), sitoplazmada bakır süperoksit dismutaz (Cu-SOD) ile H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 ise mitokondride glutatyon peroksidaz (GP-x), lizozomda katalaz (CAT) tarafından H_2O ve O_2 'e parçalanır. H_2O_2 ayrıca Fe, Cu gibi elementlerin varlığında reaktif hidroksil (OH) radikaline (Fenton reaksiyonu)dönüştürülebilir (100).

Serbest radikaller membran yapısındaki fosfolipitlerde lipid peroksidasyona sebep olarak doğrudan hücreye zarar verir. Lipid peroksidasyonu son ürünü olarak malondialdehid (MDA) oluşur. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (100, 101, 102).

4.6.2. Antioksidan Sistem

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' olarak bilinirler (103).

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler (104):

1. Temizleme etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Baskılama etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi

4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.

Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılırlar. Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GP-x), yer alır. Bu birincil savunma enzimlerinden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan glutatyon redüktaz (GSH-Rd) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimleride vardır ve bunlara ikincil antioksidan enzimler denilmektedir. Non enzimatik antioksidan savunma sistemleri ise başlıca glutatyon (GSH), vitamin A, C, E, melatonin, albümin, bilirubin, ürik asit, karoten, sistein, transferrin gibi maddelerden meydana gelmektedir (105, 106).

SOD' un işlevi endojen olarak oluşan süperoksit radikalının etkilerinden hücreleri korumaktır. Bunu da süperoksit radikalının hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalize ederek yapar. İki tip SOD vardır. Birincisi bakır-çinko metaloenzimidir ve sitozolde bulunur. Diğerisi ise mangan metaloenzimidir ve çoğunluğu mitokondride bulunur. Enzime etkinliğini kazandıran metal iyonlarıdır. SOD' un bölgesel dağılımlı olması fizyolojik koşullarda O_2 'ye karşı yeterli koruma sağlar. SOD'un etkinliğinin artması H_2O_2 üretimini arttırır. OH- radikalleri ile hasarı sınırlamak için GP-x ve CAT ile birlikte çalışmalıdır.

CAT, SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Glutatyon peroksidazın H_2O_2 'e karşı K_m 'i katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i GP-x parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise CAT aktivite kazanır.

Glutatyon peroksidaz enzimi substrat olarak redükte glutatyon (GSH) kullanır. Tepkimeye giren glutatyonlar okside olur ve bisülfid bağı ile birbirine bağlanarak indirgeyici gücünü yitirir. Tepkime devamı için okside glutatyonlar (GSSG) ve indirgenmiş nikotinamid dinüklotid fosfat (NADPH)'ın kullanılması ve glutatyon redüktaz aracılığı ile katalizör bir tepki ile tekrar glutatyonla çevrilmesi gereklidir. Bu tepkimede ko-faktör olarak kullanılan NADPH'nin tekrar sentezi için ise hegzosmonofosfat şantına ve bu şantta anahtar olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz

(G6PD) enzimine gerek vardır. Dolayısı ile glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz da antioksidan savunma sistemi arasında değerlendirilmelidir (104, 107).

4.6.3. Serbest Radikaller ve Testis Hasarı

Serbest radikaller testis gibi steroidojenik dokularda normal fizyolojik bir süreçtir (108). Buna ek olarak bazı hücreler ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşturmak için oksidaza sahiptirler. Spermatozoa süperoksit iyon radikali yaratan NADPH oksidaz içermektedir (109). Yapılan birçok çalışmada düşük miktardaki ROS, sperm kapasitasyonunu, spermin oositi dölleyebilme yeteneği kazanması, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonu için gereklidir. Ancak ROS'un aşırı üretimi, spermatozoa ve seminal plazmanın antioksidan kapasitesinin bozulması ile sonuçlanan oksidatif stres olarak adlandırılan bir duruma yol açmaktadır (110, 111).

Germ hücreleri DNA'nın gelecek yeni jenerasyona aktarılmasından sorumlu özel hücrelerdir. Türlerin devamlılığını sağlamak için gereklidir. Yapılan birçok çalışmada spermatozoaların ROS'a dayalı hasarda çok hassas olduğu bulunmuştur. Bunun sebebi de plazma membranlarının fazla miktarda poliansature yağ asitleri (PUFA) ve sitoplazmalarının düşük oranda süpürücü enzimleri içermesinden dolayıdır (110, 112).

Spermatozoada oksidatif stres sperm motilitesi ve canlılığa zarar verdiği için erkek infertilitesi ile yakın ilişkilidir (111). Spermatozoanın, mitokondriyal membranlardan zengin olan orta parçası ROS'un primer hedefidir. Aksonemal hasara neden olan hücre içi ATP'deki hızlı kayıp ile sperm motilitesinde azalma ROS'un majör etki şekli olarak göz önüne alınmaktadır (10). Spermatogenik olaylardaki değişiklikler, ejakülatta olgunlaşmamış anormal spermilerin atılmasına neden olmaktadır. Olgunlaşmamış sperm ise, aşırı ROS üretimine ve dolayısıyla DNA hasarına yol açmaktadır (113).

4.7. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci

başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz diğer bir deyişle programlı hücre ölümüyle gerçekleşir (114, 115). Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- I) Apoptozun başlatılması,
- II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- IV) Fagositoz, olarak özetlenebilir (116).

Apoptotik hücrede gözlenen değişiklikleri ele aldığımız zaman hücrenin küçülmeye ve kondanse olmaya başladığını, hücre iskeletinin dağıldığı ve çekirdek zarının yer yer eridiği gözlenir. Ayrıca çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (116, 118). Apoptozisin en belirgin özelliği hücre içi Ca (kalsiyum) ve Mg (magnezyum) bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerin DNA'sı agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer (ladder formasyonu) bir yapı biçiminde görülür. Bu, apoptoz için tipik bir görünüm sağlar (115).

Apoptoza uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kopması sonucu sitoplazmada çekilme ve küçülme gözlenir. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle at nalı biçiminde görülür. Hücre büzülmeye ve küçülmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membran ile çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller, bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir. Çekirdek de hücre gibi büzülür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nüklear porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (115, 116). Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında değişimler olur. En belirgin değişim normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Ayrıca normalde hücre zarında gizlenmiş olan N-asetil glikozamin ve N, N-diasetilşitabroz molekülleri apoptozda açığa çıkarlar ve

makrofajlar tarafından tanınırlar. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişimlerinden biri de hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziküller apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür (115).

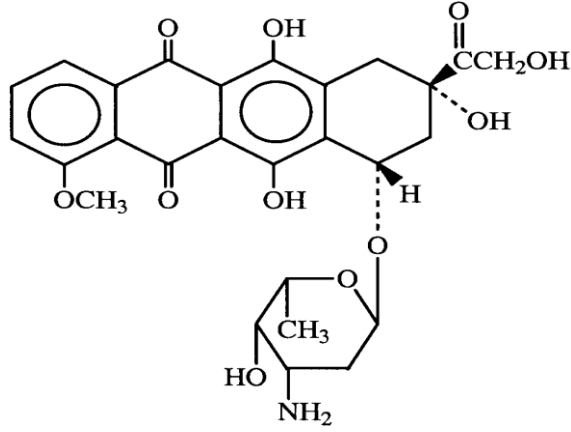
Apoptozis tanı yöntemleri içerisinde apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz-kontrastmikroskopu ile inceleme yer alır. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz Jel elektroforezi, enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi ISEL, TUNEL, İn situ hibridizasyon tekniği ve Anneksin-V yöntemi ile apoptozise özgü proteinlerin saptanması ve flow sitometri yöntemi kullanılır (119).

4.8. Doksorubisin

Doksorubisin, yaklaşık 30 yıldan beri kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu antrasiklin grubuna dahil bir antibiyotiktir. Esas olarak mantar türü *Streptomyces peucetius*'un caesius türünden izole edilmiştir (120, 121). Doksorubisin antrasiklin grubu içinde solid tümör tedavi protokollerinde en fazla yer alan ilaçtır (122) ve en sık akut lösemi, lenfoma, meme kanseri, akciğer, tiroid karsinomu gibi solid tümörlerde (123).

4.8.1. Doksorubisinin Biyokimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

Antrasiklin molekülü, ilaca kırmızı rengini veren tetrasiklik çekirdek ile ona glikosidik bir bağ ile bağlı bir amino şekerden (daunosamin) meydana gelmektedir (Şekil 2). Antrasiklin grubunun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları içermektedir. Bunlar elektron alma ve verme işlevinde görevlidirler. Daunorubicin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile DOX meydana gelir (124).



Şekil 2. Doksorubisinin Kimyasal Yapısı, (120).

DOX hücrede 4 şekilde etki gösterir (125):

a. Kompleks oluşturarak deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanma: DNA'nın içine girip, DNA topoizomerez II-DNA-antrasiklin kompleksini oluşturur. DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyon ve sentezini inhibe eder. DNA zincir kırıklarına da neden olur.

b. DNA ve RNA polimerazların inhibisyonu: DNA ve RNA polimerazların fonksiyonlarını engelleyerek DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu bozar. Döneme özgü olmayan bir ilaçtır ancak en güçlü sitotoksik etkisini hücrenin S dönemi üzerine gösterir.

c. Hücre membranı üzerine etkileri: Hücre membranına bağlanarak, membran fonksiyonunu bozar.

d. Serbest radikal oluşturma: Mikrozomlardaki sitokrom P-450 redüktaz enzimi antrasiklinlerin semikinon serbest radikallerine indirgenmesini sağlayan reaksiyonu katalize eder. Moleküler O₂'yi azaltır, DNA'nın tek sıra olmasına neden olan süperoksit iyonu ve hidrojen peroksit üretimini arttırır. Sonuç olarak maruz kalan hücre DNA'sında kimyasal ve oksidatif hasar meydana gelir (126, 127).

4.8.2. Doksorubisinin Metabolizması ve Farmakokinetikleri

Mide asidinde stabil olmadığından gastrointestinal sistemden absorbe edilmez, sadece parenteral uygulanır. Ciddi doku hasarı yaptığından intramusküler ya da subkutan uygulanmaz, sadece intravenöz kullanılır. Kan beyin bariyerini geçmez (6,

128). Plazma proteinlerine %70 oranında bağlanır, yarı ömrü 3-30 saat arasındır. Esas olarak karaciğerden safra yoluyla elimine edilmesine rağmen az bir miktarı da böbreklerden (%3-10) ve dışkıyla (%40-50) atılır. Dışkıyla atılan kısım değişmemiş ilaç şeklindedir. Böbreklerden itrahi ise ilaç uygulandıktan 1-2 gün sonra idrarın geçici bir süre için kırmızıya boyanmasına neden olur ancak bunun klinik önemi yoktur (6).

DOX'un uygulama dozları, farklı kanser hastalıklarında değişiklik gösterir. DOX, klinik olarak genellikle 3-4 haftada aralıklarla 40-75 mg/m²'lik bir dozda devamlı infüzyonla verilir. Hastalara verilen ilacın toplam dozu DOX'un yan etkileri ile uygunluk gösterir. Bu yüzden toplam doz, vücut yüzey alanının 550 mg/m²'sini aştığında DOX kemoterapi tedavisinden çıkartılır (129).

4.8.3. Doksorubisinin Yan Etkileri

Her ne kadar DOX'un kullanımı akut ve kronik yan etkilerinin bulunması ile tartışma yaratsa da kanser hastalarının tedavisinde oldukça önemlidir. İlacın intravenöz verilmesini takiben birkaç dakika ve hafta içinde gerçekleşen akut yan etkileri, bulantı, kusma, miyelosupresyon, ritim bozukluğu (130), hematopoietik supresyon, alopesikemik iliği supresyonu, mukozal ülser ve kilo kaybıdır (6). Bu etkiler geri dönüşümlüdür ve klinik olarak tedavi edilebilir (130).

Bu yan etkilerin yanı sıra ratlarda DOX'un tedavi dozundaki etkilerini araştırdığı bir çalışmada kalp kasında interstisyel ödem, fibröz ve miyokart dejenerasyonları gibi geriye dönüşümsüz histolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. DOX'un kardiyotoksik etkilerinin yanında serbest reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, direkt DNA hasarı ve/veya indirekt DNA tamirinin engellenmesi, kalpte immün reaksiyonların başlaması, böbrek ve barsaklarda apoptosiz, gastrointestinal epitelde hasar, pulmoner, hematolojik ve testiküler toksisite gibi etkilere sahip olduğu da bildirilmiştir (131, 132, 133).

4.8.4. Doksorubisin ve Testis Hasarı

Erkek fertilitesi üzerine kemoterapötik ilaçların etkisi giderek daha önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Farelerde testis hücre ölümü üzerine birkaç kemoterapötik ilaç ile onkolitik ajanların üreme üzerindeki zararlı etkilerini

değerlendirmek için yapılan çalışmalarda Adriamycin' in (DOX) diğer ilaçlara göre kök hücre ölümünde en yüksek derecede etkili olduğu görülmüştür (134).

Yüksek antitümör etkinliğine rağmen DOX testis toksisitesi de dahil olmak üzere çeşitli organ toksisitesine sebep olduğu için klinikte kullanımı sınırlanmaktadır. Bir dizi toksisite mekanizmaları olsa da majör patojenik toksisite sebebi olarak serbest radikal ürünleri gösterilmektedir. Bu da farelerde DOX'a dayalı kemik iliği hücrelerinde ve spermatogonial hücrelerde kalıcı kromozom anomalisine sebep olduğu düşünülmüştür. Ayrıca DOX ile erkek farelerde mayotik mikronükleuslar sıklığı artmıştır (135).

DOX'a kronik maruziyet üreme organının ağırlığında azalmaya sebep olmakta ve bu azalmanın DOX uygulanmasından sonra sıçanların seminifer tübülünde ciddi parankimal atrofiye yol açtığı düşünülmektedir (136). DOX için en hassas hücreler erken spermatogenik hücrelerdir. Primer spermatosit ve spermatogoniada apoptozise neden olarak spermatogenezi bozmakta ve sonuç olarak infertiliteye sebep olmaktadır (137).

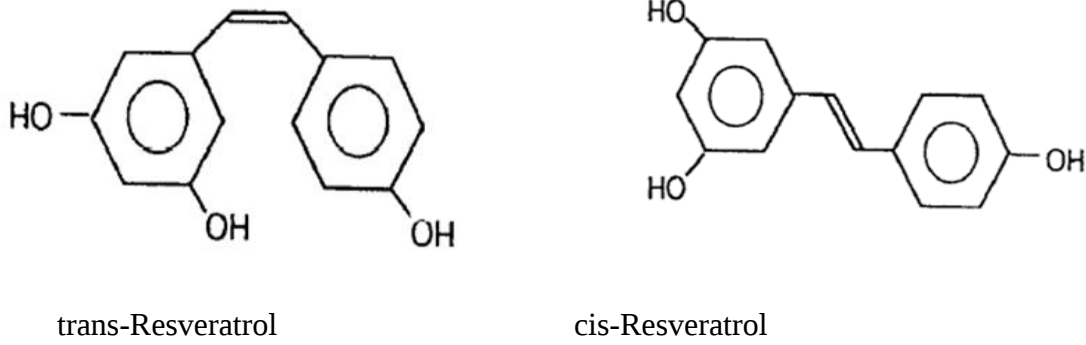
Yapılan diğer çalışmalarda DOX ile tedaviye maruz kalan erkek sıçanların Cauda Epididimis'teki sperm sayısında azalma görülmüştür. Sperm hareket analiziyle; sperm hareket yüzdesinde, ilerleyiş yüzdesi ve hızında anlamlı bir azalma kaydedilmiştir. Bu azalma implantasyonu ve embriyo yaşamını kısıtlamış, preimplantasyon kaybını yükseltmiştir (138). DOX'un testis ve epidimiste 4 ile 9 haftalık etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada epididimiste 4 hafta DOX tedavisi sonucu oligospermi, 9 haftada ise azospermi geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca 9 haftalık tedavi grubunda kopulasyonun olduğu fakat gebeliğin gerçekleşmediği de diğer bulgular arasındadır (137).

4.9. Resveratrol

Fitoaleksinler çoğu bitkide bulunan, düşük moleküler ağırlıklı ve doğal bir bileşik olan stilben ailesine ait moleküllerin sınırlı bir grubunu meydana getirirler. Ayrıca biyotik ve abiyotik strese karşı kendilerini savunmak için bitkiler tarafından üretilen antibakteriyel ve antifungal özellikleri olan sekonder bitki metabolitleri olarak bilinirler (139, 140). RES (trans-3,4',5-trihidroksi-stilben), üzüm, yer fıstığı, dut, ahududu, yaban mersini, kızcılık gibi çeşitli bitkilerde bulunan doğal bir fitoaleksindir (141, 142, 143).

Bu bitki türlerinin büyüme ve gelişme aşamalarının herhangi bir döneminde, stres olarak tanımlanan soğuk hava koşulları, ultraviyole (UV) ışımaya, yaralanma, bakteri ve mantar enfeksiyonları gibi bazı dış etkiler ile karşılaştıklarında, dayanıklılık mekanizmasını geliştirmek amacıyla kendilerini korumak amacıyla sentezlenmektedir. Diğer bir ifadeyle RES stilben sentaz enzimi yardımı ile bitkilerden elde edilen stilben türevi olan stilbenoidtir. RES, kimyasal olarak flavonoid yapıda, polifenolik, steroid olmayan bir bileşiktir (142, 144).

Resveratrolün cis ve trans izomerleri mevcuttur (Şekil 3). UV-spektral özelliklerine göre ayrılmışlardır. Üzüm ekstrelerinde trans formu bulunmaktadır. Trans-resveratrol ışıktan korunduğu sürece stabil formudur. RES'in fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir (145).



Şekil 3. Trans ve Cis Resveratrolün Kimyasal Yapısı, (145).

Tablo 1. Resveratrolün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Özellik	Bilgi
Fiziksel durumu	Katı, toz
Renk	Hafif grimsi beyaz
Kaynama noktası (°C)	253-255
pKa (Çoğu asidik H-donor)	9.14 ± 0.20
Dimetilsülfoksit'te çözünürlük (mg/mL)	16
Suda çözünürlük (mg/mL)	0.03
Kimyasal formülü	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Açık formülü	trans-3,4',5-trihidroksi-stilben
Moleküler ağırlığı	228.25

4.9.1. Resveratrolün Biyosentezi ve Metabolizması

RES fenil alaninden başlayarak çok basamaklı bir reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. İlk basamakta fenil alanin ammonia liyaz enziminin deaminasyon işlemi ile sinnamik asite dönüşür. Sinnamik asit 4-hidroksilaz, p-hidroksilasyon reaksiyonları ile 4- Koumarik aside dönüşür ve 4-Koumaratla Ko-A ester yapısına dönüşür. 4-Koumaril Ko-A, 3 malonil Ko-A ünitesi ve stilben sentaz enzimi ile RES oluşur (145, 146).

RES'in emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (147). RES'in suda çözünürlüğü oldukça düşüktür. Bu yüzden serumda yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmesi için ya konjuge olmalı ya da proteinlere bağlanmalıdır (148). Albumin plazmada RES'i taşıyan moleküllerden biridir (149). Plazmada RES'in lipoproteinlerle de etkileştiği gösterilmiştir. Hepatoblastoma hücreleri üzerinde resveratrolün kinetik karakteriyle ilgili yapılan çalışmaya göre; RES hücre içine asıl olarak taşıyıcı aracılı geçiş ve pasif difüzyonla alınmaktadır. RES albumine bağlanıp kompleks oluşturduktan sonra, albumin membran reseptörlerince bu kompleksin tutulduğu ve daha sonra da bu reseptörler tarafından serbest RES'in hücre membranına doğru salıverildiği düşünülmektedir. Ancak bu aşamadan sonra geçişle ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (150).

4.9.2. Resveratrolün Etkileri

RES'in etkileri birçok dokuda araştırıldığında; antioksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser, trombosit agregasyonu inhibe edici, damar gevşetici etkisi (vazodilatör), yaşamı uzatıcı, kalbi koruyucu etkis, anti-viral, anti-mikrobiyal, anti-aterojenik, immün sistem düzenleyicisigibi etkileri olmasına rağmen mekanizmaları tam aydınlatılamamıştır (145, 151-155).

4.9.2.1. Antioksidan Aktivite

RES, güçlü bir antioksidan özelliği olan doğal bir fitoaleksindir. Antioksidan aktivitesi, ribonükleotide redüktaz inhibisyon yeteneğine ve DNA polimeraz

aktivitesindeki siklooksijenaz transkripsiyon yeteneğine bağlanmaktadır (145). Yapılan çalışmalarda en çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden daha etkili olduğu görülmüştür (150).

Serbest radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir (156). RES, OH. ve O₂-radikallerini süpürüp OH. radikalinin neden olduğu lipid peroksidasyonu inhibe etmekte ve OH. ile H₂O₂'in neden olduğu DNA hasarını önlemektedir. Ayrıca protein oksidasyonunu engellemekte serum antioksidan kapasitesini arttırmaktadır. Krom maruziyetiyle oluşan NF-kB (Nuclear Factor kappa B)aktivasyonunu da engellediği görülmüştür (157, 158). RES'in LDL oksidasyonunu önleyici etkisinin, esas olarak bakırla şelasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikal süpürücü etkiden kaynaklandığı anlaşılmıştır (148)

RES içeren üzüm çekirdeği ekstralarının glial hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir (159). Ayrıca nöronal oksidatif stres ve nitrozatif stres ile beyinde nöroblastoma hücrelerindeki mitokondriyal hasara karşı koruyucudur ve oksidatif stresi süpürücü etkiye sahiptir (160). Diyabetik ratlar üzerine yapılan bir çalışmada düzenli olarak günlük alınan RES'in lipid peroksidasyonu azalttığı, sıçan hipokampus ve frontal kortekste antioksidan özellik gösterdiği görülmüştür (161).

Hücrenin yaşam süresi ve canlılığını artıran Sirtuin 1 adlı geni aktive ettiği için yaşam süresini artırdığı ve nörolojik hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinson'da koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (162).

4.9.2.2. Vazodilatör Etki

Nitrik oksit, çeşitli uyaranlarla damarda veya nitrejik nöronlarda Nitrik oksit sentaz aracılığıyla L-arjininden sentezlendiğinde hedef hücrelerde çözünür ve siklik GMP'yi aktive ederek düz kas gevşemesine neden olur. Noradrenalinle kastırılan izole sıçan aortası endotelinde, RES'in doza bağımlı bir şekilde gevşemeye neden olduğu ve ayrıca $>6 \times 10^{-5}$ M gibi yüksek konsantrasyonlarda, endotel tabakası soyulmuş aorta halkasında da gevşemeye neden olduğu ile bu etkinin NO inhibitörleriyle dahi engellenemediği bildirilmiştir. Kısaca RES, NO aracılı olan ve olmayan mekanizmayla kasılmayı engellemektedir (163, 164).

4.9.2.3. Anti-İnflamatuar Etki

RES'in antiinflamatuvar etkisini; proteazlar, kompleman sistemi, bradikininler, NO, sitokinler, adezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi inflamasyondan sorumlu maddelerin oluşumunu önleyerek oluştuğu düşünülmektedir (165, 166). Trans-resveratrolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin, immün sistem hücrelerinde inflamatuvar sitokinleri düzenleyerek ortaya koyduğu bilinmektedir (166). İn vitro bir çalışmada trans-resveratrolün naturel killer hücrelerinin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T lenfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü görülmüştür (167). Bir başka çalışmada RES'in hücrel toksisiteyi azalttığı, lenfosit proliferasyonunu baskıladığı, lenfosit kaynaklı interlökinlerin ve tümör nekroz faktörün (TNF- α) üretimini azalttığını görülmüştür (168).

4.9.2.4. Trombosit Agregasyon İnhibisyonu

RES'in araşidonik asitten Thromboxane A₂(TxA₂) oluşumunu önlediği mikromolar konsantrasyonlarda *trans*-resveratrolün arakidonik asitin ve kollajenin oluşturduğu trombosit agregasyonunu % 50'ye varan oranlarda azalttığı saptanmıştır (145, 165).

4.9.2.5. Anti-Tümoral Etki

Birçok dokuda antikanserojen etkisi gösterdiği savunulan RES'in, etki mekanizmaları hala gün ışığına çıkarılmayı beklemektedir. RES'in tümör gelişimindeki çeşitli hücrel olayları inhibe ederek kanserden koruyucu etki oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. RES'in antitümör etkisi tam olarak anlaşılmamasına rağmen anti-östrojenik etkisi, p53, fas-fas ligand sistem ve mitojen aktif edilmiş protein kinaz (MAPK) ekspresyonunu aktive etmesi; p4501A1, ribonükleotid redüktaz, ornitin dekarboksilaz, protein kinaz C, DNA polimeraz inhibisyonu ve apoptozisi indüklemesi nedeniyle antitümör etkisi gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca prostoglandin sentezinin inhibisyonu ile de tümör gelişiminin yavaşladığı rapor edilmiştir (169, 170, 171, 172, 173, 174). RES; göğüs, akciğer, prostat, kolorektal kanser, mide kanseri, özafagus

tümörleri, pankreas kanseri, lösemi gibi çeşitli kanser türleri üzerine antiproliferatif olarak rol oynamaktadır (175).

4.9.2.6. İskemi-Reperfüzyon Hasarından Koruyucu Etkisi

Çeşitli organlardaki iskemi/reperfüzyon çalışmalarında RES'in dokularda trombosit agregasyonunu önlediği ve iskeminin zararlı etkilerine karşı koruduğu görülmüştür (176, 177). Geçici iskemi oluşturulan sıçan kalbinde iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonucu gelişen kardiyak hasarlanma ve aritmilerin RES ile ($2.3 \times 10^{-5}M$) azaltılabildiği; bu etkinin ise endotelial NO oluşumu ve antioksidan aktivite sonucu oluştuğu düşünülmüştür. Aynı çalışmada plazma NO düzeylerinin doz bağımlı olarak arttığını ve hücre zedelenmesinin bir göstergesi olan laktat dehidrogenaz aktivitesinin ise doz bağımlı olarak azaldığı bulunmuştur (178).

4.9.3. Resveratrolün Testis Üzerine Etkileri

Normal dokuda RES etkisinin araştırıldığı bir çalışmada testislerin makroskopik görünüm ve ağırlık açısından farklılık göstermediği, ancak RES verilen grupta spermatozoa sayısının daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada anomormal spermatozoa oranının daha düşük, serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu değişikliklerin nedeninin hipotalamus-hipofiz-gonad aksının RES tarafından uyarılması olduğu bildirilmektedir (154).

RES'in germ hücreleri ve spermatozoalar üzerinde doz değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada RES'in lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği ve semenin kriyopreservasyonu ya da IVF-ICSI gibi mekanik teknikler için spermleri ROS saldırılarına daha iyi koruyabilen yeni sperm kültür mediumlarına RES'in eklenebileceğini göstermiştir (12).

Çevresel toksinlerin spermatogenez sürecinde yıkıma sebep olduğu bilinmektedir. Endüstriyel bir toksin olan 2,5-hexanedione (2,5-HD) testis hasarının araştırıldığı bir çalışmada RES'in 2,5-HD ile oluşan dozispermiyi iyileştirebileceği ve spesifik hücre membran proteini olan c-kit düzenleyicisi olabileceği düşünülmüştür (14). Testiste

torsiyonla gerçekleştirilen iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası RES verilen sıçanlarda germ hücre apoptozisinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (178).

4.9.4. Toksisite

řu ana kadar insanlarda, RES alımıyla ilgili ve RES-ilacı etkileşmeleri ile ilgili herhangi bir ters etki bildirilmemiştir. Günlük 5-10 mg dozunun tamamen güvenli olduğu bildirilmektedir. Sıçanlara günlük 300, 1000 ve 3000 mg/kg dozda 28 gün oral yolla verildiğinde nefrotoksisite, dehidratasyon, solunum güçlüğu, duruş bozukluğu (kamburlaşma), aktivite kaybı, diyare, burunda kırmızı renkte lezyonlar; erkek sıçanlarda lökositoz ve her iki cinste anemi oluştuğu tespit edilmiştir. 300 mg/kg dozda, herhangi bir ters etki görülmemiştir (178).

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Deneysel Çalışma Aşaması

5.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18.10.2011 tarihli ve 2 sayılı karar ile onaylanmıştır. Çalışma süresince kullanılan deney hayvanları, kimyasal malzemeler, araç ve gereçler KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2010.114.001.12 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada, 5 haftalık 140-170 gr ağırlığında Spraque Dawley cinsi 34 adet erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenme ve barınması için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan sıçan takip odaları kullanıldı. Deney için kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildiği için çevre stresi ve uyum problemi yaşanmadı.

5.1.2. Laboratuvar Koşulları

Deney süresince laboratuvarın sıcaklığı ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama 50 ± 5 olarak ayarlandı. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılma sağlandı. Sıçanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi. Tüm denekler standart yem ile sınırsız beslendi. Çalışma süresince sıçanların barındırılmasında standart Tıp III kafesleri kullanıldı (Şekil 4).

5.1.3. Deneyisel Çalışma Planı

Sıçanlar 5 grup olmak üzere yaş ve ağırlıklarına göre rastgele şekilde gruplara ayrıldı ve deney prosedürü aşağıdaki gibi belirlendi (Tablo 2):

Kontrol Grubuna (n:6), tek doz izotonik solüsyon i.p (intraperitoneal) olarak uygulandı.

DOX Grubuna (n:8) tek doz 10 mg/kg DOX (Adriblastina 10 mg, DEVA) i.p olarak uygulandı.

DOX + RES Grubuna (n:8), tek doz DOX 10mg/kg uygulaması ile birlikte % 30'luk DMSO içinde çözölen RES [(20 mg/kg/gün), (R5010-500 mg, SİGMA)] 21 gün boyunca i.p enjeksiyon ile verildi.

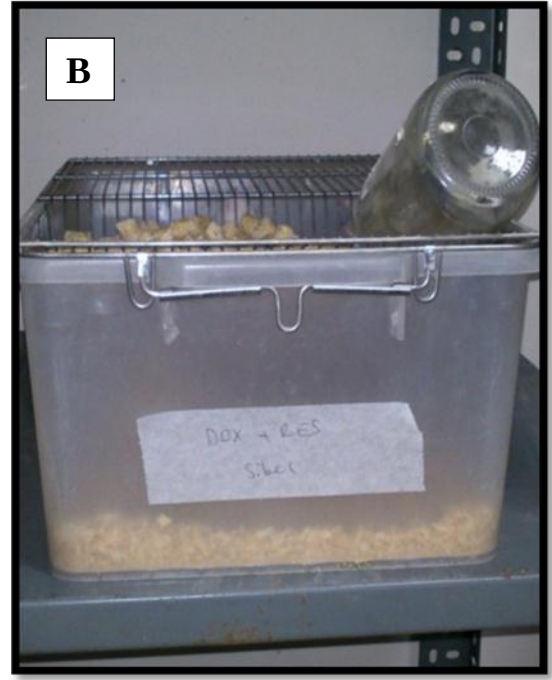
RES Grubuna (n:6), deney süresi boyunca (21 gün) RES 20 mg/kg/gün i.p. olarak uygulandı.

DMSO Grubuna (n:6), RES'in çözöcüsü DMSO 21 gün boyunca (i.p) uygulandı.

Çalışmanın deney aşaması, kan ve dokuların elde edilmesi işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Faköltesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde özel olarak hazırlanmış hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Uygulamalar sabah saatlerinde (saat 09.00–10.00 arasında) yapıldı (Şekil 4) ve deney süresi 21 gün olarak belirlendi. Deney süresinin bitiminde sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Tablo 2. Denek Grupları

Gruplar	Uygulama (i.p.)	Denek Sayısı
KONTROL	SF (tek doz)	(i.p) 6
DOX	10 mg/kg tek doz DOX	(i.p) 8
DOX+RES	10 mg/kg tek doz DOX + 21 gün RES (20mg/kg)	(i.p) 8
RES	RES 21 gün (20mg/kg)	(i.p) 6
DMSO	DMSO 21 gün	(i.p) 6



Şekil 4. Deney Hayvanlarının Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler (A, B), Denek Gruplarına i.p. Enjeksiyon Uygulaması (C).

5.1.4. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması

Tüm hayvanlar 21 günlük deney süresi sonunda ve derin anestezi (Ketalar 50 mg/kg) altındayken dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Ardından hemen biyokimyasal parametreler için EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)'lı tüpe kan örnekleri toplandı ve derhal hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı (Şekil 5). Sağ testise ait epididimis tris tampon solüsyonu içeren bir petri kaba alındı, sol testise ait epididimis ise histolojik değerlendirmeler için % 10'luk formalin içinde fiksasyonu sağlandı. Çevre dokularından iyice temizlenen sağ testisler hassas terazide titizlikle tartıldı, ayrı ayrı kayıt altına alındıktan sonra vertikal olarak ikiye bölündü. Testislerin yarısı histolojik incelemeler için Bouin tespiline alındı. Diğer yarısı ise biyokimyasal analizler için 4 eşit parçaya ayrılarak eppendorf tüplerine konuldu ve – 80 derecede muhafaza edildi. Biyokimyasal analizler için alınan tüm doku ve kan numuneleri için KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki soğutucular kullanıldı.

5.1.5. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak bouin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

- Doymuş Pikrik Asit çözeltisi 75 ml
- Formaldehit (%37) 75 ml
- Glasiyal Asetik Asit 5 ml

Bouin tespitini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi formaldehit ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı (179).



Şekil 5. Testis ve Epididimislerin Çıkartılması (A,B). Testislerin Epididimislerden Ayrılması (C), Testisin Makroskopik Görünümü (D).

5.1.6. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takip, kesit alma ve boyanma işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bouin solüsyonuna alınan testisler 3 gün ışık almayan kuru ortamda oda sıcaklığında saklandıktan sonra aşağıdaki aşamalardan sırasıyla geçirilerek parafin blok haline getirildi.

1. % 70'lik alkol 1 gün
2. % 90'lık alkol 1 gün

3. % 96'lık alkol 1 gün
4. % 100'lük alkol 1 gün
5. % 100'lük alkol 1 saat (1 kez)
6. Ksilen..... 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde 3 kez 15 dakika bekletildi ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Dokular bloklandı.

5.1.7. Kesitlerin Alınması

Kesitler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki tam otomatik mikrotom (LEICA RM 2255) yardımıyla dokunun başlangıcına kadar 20µm'lik kesitlerle trimlendi, dokuya ulaşıncaya 5 µm'lik ince kesitler alındı. Alınan kesitler 45°C'de benmari içindeki sıcak su üzerinde kırışıkların açılması beklenildi ve lam üzerine alındı.

5.1.8. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Kesit alma işlemi tamamlandıktan sonra lam üzerine alınan dokular Hematoksilen&Eozin boyaması için zembile yerleştirildi. Parafinin erimesi için 1 saat 58°C etüvde bekletildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

1. Ksilen5 dakika
2. Ksilen5 dakika
3. %100'lük alkol5 dakika
4. %96'lık alkol5 dakika
5. %70'lik alkol5 dakika
6. Distile su.....2-3 dakika
7. Hematoksilen.....35 saniye*
8. Musluk suyu5 dakika
9. Asit alkol1 kez batırılıp çıkartılır
10. Distile su.....1 dakika
11. Amonyaklı su10 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. Ksilen5 dakika
19. Ksilen5 dakika
20. Entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü tübül sayısı Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (IM) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan Olympus BX51 (Japan) fotomikroskoplu IM'de incelendi ve resimler dijital ortama aktarıldı.

Testis seminifer tübülünde hasar değerlendirmesi için Johnsen skorum sistemi kullanıldı (180, 181).

Johnsen skorum sistemi (180);

- 10: Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var
- 9: Germinal epitelyum disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var
- 8: Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10'dan az spermatozoa var
- 7: Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var
- 6: Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az
- 5: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var
- 4: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5'den az
- 3: Germ hücre olarak sadece spermatogonia var
- 2: Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
- 1: Seminifer tubul içinde hiç hücre yok

5.1.9. Epididimiste Total Sperm Sayısı, Motilite, Canlılık ve Morfoloji Değerlendirmesi

Sperm sayımı için günümüzde en fazla kullanılan aletlerden biri “Makler Sperm Sayım Kamarası”dır (Şekil 6). 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm sayımı için özel olarak tasarlanmıştır. Semen örneğinin incelendiği kamaranın 10 µm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır. Makler kamarası ile spermilerin hareketlilik yüzdeleri daha kesin olarak saptanabilmektedir (182, 183).

Bu çalışmada epididimisten elde edilen sperm değerlendirmesi şu şekilde gerçekleştirildi: Tris tampon solüsyonu (pH: 7,5) içeren petrideki epididimis parçalara ayrılıp 37 C°’de 10-30 dk bekletilip spermilerin sıvı içerisinde yüzmesi sağlandı. Akabinde sperm sayımı, motilite, canlılık ve morfoloji değerlendirildi. Bunun için Makler Sperm sayım kamarası kullanıldı. Bir damla semen (5 µl) kamaranın merkezine damlatılıp üzerine kapak camı kapatıldı. Dört adet kuvartz bacak sayesinde spermiler, 10 µm derinlikte yüzmeleri sağlandı. Bu derinlikte ancak bir adet sperm başı sığabildiği için bir hat üzerinde yapılacak sayım 20X büyütme altında 10 karede motil ve non-motil sperm sayıldı ve 106 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 106/\text{ml}$) sperm sayısı belirlendi. Motil sperm sayısının Toplam sperm sayısına oranı bulunarak motilite % olarak hesaplandı. Normal sperm konsantrasyonu ($>20 \times 106/\text{ml}$) dikkate alınarak değerlendirildi (182). Canlılık değerlendirmesi için lam üzerine semen örneğinden bir damla damlatıldı ve üzerine 1 damla % 1’lik eozin-y eklenerek karıştırıldı ve lamel ile kapatıldı. Her bir örnekte farklı alanlarda totalde 100 sperm canlılık açısından değerlendirildi (Şekil 7). Morfoloji değerlendirmesi için semen örneği 3 dakika 1000 rpm’de (Dakidaki devir sayısı) santrifüj edildi. Süpernatanttan alınan 0,5 ml örnek lam üzerine yayılarak kurutuldu. Hazırlanan smear örneği 3 dk metanol ile fikse edildi ve %1’lik eosin-y ile boyandı. Her bir hayvanda 200 sperm immersiyon yağı altında X100’lük büyütmede sayıldı ve anormal sperm %’si belirlendi (184).



Şekil 6. Makler Sayım Kamarası



Şekil 7. Makler Sayım Kamarasında Sperm Analizi

5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler

Testisteki apoptozisi değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidy transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nukleuslu TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Her testiste 20 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı bakılıp Apoptotik yüzde ($AI = \frac{\text{TUNEL (+) hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$) hesaplandı (185).

5.2.1. TUNEL Boyama

TUNEL tekniği için In situ cell death detection kit, POD kiti kullanıldı [(11 684 817 910 ROCHE (Mannheim, Germany)]. Lam üzerine alınan 5 µ'luk kesitler 1 saat 60°C'lik etüvde bekletildikten aşığıdaki işlemlerden geçirildi.

1. Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
2. %100 etanol 2x5 dk
3. %95 etanol 2x5 dk
4. %70 etanol 2x5dk
5. Distile su ile yıkanır.
6. Oda ısısında 20 µg/ml Proteinase K 15 dk
7. PBS (phosphate buffer solution)'de yıkanır.
8. %3 H₂O₂'de 15 dk
9. Distile su ile yıkanır.
10. PBS'de 2x5 dk
11. Oda ısısında Large Volume UV (Ultraviyole ışın) block 10 dk
12. 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplanır, 37 °C'lik etüvde 1,5 saat nemli ortamda tutulur.
13. PBS'de yıkanır.
14. 100 µ converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplanır ve 37 °C'lik etüvde inkübe edilir.
15. PBS'de 3x5 yıkanır.
16. 100 µl DAP ile 5 dk karanlıkta oda ısısında beklenir.
17. Distile suda 1x2 kez yıkanır.
18. H&E ile 15 sn boyanır ve çeşme suyu ile yıkanır.
19. %70 etanol 2x5dk
20. %95 etanol 2x5 dk
21. %100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk
23. Kurutulup kapatılır.

5.3. Biyokimyasal İncelemeler ve Kullanılan Yöntemler

5.3.1. Bradford Metodu

Kullanılan Çözeltiler:

1- %20'lik HCl (hidroklorik asit) çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 27.03 ml %37'lik HCl'den alındı son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Kullanılan cam malzemelerdeki olabilecek protein kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.

2- Bradford Reaktifi: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 12.5 ml %95'lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 25 ml %85'lik H₃PO₄ (fosforik asit) eklendi. Son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

3- Standart çözeltiler: Standart çözeltiler Bovin Serum Albumin (BSA)'dan hazırlandı. 25 mg BSA bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Oluşan 2.5 mg/ml'lik çözeltiden 1; 0.8; 0.6; 0.4; 0.2; 0.1 mg/mL'lik çözeltiler hazırlandı.

- a. Bradford Reaktifi 100 mL
- b. Homojenat (10 kat seyreltili). 10 mL
- c. Plate karıştırıcıda 10 sn karıştırıldı.
- d. 600 nm'de spektrofotometrik okuma yapıldı.

5.3.2. Plazma MDA Tayini

Gerekli çözeltiler:

0,084N H₂SO₄ (sülfirik asit): 570mL H₂SO₄ (%98'lik) saf su ile 250mL'ye tamamlandı.

%10'luk fosfotungustik asit: 0,5g tartıp 4,5mL deiyonize suda çözüldü.

- TBA (tiyobarbitürik asit) : 0,67 g TBA tartılıp, 50 mL suda manyetik bar yardımıyla karıştırılarak üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi.

Deneyin Yapılışı:

1. 150 µl plazma üzerine 1,2 mL H₂SO₄ ve 150 µL fosfotungustik asit ilave edilip, hafif vortekslendi.

2. 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Çöken kısımlara 2 mL deiyonize su ilave edilip tekrar vortekslenip, çözüldü.
4. 0,5 mL TBA ilave edildi
5. 1 saat 101°C’de inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonucunda tüpler tekrar 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve 532 nm’de absorbans okundu (186).

5.3.3. Doku MDA Tayini

Gerekli çözeltiler:

Doku homojenizasyon tamponu:

- % 1,15 lik KCl (potasyum klorür) çözeltisine % 0,05’lik (bir litre için 500 µL olacak şekilde) Triton X.100 konarak hazırlandı.
- %1’lik H₃PO₄
- TBA:Plazma için hazırlananla aynı prosedürü kullanıldı.

MDA standartları:

MDA Standartları tetrametoksipropandan 0,01 M HCl asitle 50 °C’de 1 saat inkübe edilerek hidrolizle elde edildi. Stok MDA 10 nmol/ml (10 000nM)’dan 10nm/ml, 5 nm/ml, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 çözeltileri hazırlandı ve standartlar çift çalışıldı. Standartlara TBA’lı ve %1’lik H₃PO₄’lü ve sonrasındaki uygulamalar yapıldı.

Deneyin Yapılışı:

1. 50mg (0,05g) doku tartıldı ve işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.
2. Tüplerin üzerine önceden hazırlanan 2 mL doku homojenizasyon tamponu koyulur.
3. 0,05 g olarak tartılan dokular homojenizasyon için uygun tüplere konuldu.
4. Homojenizasyon buz üzerinde yapıldı.
5. 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj işlemi sonunda üstte kalan süpernatantlardan 500 µL alınıp, diğer tüplere koyuldu.
7. Bu tüplerin üzerine 3mL %1’lik H₃PO₄ ve 1mL TBA eklendi.
8. 100°C’de 45 dk inkübasyona bırakıldı.

9. Tüpler 4000 rpm’de 10dk santrifüjlendi.

Elisa pleytlerine 300 µL pipetlendi ve 532 nm’de absorbans okundu (186).

5.3.4. Dokuda SOD Tayini

SOD ölçümü Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre ölçüldü (187).

Homojenizasyon Aşaması:

Homojenizasyon tamponu: Tris-HCl 50 mM pH: 7,4 olan soğuk tampon hazırlandı (litrede 500 µl olacak şekilde triton x 100 olmalıdır). Bu tampon homojenizasyonda, SOD standartlarını hazırlamada kullanıldı. Homojenizasyondan sonra aynı gün içinde SOD çalışıldı.

50 mg doku, 2 ml soğuk tampon içinde homojenize edildi ve 3000 rpm’de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatanın bir kısmını protein tayini için ayrıldı ve diğer kısmı ile SOD ölçümü yapıldı.

1 ml Süpernatın ve 500 µl etanol-kloroform karışımı koyuldu (etanol: kloroform 2: 3 oranında). 10 000 g’de santrifüj edileceği için bu aşama ependorfta yapıldı, vortekslendi ve soğukta 30 dk santrifüjlendi. Süpernatın alınır homojenizasyon tamponu ile dilüe edildi.

SOD Ölçümünde Kullanılacak Çözeltiler

- 1) 0,3 mM ksantin
- 2) 0,6 Mm EDTA
- 3) 150 µM NBT (nitroblue tetrazolium)
- 4) 400 mM Na₂CO₃ (sodyum karbonat)
- 5) % 0,1 Bovin Serum Albümin
- 6) 2,3 M (yada 2 M önerilen) amonyum sülfat
- 7) 0,8 mM bakır klorür
- 8) 167 u/L ksantin oksidaz
- 9) Kör 0,125- 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8- 9 - 10 ünite /ml lik SOD standartlarıdır.

Not: Kör çok önemlidir mutlaka yapılmalıdır. Standartlara ve köre etanol/kloroform aşaması ve santrifüj aşaması uygulanmaz, SOD kimyasal karışımı ilave etme aşamasından başlanır.

Yukardaki çözeltilerin ilk 5 tanesi ile aşağıda verilen oranlarda bir karışım (SOD reaksiyon karışımı) elde edildi ve bu karışım kullanıldı.

- Ksantin çözeltisi: 40 ml
- EDTA çözeltisi: 20 ml
- NBT: 20 ml (ışıktan korunmalı ve karışıma en son pipetleme yapmadan hemen önce eklenmelidir.)
- Na_2CO_3 : 12 ml
- % 0,1 Bovin Serum Albümin: 6 ml

Cam tüpte çalışma adımları:

Süpernatant alındı ve homojenizasyon tamponu ile dilüe edildi. Dilüsyon oranı, birkaç numunenin rengi kör ile standart 10 arasında kalacak şekilde tesbit edildi. Dilüe süpernatant kullanıldı.

(Not: Kör çok önemlidir ve mutlaka yapılmalıdır).

- 1) 0,25 ml kör, standart, dilüe süpernatant cam tüpe alındı.
- 2) 994,9 ml SOD karışımı + 255,1 ml NBT ilave edildi (1,25 ml SOD kimyasal karışımı ilave edildi).
- 3) 0,025 ml (25 mikrolitre) 167 u/L karanlıkta ksantin oksidaz ilave edildi (Her ilave edilen numune arasında eşit süre olması ve reaksiyon durdurulurken tüm numuneler eşit inkübasyon süresi geçirmiş olmasına dikkat edildi).
- 4) 15-20 dk 25 °C’de karanlıkta inkübe edildi (su banyosunda) ve inkübasyon esnasında renk değişimini kontrol edildi. Ayrıca inhibisyonu durdurmadan önce standartın birkaç tanesi ile okuma yaparak inhibisyonun %30-65 aralığında olup olmadığı kontrol edildi.
- 5) 0,5 ml bakır klorür (0,8 mM) ilave edildi.

Bu pipetlemeyle küvette okumak için yaklaşık 2 ml’lik bir numune olarak değerlendirildi.

- 6) Küvette yada eliza pleytine numuneler aktararak 560 nm’de okundu.

Sonuçların Hesaplanması:

% inhibisyon aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{\text{kör abs} - \text{numune abs}}{\text{kör abs}} \times 100$$

Doğrusal grafik çizebilmek için standart konsantrasyonlarının logaritması alındı. Standartların % inhibisyon değerleri ile standartların logaritmik konsantrasyonları kullanılarak standart grafiği çizildi ve denklemi bulundu. Numunelerin absorbanlarının % inhibisyonları bulundu ve Standart denklemi kullanılarak numunenin % inhibisyonlarına karşılık gelen logaritmik konsantrasyonlar belirlendi. Logaritmik konsantrasyonların anti logları alınarak normal konsantrasyonlara dönüştürüldü.

5.3.5. Dokuda Katalaz Tayini

Dokuda CAT ölçümü SOD için hazırlanan doku homojenatında Aebi yöntemine göre ölçüldü (188).

Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat tamponu (pH=7,0; 50 mM): 6,81 g KH_2PO_4 (potasyum dihidrojen fosfat) deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (disodyum hidrojenfosfat dihidrat) deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0'ye ayarlandı.

2. Hidrojen Peroksit: 240 μL %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Deneyin Yapılışı:

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 3 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Aşağıdaki şekilde pipetlemeler yapıldı.

- Fosfat Tamponu	750 μL	-----
- Numune	1500 μL	1500 μL
- H_2O_2	-----	750 μL

H_2O_2 eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm'de 30 sn süreyle her 10 sn'de bir absorbanlar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün 0,015 ile 0,100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu

aralıkta düşüş olmazsa H₂O₂'nin konsantrasyonu yeniden ayarlanmalıdır. Katalaz aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 sn'lik aralık için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2,3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1}$$

A1= Başlangıç Absorbansı

A2= 10 s sonraki absorbans

Yukarıdaki formüle göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından testis dokularında mg protein başına katalaz aktivitesi hesaplandı (k/mg protein).

5.3.6. Doku GP-x Tayini

Dokuda GPx, SOD için hazırlanan doku homojenatında CAYMAN marka GP-x ölçüm kit (katalog no: 703102) prosedürü kullanılarak ölçüldü.

5.3.7. Doku GSH Tayini

GSH ölçümü Afzal ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda (189) göre yapıldı. 0.2 mL homojenat alındı, üzerine %3'lük 400 µL metafosforik asit eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 25 dk bekletildi, ardından 10 000 g'de + 4 °C'de 5 dk santrifüjlendi. Sep-Pak marka C-19 katı faz ekstraksiyon kolonundan 400 µL süpernatant geçirildi (bu işlemden önce kolon 400 µL metanol ile 2 kere şartlandırıldı). Daha sonra kolon 400 µL %0.1'lik TFA ile elüe edildi. Elüent viallere alınarak HPLC'de (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) çalışıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

1- % 0,1'lik Trifloroasetik asit çözeltisi: Orjinal şişeden 1000 µL TFA alındı, son hacim HPLC saflığındaki su ile 1 L'ye tamamlandı.

2- Metafosforik asit çözeltisi: 1.5 g metafosforik asit bir miktar HPLC saflığında su ile çözüldü ve son hacim HPLC saflığındaki su ile 50 mL'ye tamamlandı.

- Enjeksiyon Hacmi 10 µL
- Mobil faz % 65 Asetonitril, %35 % 0.1 TFA

- Akış Hızı 1 mL/dk
- Dedektörün dalga boyu 210 nm
- Kolon C-18 Fortis UniverSil C18 250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çaplı

5.3.8. Plazma Testosteron Tayini

Plazma testosteron CAYMAN marka Rat testosteron ELISA kit (katalog no: 582701) prosedürü kullanıldı.

5.3.9. Glikoz-6- fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Ölçüm Yöntemi

G6PD ölçümü Jack DEUTSCH'ın yöntemi (190) ile ölçüldü. Karışım konsantrasyonu için 50mmol/l Tris, 0.38 mmol/l NADP, 6.3 mmol/l MgCl₂ (magnezyum klorür), 3.3mmol/l G-6-P ve 5 mmol/l Maleinimid kullanıldı. Ölçüm için bu karışımdan 1.0 ml alındı ve tamamıyla karışmasına izin verildi. Akabinde 0.02 ml doku homojenatı eklendi ve karıştırıldı. 340 nm'de 3-5 dk absorbans edilip okundu.

5.3.10. Sorbitol Dehidrogenaz (SDH) Ölçüm Yöntemi

SDH enzimi ölçümü Ulrich GERLACH'ın yöntemi (191) ile ölçüldü. Karışım konsantrasyonu için; 1.6 ml TEA (trietanolamin) buffer, 0.1 ml NADH solüsyonu, 1.0 ml doku homojenatı alındı, karıştırıldı ve 25°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından 0.3 ml Fruktoz solüsyonu ekledi ve 365 nm'de 5-8 dk absorbans edilip okundu.

5.4. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel olarak grupların biyokimyasal ve histolojik verilerinin analizlerinde sayısal değerler Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı, ortalama ve Standart sapmalar hesaplanarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait deneklerin vücut ağırlıkları ile testis ağırlıklarının karşılaştırması Tablo 3'te verilmiştir.

Elde edilen istatistiksel verilere göre DOX, DOX+RES gruplarının vücut ağırlığı Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. DOX, DOX+RES gruplarının testis ağırlığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Fakat DOX+RES grubunun testis ağırlığının, DOX grubunun testis ağırlığına göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Tablo 3. Deney Gruplarının Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Vücut ağırlığı (gr)	Testis ağırlığı (gr)
KONTROL	212,8±16,76	1,43333±0,1751
DOX	150,1 ^a ± 16,72	0,616667 ^a ±0,1329
DOX+RES	159,2 ^a ± 13,96	1,042857 ^{a,b} ±0,1414
RES	189,5 ± 12,53	1,25 ±0,08367
DMSO	189,6 ± 15,31	1,25±0,1049

^a: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05)

^b: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

6.2. Morfometrik Bulgular

Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve germinal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısına ait yapılan ölçüm sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.

DOX grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübül çapında, seminifer epitel genişliğinde anlamlı derecede azalma, germinal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısında artış gözlemlendi. DOX+RES grubunun DOX grubuna göre seminifer tübül

çapında, seminifer epitel genişliğinde artış, germinal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısında azalma gözlemlendi. Ayrıca DOX+RES grubundagerminal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısında azalma olsa da kontrol grubuile kıyaslandığında istatistiksel açıdan artış gözlemlendi.

Tablo 4. Deney Gruplarına Ait Morfmometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

	KONTROL	DOX	DOX+RES	RES	DMSO
Seminifer Tübül Çapı	259±4,37	151,4 ±14,6 ^a	224, ±4,72 ^b	238,3± 4,72	241± 9,1
Germinal Epitel Kalınlığı	90±4,47	49,02 ±6,80 ^a	82,87 ± 2,57 ^b	87,5±2,42	86,57±3,34
Germinal Hücrelerin Lümene Döküldüğü Tübül Sayısı	5 ±5,47	65,71 ±5,34 ^c	25,71 ±5,34 ^{d,e}	6,66±5,16	6,66± 8,16

^a: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0,05).

^b: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

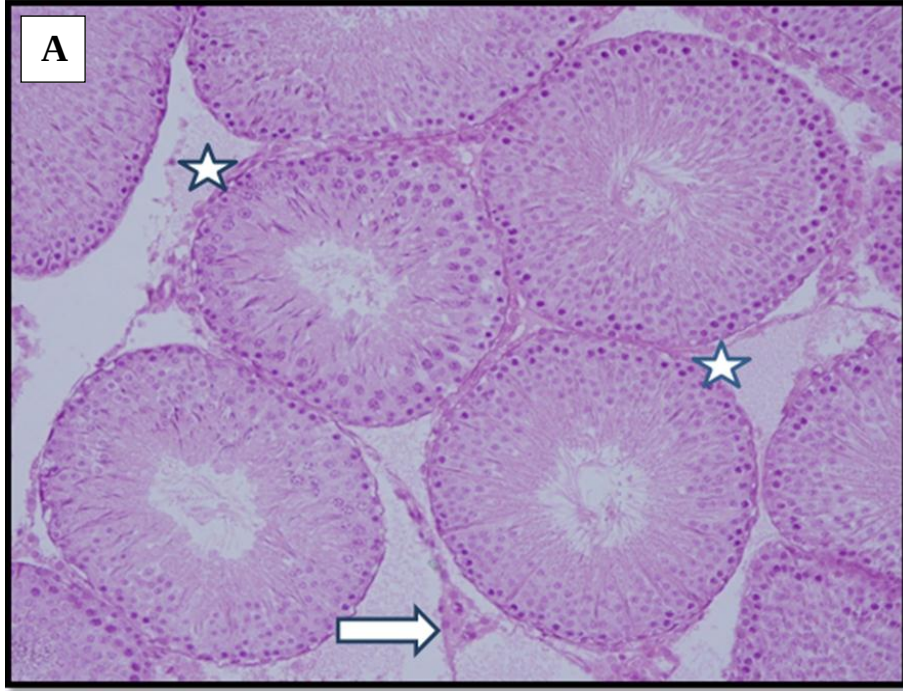
^c: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır(p< 0,05).

^d: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

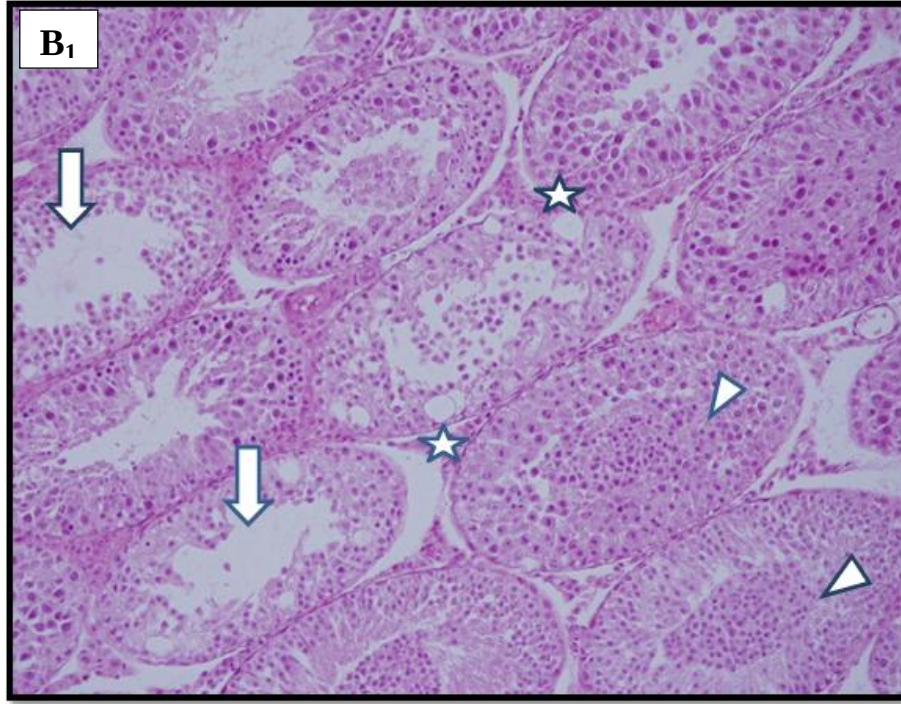
^e: DOX+RES grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

6.3. Morfolojik Bulgular

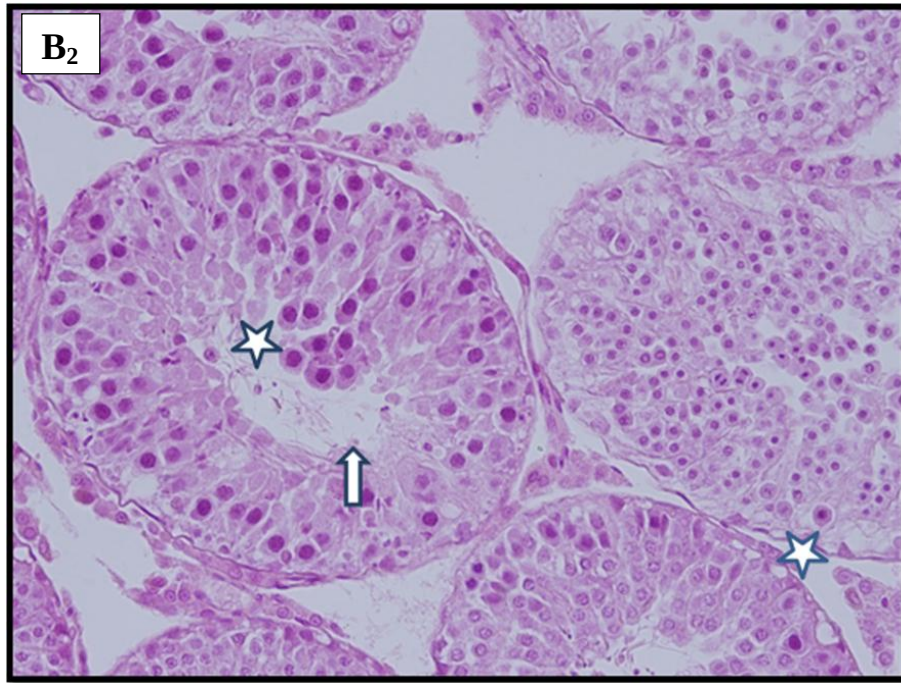
Testis dokusunun histolojik incelemesinde; Kontrol grubuna ait testis kesitlerinde, normal yapıda seminifer tübüller, interstisyel dokuda Leydig hücreleri ve spermatogenik seriye ait hücreler izlendi, herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Şekil 8). DOX grubuna ait testis kesitlerinde, seminifer tübül bazal membranında düzensizlikler, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri, seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler ve vakuoller, seminifer tübül çapında azalma izlendi (Şekil 9-10).DOX+RES grubuna ait testis kesitlerinde, lümende germinal epitel hücrelerinin dökülmüş olduğu birkaç tübül dışında herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Şekil 11).RES ve DMSO gruplarına ait testis kesitlerinin kontrol grubuna benzer olduğu gözlemlendi ve patolojiye rastlanmadı (Şekil 12).



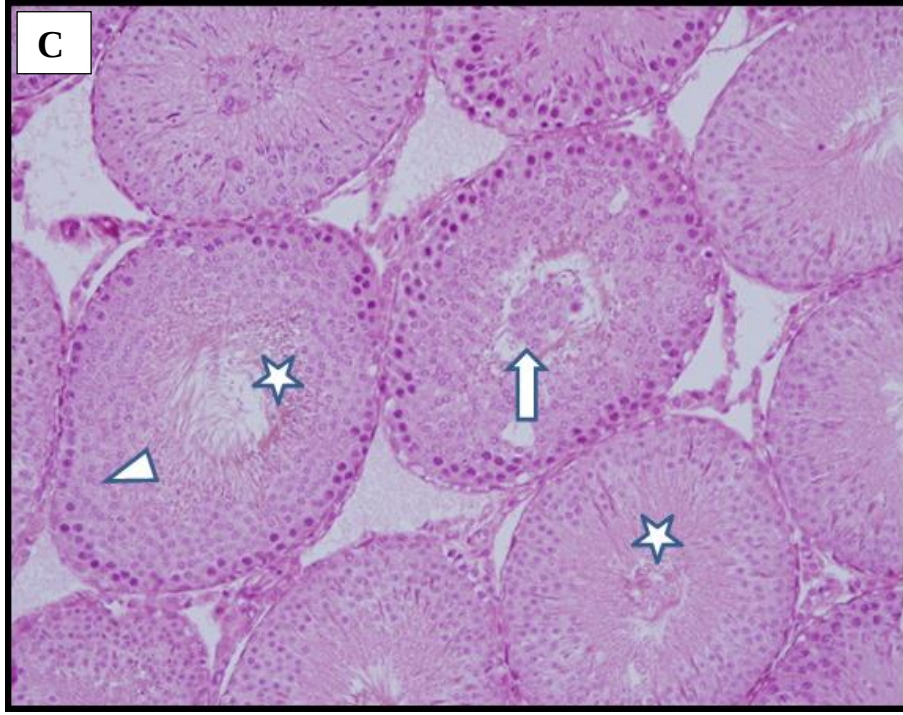
Şekil 8. Kontrol Grubuna (A) ait Testis Dokusu. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki testis dokusunda seminifer tübüller (*) ile aralarındaki interstisyel bağ doku (→) izlenmektedir (H&E, X200).



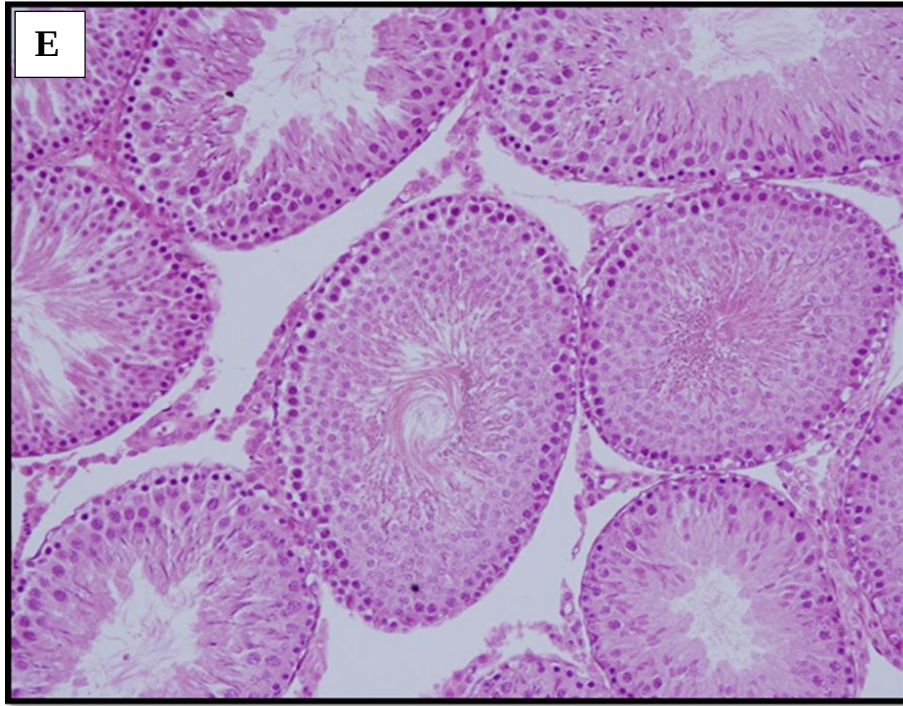
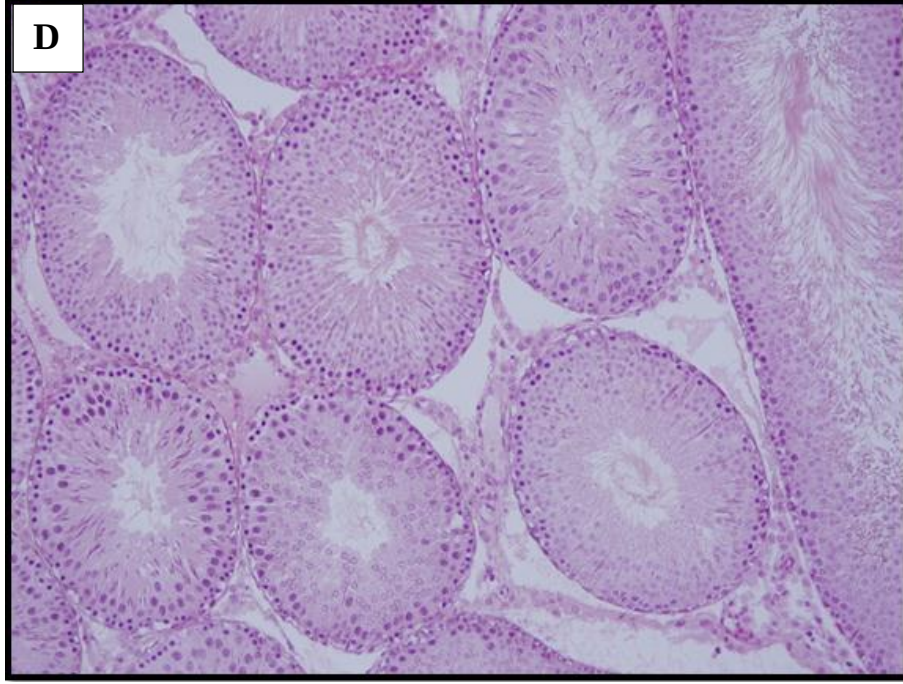
Şekil 9. DOX Grubuna (B₁) Ait Testis Dokusu. Olgunlaşmamış germinal hücrelerin lümene dökülmesi (►), tübül duvarında vakuolizasyon (*) lümende spermatozoonların azlığı (↓) dikkat çekmektedir (H&E, X200).



Şekil 10. DOX Grubuna (B₂) ait Testis Dokusu. Eozinofilik sitoplazmalı spermatogenetik hücreler (*), spermatozoa azlığı (↑) görülmektedir (H&E, X400).



Şekil 11. DOX+ RES (C) Grubuna ait Testis Dokusu. Lümeninde spermatozoa yoğunluğu (*), normal dağılımlı spermatogenetik hücreler (►), düzenli sınırlara sahip seminifer tübüller ve az sayıda lümeninde olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübüller (↑) izlendi (H&E, X200).



Şekil 12. RES Grubu (D) ve DMSO Grubuna (E) ait Testis Dokusu Örneği. Seminifer tübüllerin kontrol grubuna benzer histolojik yapıda olduğu izlendi (H&E, X200).

Deney gruplarına ait testis dokularının seminifer tübül yapısının Johnsen testis hasar skorlaması ile değerlendirme sonuçları, TUNEL tekniği ile değerlendirilen Apoptotik İndeks (AI) Tablo 5 ve Şekil 13-15'te verilmiştir. Johnsen Skoru değerlendirmesine göre; DOX grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görüldü. DOX+RES grubunda DOX grubuna göre anlamlı derecede arttığı izlendi. AI değerlendirmesine göre; AI'in DOX grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. DOX+RES grubuna ait AI'in DOX grubuna göre anlamlı derecede azaldığı izlendi.

Tablo 5. Deney Gruplarına ait Johnsen Skoru ve Apoptotik İndeks Değerlendirmesi

Gruplar	Johnsan skoru	Apoptotik indeks (%)
KONTROL	9,73 ±0,37	2,74± 1,13
DOX	^a 5,68 ±0,62	56,16 ^c ± 5,11
DOX+RES	^b 8,97 ±0,48	20,44 ^{d,e} ± 2,65
RES	9,76 ±0,15	3,11± 1,02
DMSO	9,63 ±0,18	3,04± 0,87

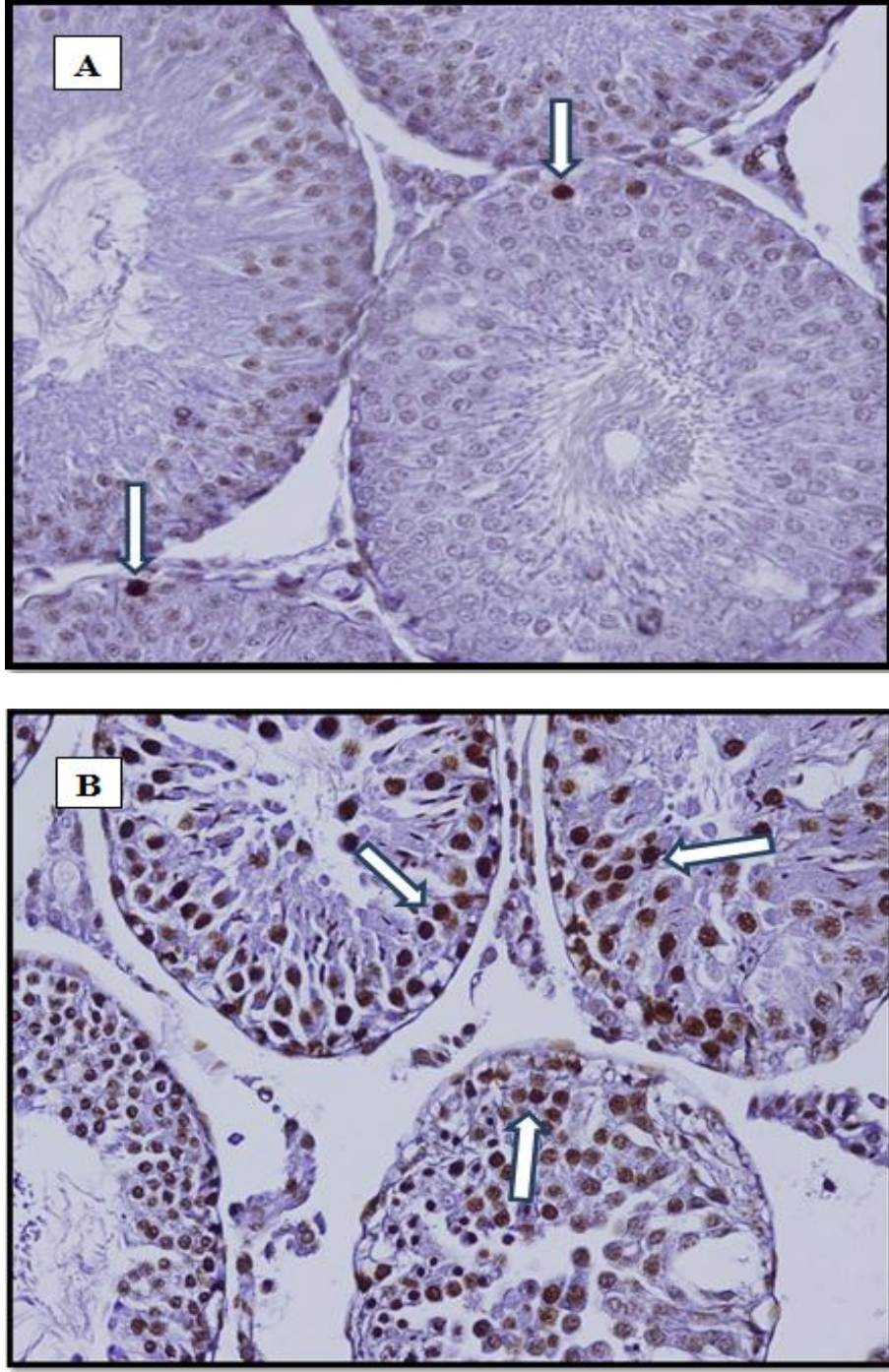
^a: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

^b: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

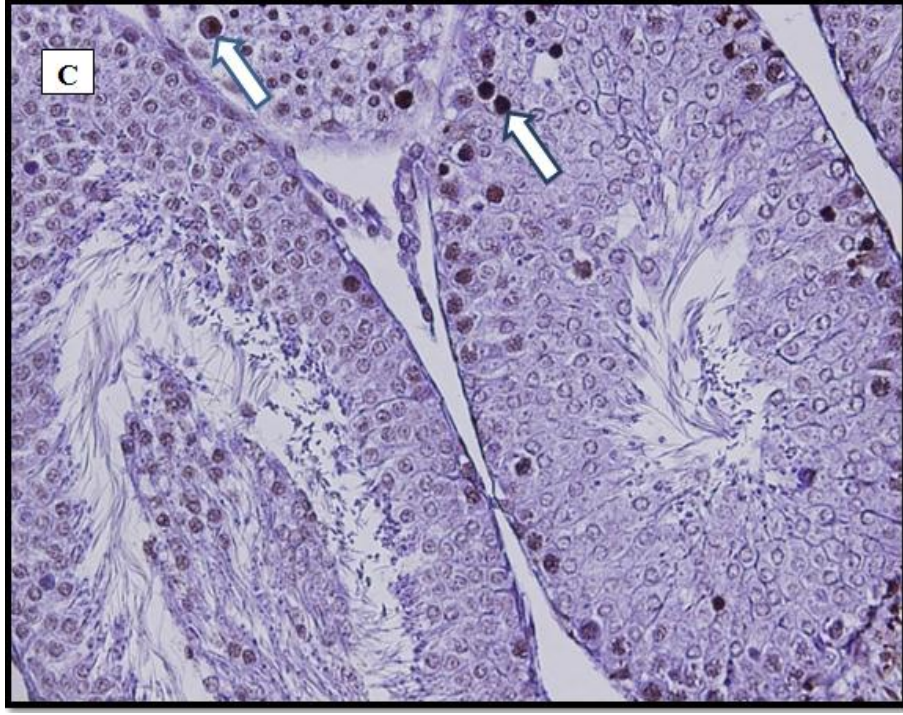
^c: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

^d: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

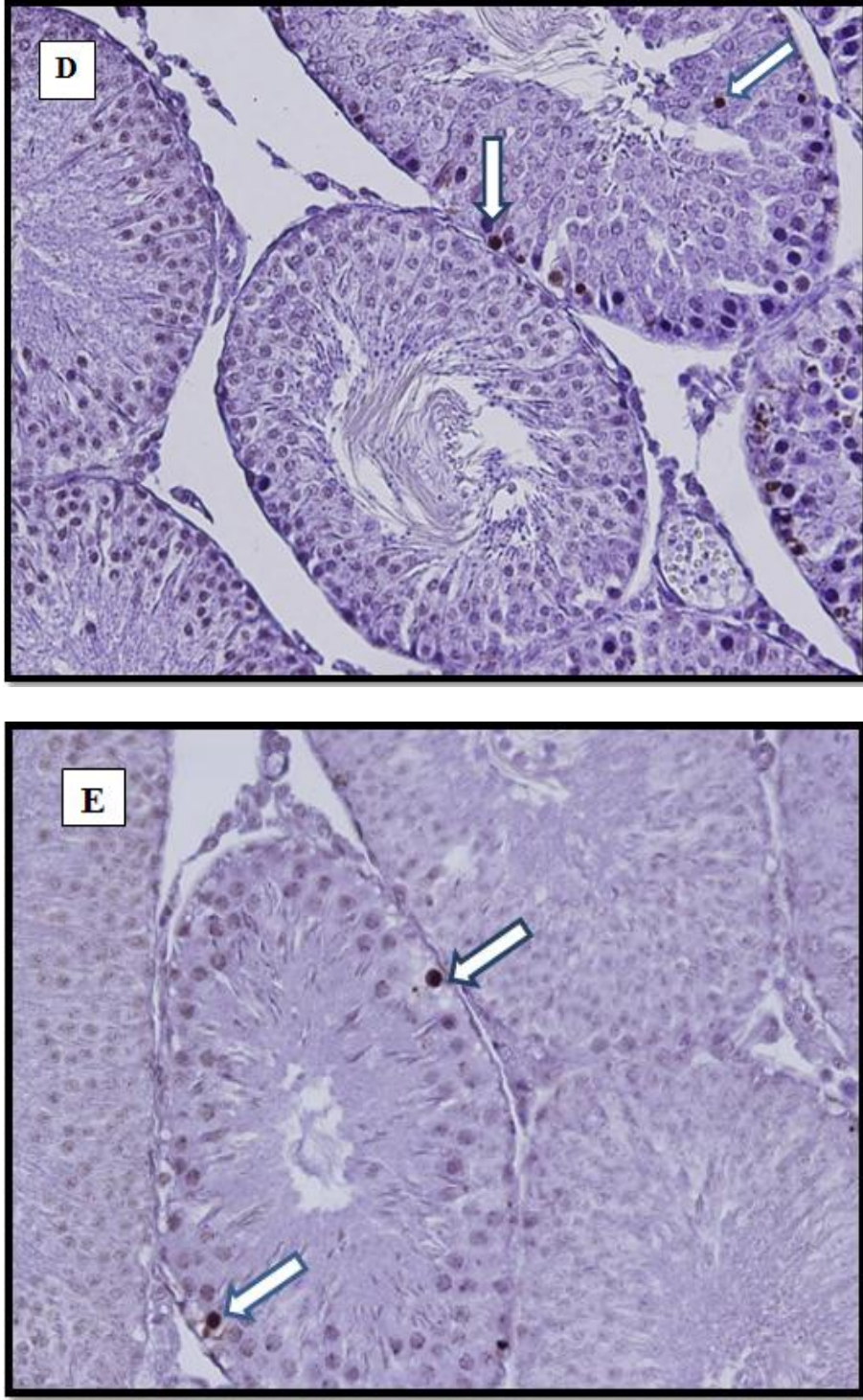
^e: DOX+RES grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).



Şekil 13. Kontrol Grubu (A) ve DOX Grubuna (B) Ait Testis Dokusunda Gözlenen Tunel (+) Hücreler (↑) (TUNEL X400).



Şekil 14. DOX+RES (C) Grubuna Ait Tunel (+) Hücreler (↑) (TUNEL X400).



Şekil 15. RES Grubu (D) ve DMSO Grubuna (E) Ait Tunel (+) Hücreler (↑) (TUNEL X400).

6.4. Semen Analizine Ait Bulgular

Deney gruplarına ait semen analizinde total sayı, canlılık, progresyon ve morfoloji değerlendirme sonuçları Şekil16-19 ve Tablo 6’ da verilmiştir.

Bu bulgulara göre DOX uygulamasından sonra sperm sayısında, canlılıkta, progresif hareketli sperm yüzdesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma ve anormal sperm sayısında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gözlemlendi. DOX+RES grubunun DOX grubuna göre semen analizi bulgularında sperm sayısında, canlılıkta, progresif hareketli sperm yüzdesinde anlamlı derecede artış ve anormal sperm sayısında azalma olduğu görüldü. Diğer gruplarla (RES ve DMSO) kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 6. Sperm Analizine Ait Bulgular

	KONTROL	DOX	DOX+RES	RES	DMSO
Total sayı (x10 ⁶)	22,83 ±6,52	4,5 ^a ±3,50	15,14 ^{c,e} ± 3,97	20,17± 0,75	19,67 ±1,5
Progresif (%)	73,1 ±9,23	8,102 ^a ±15,07	57,86 ^c ±6,46	68,34 ±9,86	71,53±8,99
Canlılık (%)	73 ±2,23	35,5 ^a ±17,82	61,86 ^c ±3,76	73 ±11,15	70± 13,39
Anormal Morfoloji Oranı (%)	2,48 ±0,09	5,809 ^b ±0,85	3,897 ^d ±0,83	2,312 ±0,20	2,213±0,14

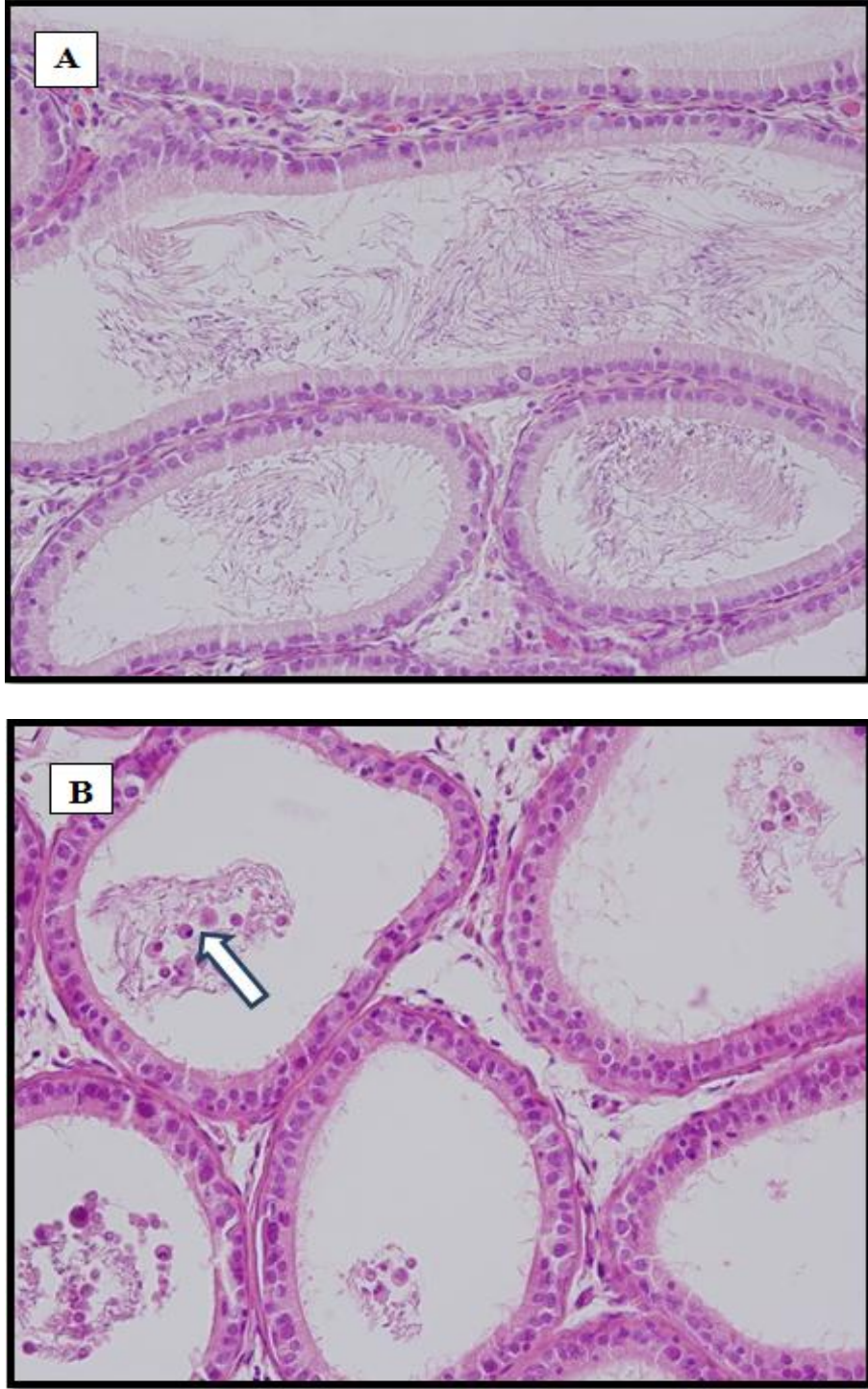
^a: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

^b: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

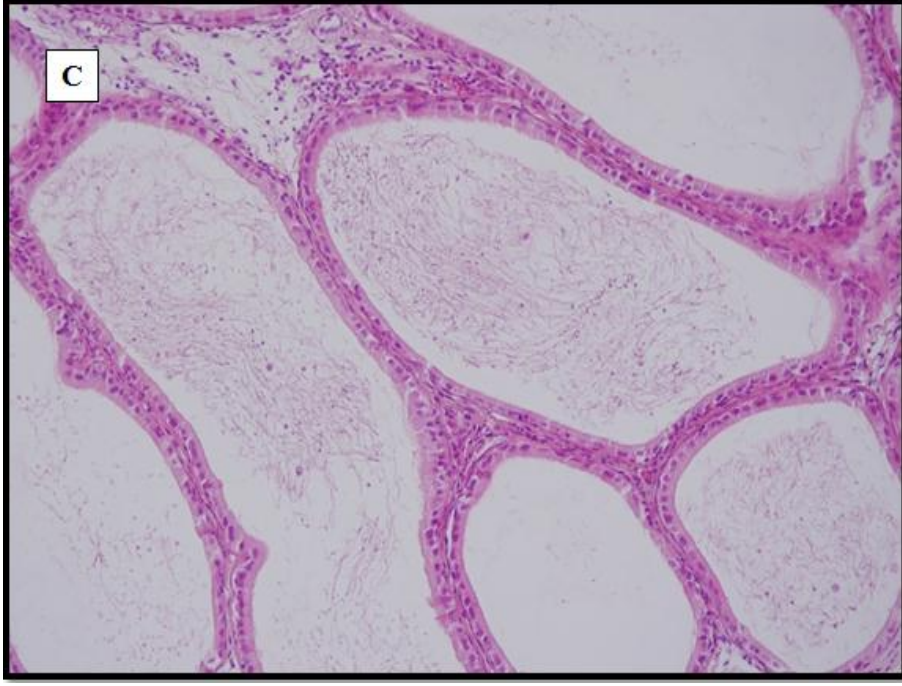
^c: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

^d: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

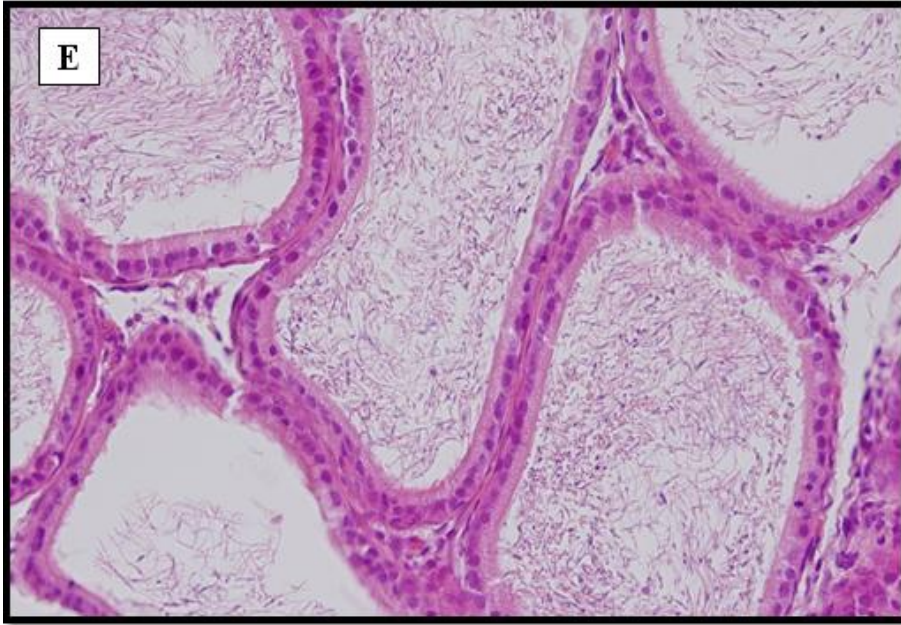
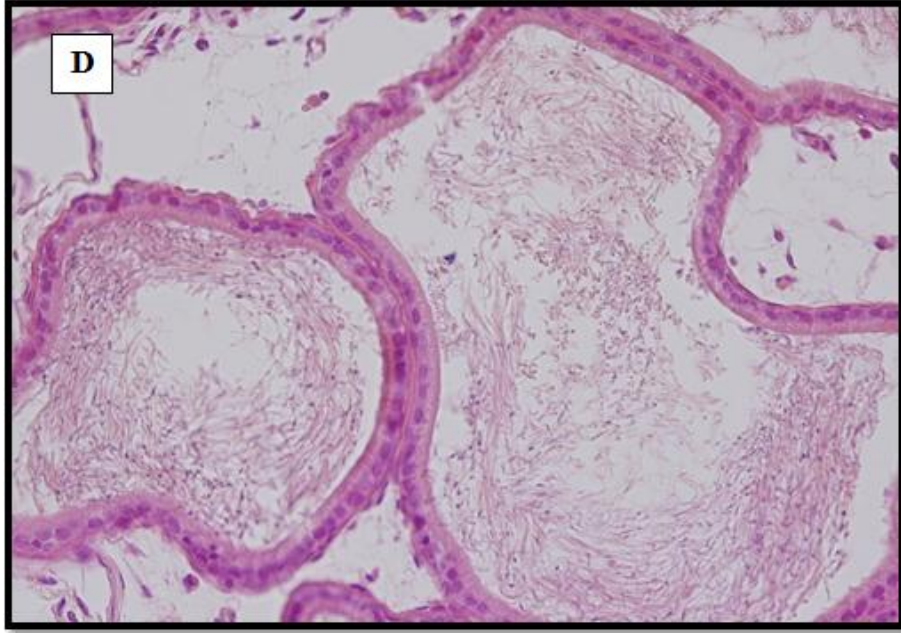
^e: DOX+RES grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).



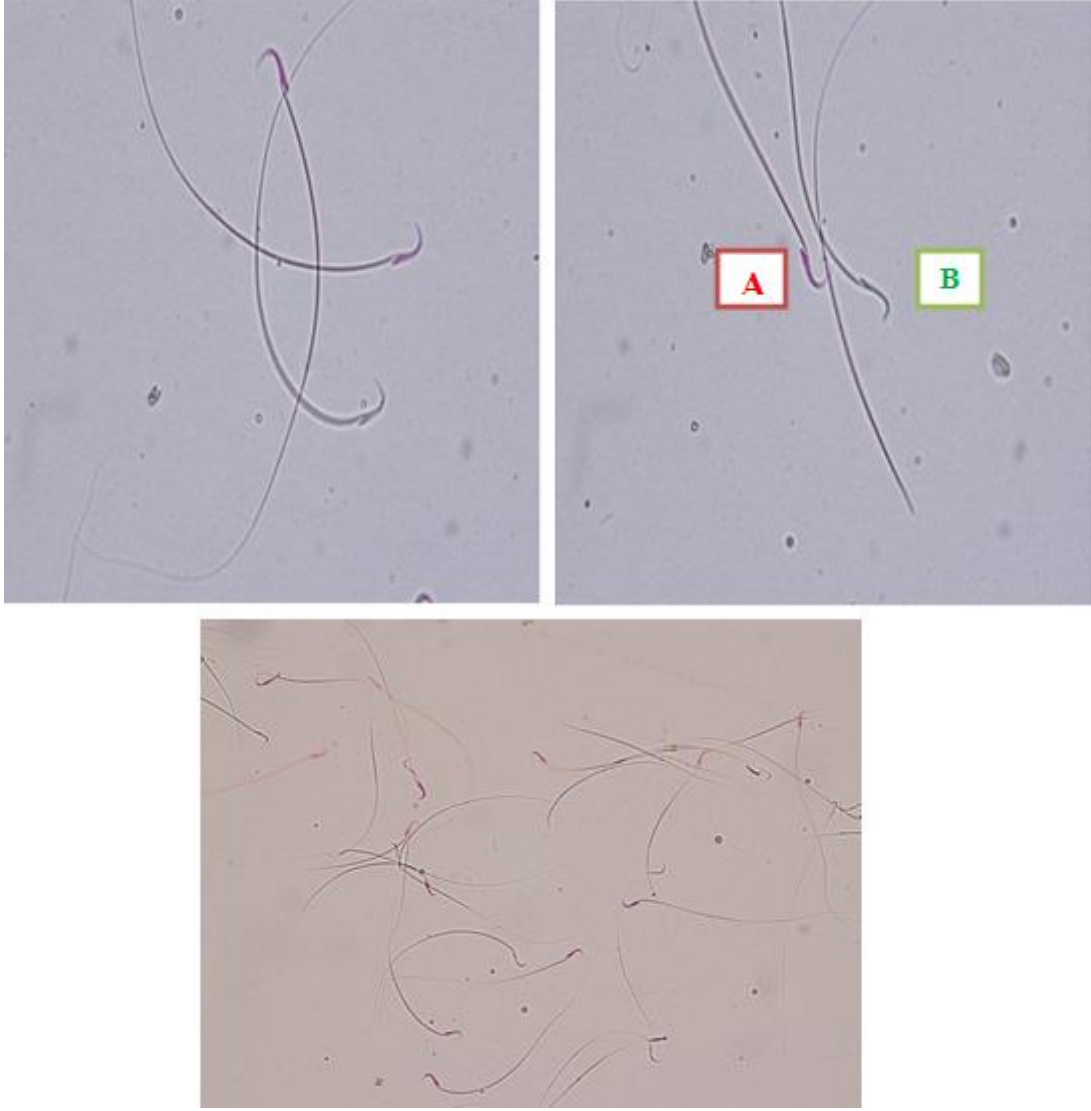
Şekil 16. Kontrol Grubu (A) ile DOX Grubuna (B) Ait Epididimisin Işık Mikroskopik Görüntüsü (H&E X400). (↑) Olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücreler.



Şekil 17. DOX+RES Grubuna (C) Ait Epididimisin Işık Mikroskopik Görüntüsü (H&E X400).



Şekil 18. RES Grubu (D) ve DMSO Grubuna (E) ait Epididimisin Histolojik Görüntüsü (H&E X400).



Şekil 19. Sperm Analizi Görüntüleri. A: Ölü sperm; B: Canlı sperm

6.5. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

Deney gruplarına ait kanda Plazma Testosteronu, Plazma MDA, dokuda MDA, SOD, CAT, GP-x, GSH, G6PD ve SDH sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

Bu bulgulara göre plazma testosteron seviyesi DOX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldı. DOX+RES grubunda DOX grubuna göre anlamlı artış olduğu gözlemlendi. Plazma ve doku MDA, GP-x ve GSH seviyelerinin DOX ve DOX+RES grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi. Bununla beraber plazma ve doku MDA seviyeleri DOX+RES grubunda DOX grubuna göre

anlamalı derecede azaldı, GP-x seviyesi ise arttı. SOD, CAT, G6PD ve SDH değerlerinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 7. Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Parametrelere ait Bulgular

	KONTROL	DOX	DOX+RES	RES	DMSO
Plazma Testosteron (Pg/mL)	1025 ±288,5	428,5 ^a ±129,8	800,5 ^c ±261,6	821,6±36,3	848,9±99,7
Plazma MDA (nmol/mL)	0,6892±0,197	1,308 ^b ±0,487	0,8522 ^{d,e} ±0,10	0,7413±0,044	0,6212±0,193
Doku MDA (nmol/g protein)	377,4±44,35	503 ^b ±27,45	448,3 ^{d,e} ±48,23	385,7±42,61	347 ±62,58
SOD (U/mg protein)	6,668 ±1,77	5,075 ± 1,82	5,265 ±1,56	5,962 ±1,41	5,803±0,82
CAT (U/mg protein)	0,0273±0,034	0,007±0,0019	0,010 ±0,002	0,010 ±0,002	0,010±0,002
GP-x (U/mg protein)	1,43 ±0,1613	2,013 ^b ±0,342	2,198 ^{b,c} ±0,266	1,398±0,424	1,677±0,490
GSH (µg/ml)	4,197±0,07554	5,867 ^b ±0,336	6,314 ^b ±0,7198	4,417±0,3371	4,183±0,1941
G6PD (U/g protein)	0,198±0,057	0,097±0,66	0,1132±0,035	0,198±0,114	0,168±0,079
SDH (U/g protein)	3,495 ±2,05	2,652±1,19	2,722±1,09	3,663±2,28	3,327±2,18

^a: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

^b: DOX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

^c: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

^d: DOX+RES grubundaki değerler DOX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p< 0,05).

^e: DOX+RES grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p< 0,05).

7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen, sonucu bazı türler için maalesef ölümlerle biten ve bu nedenle de tedavisi için en çok araştırma yapılan hastalıktır (192). Kanser hastalarında antineoplastik kemoterapinin gelişmesi ve destek tedavisi ile mortalite ve morbidite oranları önemli ölçüde azalmıştır. Ancak yüksek doz sitotoksik ilaçların kullanılması, kanser hastalarının daha uzun süre yaşamasına ve ilaçlarında çoklu organ sistemlerinde yan etkilerinin artmasına sebep olmuştur (193). En çok etkilenen organlar kendini yenileyebilen hücre popülasyonunun olduğu kemik iliği, mide-bağırsak, mukozalar ve saç folikülleridir. Ayrıca sitotoksik kemoterapi ile tedavi erkek üreme organlarında önemli gonadal hasara neden olmaktadır. İnsanlarda ve deney hayvanlarında her iki cins için de, fertilité üzerindeki muhtemel yan etkileri yeterince değerlendirilmemiştir (7, 194, 195, 196).

Kanserli erkek hastalar için testiküler fonksiyon üzerine toksik etkileri olan uygulamalarda tedavinin en büyük sorunu infertilitedir. Çünkü bu insanlar, kanser kontrol altına alındığında, normal bir yaşam sürmeyi ve muhtemelen çocuk sahibi olmayı dilemektedirler (197). Bu nedenle, tedavinin bir sonucu olarak germinal dokuda kalıcı hasar meydana gelme olasılığı ve buna bağlı olarak gelecek kuşaklarda anormal yapılı çocukların dünyaya gelme ihtimali göz ardı edilmemelidir (198).

Antrasiklin grubunun bir üyesi olan DOX tedavisi, kalp, böbrek, testis ve karaciğer gibi organlarda hasarlara sebep olmaktadır. DOX' a dayalı testis hasarı üzerine yapılan çalışmalarda üreme organı ağırlığında azalma, seminifer tübül epitelinde bozulma, spermatojenik hücrelerde apoptoza neden olarak spermatogenezi bozmakta ve infertiliteye sebep olmaktadır. Ayrıca sperm konsantrasyonunda, motilitesinde azalma ile birlikte sperm morfolojisinde de bozulmalara neden olmaktadır (199, 200).

DOX'un testis için toksik etkiye sebep olan mekanizma tam olarak açıklanamasa da son dönemki bulgular DOX' un direk oksidatif stres oluşturduğu ve bunu da lipidperoksidasyon üreterek DNA hasarına sebep olduğu en yaygın görüştür. DOX ile serbest radikal oluşumu iki farklı yolla gerçekleşmektedir (130). Birincisi semikuinon (AQ) radikale metabolik indirgemedir (201). NADH veya NADPH' dan bir elektron

antrasikline transfer edilir ve antrasiklininkuinon formunun oksidasyonu ile semikuinon radikali oluşur (202). Oksijen bulunması durumunda semikuinon kendiliğinden otookside olur ve ilk olarak süperoksitserbest radikali ve daha sonra diğer reaktif oksijen radikallerinin olduğu redoks döngüsüne katılır (201). İkinci yol olarak ise, Doksorubisin serbest radikallerinin demir reaksiyonları içeren, enzimatik olmayan mekanizmasıdır. Örneğin, demir atomu bir elektron kabul ettikten sonra Fe^{+3} bir redoks reaksiyonunda Doksorubisin ile reaksiyona girer ve bir Fe^{+2} Doksorubisin serbest radikal kompleksi üretilir. Bu demir-doksorubisin kompleksi hidrojen peroksit ve diğer aktif oksijen türleri için oksijen azaltabilir (130, 202).

DOX ile kanser tedavisinde yaşam oranları %30'lardan %70'lere yükseltilmiş olduğu düşünülünce (203) sebep olduğu yan etkileri ortadan kaldırılmaya yönelik çeşitli araştırmalar yapılmaya başlanmış ve bu konseptte dayalı çeşitli antioksidan ya da antiapoptotik ajanlar istihdam edilmiştir. Fakat bu kötü etkileri geri çevirecek ya da koruyucu etkinliği yeterli olan bir ajan henüz kanıtlanmamıştır (204).

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) doğal bir fitoaleksindir (205). Yapılan araştırmalarda anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-virüs, anti-tümör gibi özellikleri içeren geniş biyolojik aktivitelerinin olduğu gözlenmiştir (12). Resveratrolün lipidperoksidasyonu azaltıcı etkisi; 'epicatecin', 'catechin', 'qarcetin' gibi diğer fenollerden daha potent olduğunu göstermiştir (150).

Diyabetik ratlar üzerine yapılan bir çalışmada düzenli olarak günlük alınan resveratrolün lipidperoksidasyonu azalttığı, sıçan hipokampus ve frontal kortekste antioksidan özellik gösterdiği görülmüştür (161). Sıçanlarda Cisplatinin (CP) kardiyotoksisi üzerinde yapılan bir çalışmada, RES' in miyokardiyal hasarı azalttığı, laktatdehidrogenaz artışını önlediği, antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı ve MDA artışını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, RES' in kanser hücrelerinde CP ile oluşan sitotoksisteye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (206). Yine başka bir çalışmada testiste germ hücre apoptozisini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (14).

Bu çalışmada tek doz Doksorubisin uygulamasının sıçan testisi üzerindeki olumsuz etkilerine karşı Resveratrol'ün koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırılmıştır.

Kato ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma da (136) DOX'a kronik maruziyette üreme organ ağırlığında azalma olduğunu söylerken Endo ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada(207) önemli etkisi olmadığını rapor etmişlerdir. Fakat bizim çalışmamızda sadece DOX uygulanan grupta testis ağırlığı kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular bize DOX uygulandıktan sonra bu azalma sebebinin seminifer tübülde ciddi parankimalatrofinin geliştiğini düşünmekteyiz (135). Ayrıca DOX uygulaması ile birlikte resveratrol verilerek tedavi edilen grubun (DOX+RES) testis ağırlığının DOX grubuna göre normal olduğu ve kontrol grubuna istatistiksel olarak yakın olduğu gözlenmiştir. Fakat DOX+RES grubunun vücut ağırlığında DOX grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sadece RES ve sadece DMSO uygulanan gruplarında vücut ve testis ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda 10 mg/kg⁻¹ DOX uygulaması, sıçan testis seminifertübüllerinde çeşitli tipte morfolojik hasarlara neden olduğu görülmüştür. Bu hasarlar; ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde testis dokusunda seminifertübül bazal membranında düzensizlikler, lümende germinalepitel hücreleri, seminifertubulgerminalepitelinde düzensizlikler ve vakuoller izlendi. Bu histopatolojik hasarların spermatogenezin bozulmasına sebep olduğu kanaatindeyiz (184, 208).

Bu çalışmada testis seminifertübülünde hasar skoru için Johnsen skoru sistemi ile değerlendirilmiştir. Çünkü;Johnsen skoru seminifertübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğini ve olgun spermatozoa sayısını vermektedir. Yapılan çalışmalarda DOX uygulamasının spermatogenez ve spermatozoa üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir (204). Bu çalışmada DOX grubuna ait Johnsen Skoru kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı, DOX+RES grubunda DOX grubuna göre anlamlı derecede arttığı izlendi. Sadece RES ve sadece DMSO uygulanan gruplarda kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar Trivedi arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadaki Johnsen Skoru ile desteklenmektedir (184).Antioksidanların oksidatif stres sonucu bozulan spermatogenez üzerine olumlu etkilerinden hareketle doksorubisin ve resveratrolün testiste ortaya çıkaracağı etkilerin Johnsen kriterleri ile aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda DOX' un testis üzerindeki etkisini, morfolojik incelemelerin yanı sıra morfometrik ölçümler ile ortaya koymak için, seminifertübül çapı, seminiferepitel genişliği ve germinal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısı ile değerlendirilmiştir. DOX' un testis hasarı üzerine Çeribaşı ve arkadaşlarının yapmış

olduğu çalışmada, seminifertübül çapında küçülme ve seminiferepitel genişliğinde azalma olduğu bildirilmiştir (209). Bizim çalışmamızda da, DOX' a maruziyet sonrasında seminifer tübül çapı, seminiferepitel genişliğinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma, germinal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısında artış gözlemlendi. DOX+RES grubunun DOX grubuna göre seminifertübül çapı, seminiferepitel genişliğinde artış, germinal hücrelerin lümene döküldüğü tübül sayısında azalma gözlemlendi. Bu ölçüm sonuçları ile morfolojik sonuçlar birbirini desteklemektedir. RES tedavisinin DOX ile oluşan testis hasarında hem morfolojik hem de morfometrik düzeyde koruma sağladığı görülmüştür.

Çeşitli dokularda DOX toksisitesinin gelişiminde apoptozisnedensel bir rol oynar (210). DOX'a dayalı testis toksisitesi üzerine rodentler pek çok çalışma yapılsa da germ hücrelerinde oluşan apoptozise neden olan süreç üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Son dönemde DOX' a maruziyet ile oluşan apoptozis üzerine yapılan çalışmalarda ince bağırsak epitel hücrelerinde, renal tübül hücrelerinde (211), saç folikülü hücrelerinde (212) ve kadın germ hücrelerinde (213) apoptozis görüldüğü rapor edilmiştir. Biz testiste DOX'a dayalı apoptozisin olup olmadığını değerlendirmek ve DNA fragmentasyonu açısından TUNEL tekniği kullandık. Yeh ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada DOX'a maruz kalan sıçanlarda TUNEL (+) hücrelerde artış gözlenmiştir (214). Bu artışta DOX'un mitokondrial hasar ve oksidatif stres oluşturarak apoptozise neden olduğu düşüncesine varmışlardır.

Ayrıca diğer bir çalışmada DOX'un apoptotik hasarı TUNEL ve Akım Sitometrik yöntemlerle incelenmiş ve TUNEL (+) hücre sayısında belirgin artış gözlenmiştir. Matsui ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada DOX tedavisine dayalı hücre ölümünde spermatogenetik döngünün tamamında en çok etkilenen hücreler Tip A spermatogoniumların olduğu rapor edilmiştir (208, 215). Bizim çalışmamızda da DOX uygulanan grupta spermatogenetik hücrelerdeki TUNEL tekniğine göre apoptotik indeksin (AI) kontrol grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. TUNEL (+) hücre tutulumunun da diğer spermatogenetik hücrelerle birlikte en çok spermatogoniumlarda yoğunlaştığı görülmüştür. Çalışmamız bu yönüyle de Matsui ve arkadaşları ile uyumluluk göstermektedir. Ayrıca DOX ile eş zamanlı verilen RES tedavi grubunda ise bu AI DOX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. RES ve DMSO uygulanan grup ise kontrol grubuna göre

istatistiksel olarak anlamsız olduğu diğerk bulgular arasındadır. Bu sonuçlara göre DOX'a dayalı germ hücre dejenerasyonunda hedef hücre kitlesini belirlemede TUNEL tekniğinin kullanımının uygun olduğunu ve DOX ile birlikte destek tedavisi olarak verilen RES'in DOX ile oluşan apoptozisi önleyebileceğini düşünmekteyiz (184). Ayrıca bu sonuçlardan yola çıkarak DOX tedavisinde başlangıç olarak spermatogoniumlar etkilendiğı için seminifer tübüllerde diğerk spermatogenetik hücrelerin bütün olgunlaşma safhasında geri dönüşümsüz bir hasar oluştıurabileceğı, sperm sayısında azalmaya ve implantasyon oranında düşmeye sebep olabileceğı düşünmekteyiz.

Bu çalışmada DOX'un infertilite ile ilişkisi incelenmiştir. Ozaki ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada da 3 hafta boyunca 0.5 mg/kg DOX uygulamasının sperm sayısı ve hareketinde azalma, anormal sperm morfolojisinde ise artış olduğı rapor edilmiştir (138, 216). Ayrıca Kato ve arkadaşlarının yaptığı bir diğerk çalışmada bu bulgulara ek olarak sperm progresif yüzdesinde azalma kaydedilmiştir (136). Yine Zanetti ve arkadaşlarının DOX' un epididimis hasarı üzerine yapmış oldukları çalışmada 4 hafta boyunca DOX tedavisi sonrası oligospermi, 9 hafta boyunca tedavi sonrasında ise azospermi geliştiğı belirtilmiştir (137). Bizim çalışmamızda uygulamış olduğumuz 10mg/kg DOX epididimiste sperm sayısı, hareketi, canlılığında azalmaya, anormal sperm sayısında artışa, plazma testosteron seviyesinde azalmaya ve azospermiye sebep olmuştur (200). Sperm hücrelerindeki bu fonksiyon kaybının sperm plazma membranında doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonundan dolayı ve sonrasında akışkanlığını kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (136, 217).90 gün boyunca 20 mg/kg/gün resveratrol verilen sıçanlarda serum testosteron ve gonadotropin seviyelerinin arttığını, tubulerdanseninin azaldığını ve semen sperm sayısını arttığını gösteren çalışma mevcuttur (154). Bizim yaptığımız çalışmada DOX ile eş zamanlı resveratrol verilen sıçanlarda sperm maturasyonunun ve plazma testosteron seviyesinin DOX grubuna göre istatistiksel anlamda artış gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak çalışmamız da resveratrolün 3 hafta süreyle 20 mg/kg/gün dozunda verilmesi olarak açıklanabilir.

Superoksit iyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH) radikali, peroksil (ROO) ve alkoksil (RO) radikal ve bununla birlikte radikal olmayan O_2 , ozon (O_3) ve H_2O_2 içeren reaktif oksijen türleri (ROS) normal metabolizmalarda oksijen kullanımı boyunca üretilir ve erkek

üreme sisteminde gereklidir. Fakat aşırı ROS üretimi lipid peroksidasyona bağlı olarak oksidatif stres ile sonuçlanır. DOX' un testis için toksik etkiye sebep olan mekanizma için direk oksidatif stres oluşturduğu ve bunu da lipidperoksidasyon üreterek DNA hasarına sebep olduğu görüşünden yola çıkarak bu çalışmada oksidatif stres belirteçlerinden biri olarak doku ve plazma MDA düzeyleri incelendi. Çünkü; artmış MDA konsantrasyonu lipidperoksidasyonu ve doku hasarına işaret eder (218). Bu çalışmada doku MDA düzeyleri DOX grubu ve DOX+RES grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla beraber MDA seviyeleri DOX+RES grubunda DOX grubuna göre anlamlı derecede azaldı. Diğer grupların (RES ve DMSO) kontrol grubu ile aralarında anlamlı olarak fark bulunmadı. DOX' un etkilerinin diğer dokularda ve testiste araştırıldığı çalışmalarda doku MDA düzeylerinin uygun bir parametre olduğu gösterilmiş ve dokularda oksidatif stres oluşturularak yapılan çalışmalarda da doku hasarının belirteci olarak MDA kullanıldığı görülmüştür.

Outomuro ve arkadaşlarının DOX' un kardiyotoksitesini değerlendirildiği bir çalışmada kalp homojenatında MDA seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir artışı olduğu sonucuna varılmıştır (219). Ateşşahin ve arkadaşlarının testis dokusu üzerine yapmış olduğu bir çalışmada DOX'a dayalı serbest radikallerin aşırı artmasına bağlı olarak MDA seviyesi yükselmiş ve lipid peroksidasyon olarak değerlendirilmiştir (200). Aynı şekilde resveratrolün oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin dokularda MDA düzeylerini azaltarak gösterdiği de bilinmektedir (220, 221). Bu bilgilerden hareketle resveratrolün DOX uygulaması sonucu lipidperoksidasyon ile oluşturduğu doku hasarını olumlu olarak etkilediğini ancak normal dokuda MDA düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını göstermiştir.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2^-) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir (222). Oksidatif stres sperm hasarı ve infertilite açısından kritik rol oynamaktadır. Spermatozoa ROS'a karşı çeşitli enzimatik antioksidanlar, vitaminler ve glutatyon gibi biyomoleküller ile mücadele etmektedir (223). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit anyonu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyonperoksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere

dönüştürülerek etkisiz kılınır (222). Bu çalışma da DOX ile oluşan serbest radikalleri savurucu antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GP-x ve GSH incelendi. SOD testis gelişimi ve spermatogeneziste önemli rol oynamaktadır. Bu enzimde gelişen değişiklikler testis fonksiyonlarının bozulmasına ve gelişiminin durmasına sebep olabilir (224).

DOX tedavisinde SOD enziminin düşük olması süperoksit iyonlarının devamlı üretilmesine sebep olabilir. Düşük GP-x aktivitesi daha fazla H_2O_2 ’ nintoksik hidroksil radikallerinedönüştürülmesine ve mitokondriyal membranlarda oksidatif strese ciddi artışa sebep olabileceği düşünülmektedir (202). GSH süperoksit radikale karşı hücrel savunma sisteminin kilit bileşenidir. GSH konsantrasyonu ve hücrel GSH-GSGG⁻ turnover hızı oksidatif stresin bir göstergesidir. GSH seviyelerinin süperoksit radikali ile süperoksit kökenli diğer bileşenlerin yarattığı lipid peroksidasyon miktarı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (225). GSH seviyesinde düşüş doku hasarına sebep olmaktadır (226). Prahalathan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada DOX uygulaması sonucu GP-x aktivitesinin azaldığı, bunun sebebi olarak ta proteinlerin yapısının değişmesi ve substrat olarak kullandığı GSH seviyesinin azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür (202).

Bu bilgilerden farklı olarak Çeribaşı ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada GSH seviyesinde DOX grubunun kontrol grubuna göre artışı, SOD ve GP-x aktivitesinde ise bir fark bulunmadığı belirtilmiştir. Bunun sebebi olarak ta oksidatif strese maruz kalan hücrelerde GSH sentezinin uyarılabileceğini rapor etmiştir. Oksidatif stres koşulları altında, bu durumun GSH biyosentezinde pozitif düzenlenmeye neden olabileceğini ve sonuçta GSH seviyelerinin artabileceğini düşünmüşlerdir (209). Bununla beraber RES’ in bu antioksidan enzimler üzerine yapılan çalışmalar da serbest radikal süpürücüsü ve enzim düzenleyici özelliklerinden dolayı oksidatif stresin neden doku hasarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca endotel hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada RES’ in antioksidan enzimlerden olan SOD1 ve GPx1 gibi görev yapabildiğini göstermiştir (227). Bizim çalışmamızda GP-x ve GSH seviyelerinin DOX grubu ve DOX+RES grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi. GP-x seviyesi DOX+RES grubunda DOX grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Bununla beraber SOD, CAT değerlerinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Bu bulgulardan yola çıkarak testis dokusundaki GP-x ve

GSH seviyelerinin artışının DOX'a dayalı oksidatif stres altında serbest radikallerin aşırı üretimini süpürmek için bu antioksidan enzimlerin fazla salındığı düşüncesindeyiz (209).

Ayrıca G6PD ve SDH biyokimyasal açıdan incelenen diğer parametrelerdir. SDH germinalepitelin gelişimi ile ilgili aktivite gösteren testisin önemli bir enzimatiikmarkerıdır. SDH sperm için enerji sağlamakta görev alır ve sorbitolüfruktoza dönüştürmektedir. DOX tedavisinden sonra bu enzim aktivitesinin düşmesi sperm hücrelerinde enerji metabolizması dağılımını desteklemektedir. Testiküler dokuda diğer bir anahtar enzim G6PD'dir (223) ve steroidlerinhidroksilasyonu için eşdeğer bir azalma sağlamaktadır. G6PD direkt olarak glutatyon metabolizması ile ilgilidir ve glutatyonun hücre içi düzeyinin normal tutulmasında gerekli olan NADPH yapımında görev alır. Dokuda bu enzimin düşük olması oksidatif stresi artırır ve hücre ölümlerine sebep olabilir. Prahalathan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada DOX uygulanan grubun testis dokusunda bu enzim seviyeleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da DOX uygulanan sıçanlarda G6PD ve SDH enzimleri kontrol grubuna göre düşük olsa da istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır. Prahalathan ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklememektedir (223).

Çalışmamızın sonucunda bulgularımız, doksorubisinintestiküler fonksiyonu bozduğunu ve resveratrol uygulamasının bu hasarı önlemede olumlu etki yaptığını göstermektedir. Fakat bu konu ile ilgili etkin doz ve uygulama süresinin belirlenmesi için ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

8. SONUÇLAR

Doksorubisinin sıçan testisi üzerindeki olumsuz etkilerine karşı resveratrolün etkilerini araştırdığımız deneysel çalışmamızın sonucunda;

1. Sıçanların kilo takibinde DOX ve DOX+RES grubunda kontrol grubuna göre vücut ağırlığının azaldığı,
2. Testis ağırlığı açısından değerlendirildiğinde, testis ağırlığının DOX grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, DOX+RES grubunda ise DOX grubuna göre artış olduğu,
3. DOX grubunun testis dokusunda histopatolojik hasar olduğu, DOX+RES grubunda ise bu hasarın anlamlı derecede düzeldiği,
4. DOX'ün testis seminifer tübül çapında, germinalepitel kalınlığında azalmaya ve lümen dökülen epitel hücrelerinin görüldüğü tübül sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artışa sebep olduğu, DOX+RES grubunda ise bu morfolojik değerlerde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşmenin görüldüğü,
5. Sperm analizinde, DOX grubunun sperm sayısında, motilitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalma ve anormal morfolojide artış gözlenirken; DOX+RES grubunun sperm sayısında, motilitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış, morfolojisinde ise belirgin şekilde düzelmenin olduğu,
6. Biyokimyasal olarak DOX grubunun plazma testosteron seviyesinde kontrol grubuna göre azaldığı; DOX+RES grubunda ise DOX grubuna göre arttığı,
7. Doku ve plazma MDA seviyesinin DOX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı, DOX+RES grubunda ise DOX grubuna göre MDA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı,
8. Testis dokusunda SOD, CAT, G6PD ve SDH seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı, GP-x ve GSH seviyesinde ise DOX ve DOX+RES gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; doksorubisinin testiküler fonksiyonu bozduğunu ve resveratrol uygulamasının bu hasarı önlemede olumlu etki yaptığını göstermektedir.Fakat bu konu ile ilgili farklı doz ve srelerde yeni çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

9. KAYNAKLAR

1. Dudka J, Jodynys-Liebert J, Korobowicz E, Burdan F, Korobowicz A, Szumilo J, Tokarska E, Klepacz R, Murias M (2005). Activity of NADPH-cytochrome P-450 reductase of the human heart, liver and lungs in the presence of (-)-epigallocatechin gallate, quercetin and resveratrol: an in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2):74-9.
2. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 65(1):128-35.
3. Miranda CJ, Makui H, Soares RJ, Bilodeau M, Mui J, Vali H, Bertrand R, Andrews NC, Santos MM (2003). Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. *Blood* 1;102(7):2574-80.
4. Akşimşek G (2005). Aspirin Ve Doksorubisin'in Farelerde (Mus Musculus) Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptozis) Üzerine Enzimatik Düzeyde Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
5. Wallac KB (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy *Pharmacology & Toxicology* 93, 105-115.
6. <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/Doxorubicin.htm>
7. Lee Y, No K, Jung E, Sung J, Kim Y, Nam S (2002). Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in mouse testis. *Reprod. Toxicol* 16: 291–98.
8. Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SSR, Comhaire FH, Agarwal A (2004). Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 6 :313–8.
9. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, Cortés MM, Hoang YD, Ortiz L, Rau BA, Luderer U (2010). Knockout of the transcription factor Nrf2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radic Biol Med* 49(9): 1368–1379. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.019
10. Sikka SC (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 8: 851-62.

11. Lamson DW, Brignall MS (1999). Antioxidants in cancer therapy; Their actions and interactions with oncologic therapies. *Alternative Medicine Review*, 4, 5, 304-329.
12. Collodel G, Federicoa M.G, Geminiana M, Martinic S, Bonechic C, Rossic C, Figural E, Morettia E (2011). Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology* 31: 239–246.
13. Söylemez H, Uğraş MY, Beytur A, Oğuz F, Kuruş M, Aysun Bay Karabulut AB (2011). Evaluation of antioxidant effect of resveratrol on testicular tissue in rats that were exposed to cigarette smoke. *Turkish Journal of Urology* 37(3):235-241
14. Jiang YG, Peng T, Luo Y, Li MC, Lin YH. (2008). Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. *Chin Med J* 121(13):1204-1209.
15. Tortora GJ, Derrickson B (2009). *Principles Anatomy and Physiology*. 12 rd ed. America: John Wiley & Sons, Inc, 1082-1093.
16. Raff H, Widmair EP, Strang KT (2010). *Vander's Human Physiology*. Vander İnsan Fizyolojisi. 10 th ed. Çeviren: Demirgören S, İzmir Güven Kitabevi, İzmir; 657-665.
17. Yıldırım M (2003). İnsan Anatomisi. 6. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 226-232.
18. Petorak İ (1984). Medikal Embriyoloji. Birinci baskı. Beta basım yayım dağıtım A.Ş, No.22, İstanbul; 220-224
19. Sadler TW (2011). Langman Medikal Embriyoloji. On birinci baskı. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara; 246-250.
20. Moore KL, Persuad TVN (2002). Moore Persuad İnsan Embriyolojisi. Altıncı baskı. Çevirenler: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 323-330.
21. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli M (1992). İnsan Embriyolojisi. Yedinci baskı. Alfa yayım dağıtım, No.29, İstanbul; 207-216.
22. Goodfellow PN, Darling SM (1988). Genetics of sex determination in man and Mouse. *Development* 102, 251-258.
23. Barsoum IB, Yao HH (2010). Fetal Leydig Cells: Progenitor Cell Maintenance and Differentiation. *J Androl*. 31: 11–15

24. Karaaslan FJ (2009). Erişkin erkek sıçanlarda etan dimetan sülfonat ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
25. Toprak M, Akkın MS (1996). Anatomi Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi; İstanbul; 844-861
26. Kılıçoğlu M (2007). Erişkin Sıçanlarda Etan Dimetan Sülfonat Tarafından Oluşturulan Testis Hasarının ve Bu Hasarın Önlenmesinde Çeşitli Vitaminlerin Etkinliğinin Değişik Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık tezi, Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
27. Sancak B, Cumhur M (1999). Fonksiyonel Anatom Baş-Boyun ve İç Organlar. 5. Baskı. Odtü yayıncılık, Ankara.
28. Vannini V, Dianzani U, Rosa E (1999). Anatomi atlası. 7. Baskı. Çevirenler: Vural F, Özkuş K, Akkın MS, Ertem DA, Tanyeli E, Vural ZE, Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret Ltd. Sti, İstanbul; 160-161.
29. Barut T (2008). The Histologic Relation Of Different Experimental Testis Ischemia With Apoptosis. Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilimdalı. Yüksek Lisans Tezi, Manisa.
30. Pointis G, Gilleron J, Carette D, Segretain D (2010). Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. Review. Phil. Trans. R. Soc. B 365; 1607–1620, doi:10.1098/rstb.2009.0114
31. Ding Y, Tang J, Zou J, She R, Wang Y, Yue Z, Tian J, Xia K, Yin J, Wang D (2011). The effect of microgravity on tissue structure and function of rat testis. Braz J Med Biol Res 44(12):1243-50.
32. Bloom W, Fawcett DW (1975). Textbook of histology. Philadelphia, 796-834.
33. Arenas MI, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R (1997). Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. Histochem Cell Biol 107:469–477.
34. Öber A, İzzetoğlu TG (2006). Histoloji. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 248-253.
35. Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviren Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 532-564.
36. Junqueira Lc, Carneiro J (2009). Temel Histoloji Text & Atlası. Çeviren: Solakoğlu S, Aytekin Y, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 418-439.

37. Pop OT, Cotoi CG, Pleşea IE, Gherghiceanu M, Enache SD, Mandache E, Hortopan G, Pleşea RM (2011). Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Rom J Morphol Embryol* 52: 241–248.
38. Ross MH, Long IR (1966). Contractile cells in human seminiferous tubules, *Science* 153(741):1271–1273.
39. Maekawa M, Kamimura K, Nagano T (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59(1) :1-13.
40. Verhoeven G, Hoeben E, De Gendt K (2000). Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrologia* 32(1): 42-5.
41. Albrecht M (2009). Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat* 191(6):532-40.
42. Karan M, Timurkaan S, Aydın A (2006). Erişkin Sincaplarda (*Sciurus Vulgaris*) Testislerin Işık Mikroskopik Yapısı. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 20(3), 185-187.
43. Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD (2010). Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1546):1593-605.
44. Lowe JS, Alan Stevens A (1997). *Human Histology*. Second edt. Mosby, Spain; Barcelona: 310-319.
45. De Kretser DM (1992). *The Testes*. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism. International Practice and Research. London, 6:2; 235-331.
46. Baupal R, Bailey D, Gıwerzman A, Skakkebaek N, Stratis M, Marks A (1989). A novel maturation marker for human Sertoli cells. *International Journal of Andrology* 12(5); 354–359, DOI: 10.1111/j.1365-2605.1989.tb01324.
47. Vitale R, Fawcett DW, Dym M (1973). The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec* 176(3):331-44.
48. Ross MH, Pawlina W (2006). *Male Reproductive System. Histology*. Lippincott Williams&Wilkins Fifth Edition. Sayfa:728-759.
49. Erdoğan D, Görgün M, Hatipoğlu MT, Ilgaz C (2007). Özel Histoloji. İkinci baskı. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 156-167.
50. Young B, Heath JW (2000). *Wheater's Functional Histology*. Fourth edition. Churchill Livingstone, Sydney, 330-336.

51. Rey R, Al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fekete C, Chaussain JL, Josso N (1996). Testicular dysgenesis does not affect expression of antimüllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am. J. Pathol* 148:1689–1698.
52. Orwiga KE, Shinohara T, Avarbocka MR, and Brinster RL (2002). Functional Analysis of Stem Cells in the Adult Rat Testis. *Biology of Reproduction* 66: 944-949.
53. Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 2;60-61:471-80.
54. Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004). Phenotypic and functional characteristics of male germline stem cells in rats. *Dev Biol* 274: 158-170.
55. Dym M, Fawcett DW (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 4(2):195-215.
56. Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52: 198–236.
57. Adler ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* 352:169–172.
58. Foster WG, Maharaj-Briceño S, Cyr DG (2011). Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. Review. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(6):2893-2905.
59. Eroschenko VP (2011). diFiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Çeviren: Demir R. Onuncu baskıdan çeviri. Palme yayıncılık, Ankara, 552-574
60. Su L, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY (2011). Drug transporters and blood--testis barrier function. *J Endocrinol* 209(3):337-51.
61. Levy S, Robaire B (1999). Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biol Reprod* 60: 1392-1401.
62. Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG (2003). Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17(2):211-29.
63. Yıldız S, Gürbulak K (2005). Erkeklerde İmmünolojik İnfertiliteye Genel Bir Bakış. *Kafkas üniv. Vet. Fak. Derg* 11(2): 189-194.

64. Kuehnell W (2003). Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy (4th ed.) Georg Thieme Verlag, New York/U.S.A.
65. Griswold SL, Behringer RR (2009). Fetal Leydig Cell Origin and Development. Sex Dev 3: 1–15, DOI: 10.1159/000200077.
66. Chung JY, Kim, Kim JY, Lee SG, Park JE, Kim WK, Yoon YD, Yoo S, Hyun Yoo H, Kim JM (2011). Benzo[a]pyrene Reduces Testosterone Production in Rat Leydig Cells via a Direct Disturbance of Testicular Steroidogenic Machinery. Environmental Health Perspectives 119;11: 1569-1574.
67. Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Soder O (2010). Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. Review Article. Journal of Biomedicine and Biotechnology doi: 10.1155/2010/684504.
68. Chena H, Geb RS, Zirkin BR (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. Review. Molecular and Cellular Endocrinology 306: 9–16.
69. Midzak AS, Chen H, Papadopoulos V, Zirkin BR (2009). Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. Mol Cell Endocrinol 299(1):23-31.
70. Kılıçoğlu M (2007). Erişkin Sıçanlarda Etan Dimetan Sülfonat Tarafından Oluşturulan Testis Hasarının Ve Bu Hasarın Önlenmesinde Çeşitli Vitaminlerin Etkinliğinin Değişik Yöntemlerle Araştırılması. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir.
71. Guyton CA, Hal EJ (2007). Tıbbi Fizyoloji. On birinci basım. Çeviren: Çavuşoğlu H, Yeğen ÇB, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 996-1041.
72. Ganong WF (2002). Ganong Tıbbi Fizyoloji. Yirminci baskı. Çeviren: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Nobel Tıp kitabevi, İstanbul, 411-419
73. Jensen CE, Wiswedel K, McLoughlin J, Van Der Spuy Z (1995). Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. Fertil Steril 64(6): 1189-1197.
74. Chada M, Prusa R, Bronsky J, Kotaska K, Sidlova K, Pechova M, Lisa L (2003). Inhibin B, Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Testosterone during Childhood and Puberty in Males: Changes in Serum Concentrations in Relation to Age and Stage of Puberty. Physiol. Res 52:45-51.
75. Suresh PS, Rajan T, Tsutsumi R (2011). New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited. Endocrine Journal 58 (4), 223-235.

76. Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M(2001) . Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *European Journal of Endocrinology* 145:561-571.
77. Xia Y, Schneyer AL (2009). The Biology Of Activin: Recent Advances In Structure, Regulation And Function. *J Endocrinol* 202(1): 1–12. doi:10.1677/JOE-08-0549,
78. Hatipoğlu MT, Hatioğlu GH (2006). Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. No.34, Selvi Yayınevi, Ankara, 199-207.
79. Yavaş G (2010). Toluen İnhalasyonuna Bağlı Olarak Sıçanlarda Testis Ve Epididimiste Meydana Gelen Yapısal Değişikliklere Vitamin C'nin Etkisi. Yüksek lisans tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
80. Cornwall GA, Orgebin-Crist MC, Hann SR (1992). The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 6: 1653–64.
81. Liu J, Li JY, Wang HY, Zhang CL, Li N, Lin YQ, Wang WT (2008). Cloning, expression and location of RNase9 in human epididymis. *BMC Research Notes* 1: 111.
82. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R (2011). Comparison of Serum Human Epididymis Protein 4 with Cancer Antigen 125 as a Tumor Marker in Patients with Malignant and Nonmalignant Diseases. *Clinical Chemistry* 57: 11, 1534–1544.
83. Cornwall GA, Horsten HVH, Whelly S (2011). Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic Aggregates in the Epididymis. *Journal of Andrology* Vol. 32, No. 6.
84. Cooper TG (1986). The epididymis; sperm maturation and fertilization. Berlin Springer-Verlag, pp: 105-122.
85. Hamzeh M, Robaire B (2010). Identification of Early Response Genes and Pathway Activated by Androgens in the Initial Segment and Caput Regions of the Regressed Rat Epididymis. *Endocrinology* 151(9):4504–4514.
86. Rıslıy PL (1070). Fluorescence of Holocrine Ephelial Cells of the Epididymis. *Biology Of Reproduction* 3, 67-75.
87. Leung GP, Cheung KH, Leung CT, Tsang MW, Wong PV (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor

- potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol* 216 (1-2): 5-13.
88. Hamilton DW (1990). Anatomy of mammalian male accessory reproductive organs. In: Lamming GE (ed), *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol.2, Reproduction in male. London and New York; Churchill Livingstone, pp: 691-746.
 89. Ahmed MH, Sabry SM, Sherif Mohammed, Zaki SM, El-Sadik AO (2009). Histological, Immunohistochemical and Ultrastructural Study of the Epididymis in the Adult Albino Rat. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2278-2289.
 90. Marta, J. and P.L. Risley, 1986. Holocrine secretory cells of the rat epididymis. *J. Biol. Reprod* 33: 154-168.
 91. Yurtçu A (2011). Hiperterminin Duktus Epididimis Yapısına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
 92. Fukagawa NK (1999). Aging: Is Oxidative Stress a Marker or Is It Causal? DOI:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-146.x
 93. Maher P, Schubert D (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 57: 1287-1305.
 94. Gutteridge Jmc, Halliwell B(1991). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press 1-276.
 95. Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. Review, *Eur. J. Biochem.*, 215, 213-219.
 96. Wei YH, Lee HC (2002). Oxidative stress, mitochondrial. DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* 227: 671-682.
 97. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 11: 403-6.
 98. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS (1995). Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 41: 1135-1138.
 99. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (1999). The reactive oxygen species - total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 14: 2801-2807.

100. Altuntaş A (2008). Sıçanlarda Deneysel Amfoterisin B Nefrotoksisitesinde Oksidatif Stresin Rolünün Ve Olası Oksidatif Stres Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester' in Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi TIP Fakültesi, Isparta.
101. Erenel, G, Erbaş D, Arıcioğlu A (1992). Serbest Radikaller Ve Antioksidan Sistemler. Gazi Tıp Derg 3, 243-250.
102. Mercan U (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet Fak Derg 15 (1-2):91-96.
103. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Review, Türk Biyokimya Dergisi 31 (2); 51–56.
104. Memişoğulları R (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 3: 30-39
105. Machlin LJ, Bendich A (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. The FASEB Journal 1: 6; 441-445
106. Kayış T (2010). Diazinon'un Subletal Konsantrasyonlarının Pimpla Turionellae L.'nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
107. Cöngöloğlu MA (2003). Metilfenidatın Sıçanlarda Beyin Nitrik Oksit Ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Üzerine Etkisi. Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi, GATA Çocuk Psikiyatrisi Anabilim Dalı, Ankara.
108. Hanukoglu I (2006). Antioxidant Protective Mechanisms against Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Mitochondrial P450 Systemes in Steroidogenic Cells. Drug Metab Rev; 38: 171–196.
109. Drevet JR (2006). The Antioxidant Glutathione Peroxidase Family and Spermatozoa: A Complex Story. Mol Cell Endocrinol 250: 70–79.
110. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 79: 829-43
111. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, Cortés MM, Hoang YD, Ortiz L, Rau BA, Luderer U (2010). Knockout of the transcription factor Nrf2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. Free Radic Biol Med 49(9): 1368–1379. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.019.
112. Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T, Miura T (2011). Tolerance of Spermatogonia to Oxidative Stress Is Due to High Levels of Zn and

113. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19: 129-38.
114. Mak T (2003). The E. Donnall Thomas Lecture-apoptosis: "tis death that makes life live". *Biol. Blood Marrow Transplant* 9:483-488, doi:10.1016/S1083-8791(03)00215-5).
115. Güleş Ö, Eren Ü (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* (2) 73-78.
116. Öztürk F (2002). Apoptozis. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2) 143-148.
117. Squier M K, Miller A C, Malkinson A M, Cohen J J (1994). Calpain activation in apoptosis. *J. Cell Physiol* 159(2): 229-237.
118. Hamada T, Tanimoto A, Sasaguri Y (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* 2: 359–367.
119. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahedi N, Kroemer G (2008). Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol* 445: 29- 76.
120. Wallace KB (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology* 93; 105-115.
121. Liu Y, Yang Y, Liu X, Jiang T (2008). Quantification of pegylated liposomal doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy: Application to preclinical pharmacokinetic studies. *Talanta* 15;74(4):887-95.
122. Kismet E, Demirkaya E, Yurttutan N, Berberoğlu S, Karademir S, Aydın Hİ, Kalman S, Köseoğlu V(2004). Serum Bnp Levels İn Children Treated With Doxorubicin For Their Solid Tumors. *Gülhane Tıp Dergisi* 46 (1): 38 – 42.
123. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 65(1):128-35
124. Hardman JG, Limbird LE (2001). Goodman&Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Ed McGraw-Hill Medical Publishing Division, p.1425-1429.

125. Tola T (2008).Doksorubisin İle Oluşturulan Deneysel Kardiyotoksisite Üzerine N-Asetilsisteinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Düzeylerdeki Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta.
126. De Graff, W. G., Myers Jr LS, Mitchell JB , Hahn SM (2003). Protection against adriamycin® cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase II activity by 3,4-dihydroxybenzoic acid. *International Journal of Oncology*, 23; 159-163
127. Shi R, Huang CC, Aronstam RS, Ercal N, Martin A, Huang YW (2009). N-acetylcysteine amide decreases oxidative stress but not cell death induced by doxorubicin in H9c2 cardiomyocytes. *BMC Pharmacol* 15;9: 7
128. <http://www.drugs.com/pro/doxorubicin.html>
129. Akşimşek G (2005). Aspirin Ve Doksorubisin'in Farelerde (Mus Musculus) Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptozis) Üzerine Enzimatik Düzeyde Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
130. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J Ramirez-Tortosa MC (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180;79-95.
131. Karapehlivan M, Uzlu E, Atakişi O, Erdoğan HM, Uzun M, Çitil M (2007). Doksorubisin Uygulanan Tavşanlarda Plazma Sialik Asit, Malondialdehit ve Redükte Glutasyon düzeylerine L-Karnitinin Etkileri [1]. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 13 (2): 155-160.
132. Ayla Ş, Seçkin İ, Tanriverdi G, Cengiz M, Eser M, Soner BC, Öktem G (2011). Doxorubicin Induced Nephrotoxicity: Protective Effect of Nicotinamide. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Cell Biology* doi:10.1155/2011/390238
133. Fahim MA, Kataya H, El-Kharrag R, Amer DAM, Al-Ramadi B, Karam SM (2011). Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin. *World J Gastroenterol* 7; 17(33): 3836-3841. doi:10.3748/wjg.v17.i33.3836
134. Lu CC, Meistrich ML (1979). Cytotoxic Effects of Chemotherapeutic Drugs on Mouse Testis Cells. *Cancer Res* 39: 3575-3582.
135. Sudha M, Kavimani S (2011). Protective effect of spirulina on doxorubicin induced testicular toxicity. *Res J Pharm Sci Biotech* 1(1):17-21.
136. Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi T, Nagamura Y (2001). Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J Toxicol Sci* 26(1): 51-9.

137. Samanta R, Zanetti, Eduardo N, Maldonado and Marta I. Aveldaño (2007). Doxorubicin Affects Testicular Lipids with Long-Chain (C18-C22) and Very Long-Chain (C24-C32) Polyunsaturated Fatty. *Cancer Res* 67: 6973-6980.
138. Vaisheva F, Delbes G, Hales B, Robaire B (2007). Effects of the Chemotherapeutic Agents for Non-HodgkinLymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (CHOP), on the Male Rat Reproductive System and Progeny Outcome. *Journal of Andrology* 28- 4.
139. Martinez J, Moreno JJ (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 59(7): 865-70.
140. Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM (2004). Resveratrol is a Peroxidase-mediated Inactivator of COX-1 but Not COX-2. *The Journal Of Biological Chemistry* 279(21): 22727–22737.
141. Seyma Hascalik, Onder Celik, Yusuf Turkoz, Mehmet Hascalik Yılmaz Cigremis Bulent Mizrak, Saim Yologlu (2004). Resveratrol, a Red Wine Constituent Polyphenol, Protects from Ischemia-Reperfusion Damage of the Ovaries *Gynecol Obstet Invest* 57:218–223 DOI: 10.1159/000076760
142. Altıok D, Altıok E, Bayraktar O, Funda F (2009). Stability of trans-Resveratrol Incorporated in Chitosan Microspheres. 14th National .
143. Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Duleba AJ (2010). Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. *Molecular Human Reproduction* Vol.16, No.4 pp. 251–259.
144. Amaratulli GF, Robertı M, Pizzirani D (2004). Antioxidant activity of hydroxystilbene derivatives in homogeneous solution. *J. Org. Chem* 69: 7101–7107.
145. Fremont L (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 14;66(8):663-73.
146. Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS (1996). Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J Chromatogr A* 12;730(1-2): 47-52.
147. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP (1996). Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React* 18: 67-71.
148. Belguendouz L, Fremont L, Linard A (1997). Resveratrol inhibits metal İon dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins, *Biochem Pharmacol* 53,1347-1355.

149. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N (2004). Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* 68, (6), 1113-1118.
150. Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT (1998). Interaction of trans resveratrol with plasma proteins, . *Biochemical Pharmacology* 55: 811-816.
151. Fremont L, Belguendouz L, Delpal S (1999). Antioxidant activity of resveratrol and alcohol free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* 64(26):2511-21
152. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341: 1103–1104.
153. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 18;47(3):549-55.
154. Juan ME, Gonza' lez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodri'guez-Gil JE, Planas JM (2005). Trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats. *J. Nutr* 135; 4: 757-760.
155. Akbay TT, Şehirli Ö, Ercan F, Şener G. J (2010). Resveratrol Protects Against Methotrexate-Induced Hepatic Injury in Rats. *Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspCanada.org) 13(2) 303 – 310.
156. Burkitt MJ, Duncan J (2000). Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxylradical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys* 381(2):253-63.
157. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Haris GK, Shi X (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Bioph Res Co* 309; (4):1017-102.
158. Olas B, Nowak P, Kolodziejczyk J, Ponczek M, Wachowicz B (2006). Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7; (2): 96-102.
159. Royshowdhury S, Wolf G, Keilhoff D, Bagchi D, Horn T (2001). Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stres. *Nitric Oxide* 5; 137-149.
160. Lee SR, Kwak JH, Kim HJ, Pyo S (2007). Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial

- damage in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett*,17; (7): 1879-1882.
161. Venturini CD, Merlo S, Souto AA, Fernandes Mda C, Gomez R, Rhoden CR (2010). Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxid Med Cell Longe* 3(6):434-41.
 162. AnekondanTS (2006). Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*,52; (2) :316-326.
 163. Chen CK, Pace-Asciak CR (1999). Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology: The Vascular System* 27, (2), 363-366.
 164. Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P (2002). The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 61, (2), 294-302.
 165. Kimura Y, Okuda H, Arichi S (1985). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 834: 275-278.
 166. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997). Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone? *Clins Biochem* 30: 91-113.
 167. Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G (2001). Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 21;70(1):81-96.
 168. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC (2001). Immunomodulatory activity of resveratrol: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cellmediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* 2: 1299 – 1308.
 169. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 421: 277–9.
 170. Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP (1999);. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 20–4.
 171. Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ (1999). Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* 140:1–10.
 172. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z (1999). Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* 20: 237–42.

173. Schneider Y, Vincent F, Duranton B, et al (2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 158: 85–91.
174. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z (2001). Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res* 61: 1604–10.
175. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 224: 274-283.
176. Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A (2001). Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *J Cardiovasc Pharmacol* 37(3):262-70.
177. Elmali N, Esenkaya I, Karadağ N, Taş F, Elmali N (2007). Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 13(4):274-80.
178. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci.* 82; (2): 614-619.
179. Demir R, Yilmazer S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 9-10.
180. Johnsen SG (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.
181. Oliveira Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MT, Peruquetti RL, Cedenho AP, 2010. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genet Mol Res* 9(3):1405-13.
182. Duru NK (1998). Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları, Ankara.
183. Semen Evaluation Erişim:<http://www.zdline.com/maklercc.htm>; Erişim tarihi: 02.04.2012
184. Trivedi P, Tripathi DN, Jena GB (2011). Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: Role of NFjB, p38 and caspase-3. *Food and Chemical Toxicology* 49: 838–847.
185. Potten CS, 1996. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 74(11):1743-8.

186. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271.
187. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497.
188. Aebi HE (1987): Catalase. In Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatics Analysis* 3: 273-285.
189. Afzal M, Afzal A, Jones A, Armstrong D (2002). A Rapid Method for the Quantification of GSH and GSSG in Biological Samples. *Methods in Molecular Biology* 186: 117-122.
190. Aebi DJ (1986): Glucose-6-phosphate Dehydrogenase: Bergmeyer, H. U (Ed.): *Methods of enzymatic analysis*, 2. Edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 190-196.
191. Aebi GU (1986): Sorbitol Dehydrogenase: Bergmeyer, H. U (Ed.): *Methods of enzymatic analysis*, 2. Edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 112-117.
192. Ölgün S, Bıçak I, Nebioğlu D (2002). Angiogenesis And New Aspects Of Cancer Chemotherapy. *J. Fac. Pharm*, 31 (3) 193-214, Ankara.
193. Meister LA, Meadows AT (1993). Late effects of childhood cancer therapy. *Curr Probl Prediatr* 23,102-131.
194. Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF (1991). The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 27: 532.
195. Kim JC, Kim KH, Chung MK (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 13: 391–7.
196. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, and Otlı A (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of betacarotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 92: 2028–2033.
197. Shetty G, Meistrich ML (2005). Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* 34: 36-9.
198. Jagetia GC, Jyothi P, Krishnamurthy H (1998). Effect of vindesine sulfate on the radiationinduced alterations in mouse spermatogenesis: a flow cytometric evaluation. *Mutat Res* 398: 163-74.

199. Imahie H, Adachi T, Nakagawa Y, Nagasaki T, Yamamura T, Hori M (1995). Effects of adriamycin, an anticancer drug showing testicular toxicity, on fertility in male rats. *J Toxicol Sci* 20(3): 183-93.
200. Ateşşahin A, Türk G, Karahan İ, Yılmaz S, Çeribaşı A.O, and Bulmuş Ö (2006). Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril* 85; 1: 1216-22.
201. Jung K, Reszka R (2001). Mitochondria as subcellular targets of clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 87-105.
202. Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P (2005a). Lipoic acid ameliorates adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reproductive Toxicology* 20: 111–116.
203. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC, Lee HW, Ting CT, Lee WL, Hung CJ, Wang KY, Lai HC and Lai HC (2009). A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *British Journal of Pharmacology* 156; 48–61.
204. Oktem G, Uysal A, Oralb O, Sezerc E, Olukmand M, Erole A, Akgure S, Bilir A (2010). Resveratrol attenuates dxorubicin-induced cellular damage by modulating nitric oxide and apoptosis. *Experimental and Toxicologic* 64(5):471-9.
205. Yıldırım A, Tunaoglu SF, Pınarlı FG, İlhan M, Oğuz A, Karadeniz C, Olguntürk R, Oğuz D, Kula S (2010). The role of dobutamine stress echocardiography in early diagnosis of cardiac toxicity in long-term survivors of asymptomatic children treated with anthracycline. *Anadolu Kardiyol. Derg* 10: 154-62.
206. Wang J, He D, Zhang Q, Han Y, Jin S, Qi F (2009). Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother Radiopharm* 24:675-80.
207. Endo F, Manabe F, Takeshima H, Akaza H (2003). Protecting spermatogonia from apoptosis induced by doxorubicine using the luteinizing hormone-releasing hormone analog leuporelin. *Int J Urol* 10: 72–7.
208. Prahalathan C, Selvakumar E, and Varalakshmi P, (2005b). Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clinica Chimica Acta* 360: 160–166.
209. Ceribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A (2011). Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol* Feb 2.

210. Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E (2000). Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: in vivo study. *Circulation* 102: 572–578.
211. Zhang J, Clark JR, Herman EH, Ferrans V (1996). Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneous hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF- 187. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1931±1943
212. Cece R, Cazzaniga S, Morelli D, Sfondrini L, Bignotto M, MeÂnard S, Colnaghi MI, Balsari A (1996). Apoptosis of hair follicle cells during doxorubicin-induced alopecia in rats. *Lab Invest* 75: 601±609.
213. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL (1997). Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature Med* 3: 1228±1232.
214. Yeh YC, Lai HC, Ting CT, Lee WL, Wang LC, Wang, KY, Lai HC, Liu TJ (2007). Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochemical Pharmacology* 74; 7: 969-980.
215. Matsui H, Toyoda K, Shinoda K, Okamiya H, Furukawa F, Kawanishi T, Takahashi M (1993). Quantitative histopathological study on the adriamycin testicular toxicity in rats. *Eisei Shikenjo Hokoku* 111:39-46.
216. Ozaki S, Ohkawa I, Katoh Y, Tajima T, Kimura M, Orikasa S (1988). Study on producing rats with experimental testicular dysfunction and effects of mecobalamin. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 91(4):197-207.
217. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO (2006). Protective role of lycopene on cisplatin induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 21: 42–7.
218. Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-31.
219. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J (2007). Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 12;117(1):6-15.
220. Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK (2002). The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British Journal of Pharmacology* 135:1627-1633.
221. Uguralp S, Usta U, Baykarbulut A (2005). Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 15(2):114-9.

222. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 3-4: 92-95.
223. Prahalathan C, Selvakumar E, and Varalakshmi P, (2004). Remedial effect of DL- α -lipoic acid against adriamycin induced testicular lipid peroxidation. Molecular and Cellular Biochemistry 267: 209–214.
224. Jow WW, Schleger PN, Chichon Z, Phillips D, Goldstein M, Bardin W(1993). Identification and localization of copper–zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. J Androl 14: 439–447.
225. Meister A (1983). Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. Biochem Soc Trans 11:793-4.
226. Eklow L, Moldeus P, Orrenius S (1984). Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reduction inhibitor 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Eur J Biochem 138: 459–463.
227. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, Forstermann U, Li H (2009). Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit. J Physiol Pharmacol 4:111-6.

10. 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 Doksorubisin İle Oluşturulmuş Deneysel Testis Hasarı Üzerine Resveratrolün Etkileri”
Çalışmacılar : Doç.Dr.Esin YULUĞ, Yük.Lis.Öğr.Sibel TÜREDİ, Doç.Dr.Ahmet ALVER
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2011/30	Etik Kurul Toplantı Tarihi 18.10.2011	Etik Kurul Toplantı No 2011/20	Etik Kurul Karar No 2
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında “Sıçanlarda Doksorubisin İle Oluşturulmuş Deneysel Testis Hasarı Üzerine Resveratrolün Etkileri” 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. (18.10.2011)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ ve KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No :
Soyadı, Adı : TÜREDİ Sibel
Uyruğu :T.C
Doğum tarihi ve yeri : Anamur-12/07/1983
Medeni hali :Bekar
Telefon : 05052521916
Faks : -
E-Posta : sibelturedi3361@hotmail.com
Yazışma adresi : KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2012
Lisans	: Çanakkale On sekiz Mart Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu	2004
Lise	: Anamur Lisesi	2000

AKADEMİK/ MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
-		

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

YAYINLAR/BİLDİRİLER

XI. Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 16-19 Mayıs 2012, Pamukkale Üniversitesi, Denizli-Türkiye – Sözlü Bildiri (S-26).

Sıçanlarda Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Testis Hasarı Üzerine Resveratrolün Etkileri

Effects of Resveratrol on Testicular Damage Experimentally Created with Doxorubicin in Rats

Sibel TÜREDİ, Esin YULUĞ, Ahmet ALVER, Ömer KUTLU

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

HOBİLER