T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

SİKLOFOSFAMİDİN NEDEN OLDUĞU TESTİS HASARINA KARŞI QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Duygu UZUN GÖREN

EDİRNE - 2021

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

SİKLOFOSFAMİDİN NEDEN OLDUĞU TESTİS HASARINA KARŞI QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Duygu UZUN GÖREN

Dstekleyen Kurum: TÜBAP-2017/79

Tez No:

EDİRNE - 2021

VII-KABUL VE ONAY ÖRNEĞİ

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ..... Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve ..... danışmanlığında doktora öğrencisi ..... tarafından tez başlığı **"**.....
.....
....." olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **…./…./…..** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Doktora Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Unvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. …….
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen, beni yetiştiren, tez çalışma süresince bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a, eğitim sürecinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN, Prof. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR ve Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e, çalışmalarım sırasında her konuda bana yardımcı ve destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesine olanak sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca eğitimim süresince, yetişmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen sevgili aileme, enerjileriyle bana destek olan sevgili eşime ve canım kızıma minnettarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 4

TESTİS GELİŞİMİ 4

TESTİSİN ANATOMİK VE HİSTOLOJİK YAPISI 9

GONADOTOKSİSİTE VE İNFERTİLİTE 18

SİKLOFOSFAMİD 19

HÜCRELER NASIL ÖLÜR? 23

QUERCETİN 25

NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B SİNYAL YOLAĞI 27

NÜKLEER FAKTÖR ERİTROİD-2 İLİŞKİLİ FAKTÖR 2 SİNYAL YOLAĞI ... 29

BCL-2-ASSOCİATED X PROTEİN (BAX) VE B-CELL LYMPHOMA-GENE 2 (BCL-2) YOLAĞI 33

GEREÇ VE YÖNTEMLER 36

BULGULAR 43

TARTIŞMA 91

SONUÇLAR 102

ÖZET 104

SUMMARY.....106
KAYNAKLAR.....108
ŞEKİLLER LİSTESİ.....122
ÖZGEÇMİŞ.....126
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AMH **:** Antimüllerian hormon

ARE **:** Antioxidant responsive element (antioksidan yanıt elemanı)

Bax **:** Bcl-2 associated X protein (Bcl-2 ilişkili X Protein)

Bcl-2 **:** B-cell lymphoma-2 (B hücreli lenfoma-2)

Bcl-3 **:** B-cell lymphoma 3 (B hücreli lenfoma-3)

BHA **:** Bütillenmiş hidroksianisol

CP **:** Cyclophosphamide (Siklofosfamid)

DAB **:** 3,3'diaminobenzidine

DGR : Glycine repeat domains (Glisin tekrar eden bölgeler)

DNA **:** Deoksiribonükleik Asit

FDA **:** United State Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

FSH **:** Folikül stimülan hormon

FGF9 **:** Fibroblast Growth Factor 9 (Fibroblast Büyüme Faktörü 9)

H&E **:** Hematoksilen ve Eozin

IkB **:** Inhibitory kappa B (İnhbitör kappa B)

IKK **:** IkB kinaz

IL-1 **:** Interlökin 1

IVR **:** Intervening region (Müdahale edici bölge)

ip. **:** İntraperitoneal

JAK **:** Janus kinaz

KEAP 1 **:** Kelch-like ECH associated protein 1 (Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1)

LH **:** Luteinizan hormon

LHX9 **:** LIM homeobox 9

MAPK **:** Mitogen activated protein kinase (Mitojenler tarafından aktive edilen kinazlar)

NFkB **:** Nuclear factor kappa B (Nükleer faktör kappa B)

Nrf2 **:** Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2)

PGH **:** Primordiyal germ hücresi

PPAR **:** Proliferatör ile aktifleştirilen reseptör AR

QRC **:** Quercetin

RIP1 **:** Reseptör etkileşimli protein 1

ROS **:** Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)

SRY **:** Sex determining region Y (Cinsiyet belirleyici gen bölgesi Y)

SF1 **:** Steroidojenik faktör 1

SOX9 **:** SRY-Box 9

STAT **:** Signal transducers and activators of transcription (Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri)

TDF **:** Testis determining factor (Testis belirleyici faktör)

TdT **:** Terminal deoksinükleotidil

TLRs **:** Toll-like receptors (Toll benzeri reseptörler)

TNF α **:** Tümör nekroz faktörü α

TUNEL **:** Terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling

WNT4 **:** Wingless-tipe MMTV integration site family 4

WT1 **:** Wilms'in tümör baskılayıcı geni

GİRİŞ VE AMAÇ

Siklofosfamid (CP), pek çok neoplastik ve otoimmün hastalığın tedavisinde ve organ transplantasyonunda immünsüpresif olarak yaygın bir şekilde kullanılan sitotoksik alkilleyici bir ajandır. Klinikte yaygın kullanıma sahip olan ilaç, hematolojik (akut-kronik lösemi, lenfoma, multipl myelom) ve solid (meme, over, testis, baş-boyun) tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (1-9).

Siklofosfamidin kemoterapötik bir ajan olarak kullanımını sınırlayan en önemli etken, antitümöral etkinliği ile tümör hücrelerini öldürmesinin yanı sıra özellikle testis, böbrek, karaciğer, kalp ve mesane olmak üzere pek çok organda toksik etki oluşturarak normal doku hasarına da sebep olmasıdır. Tümör hücre öldürücü etkinliği, DNA'yı alkilleyerek etki etmesi mekanizmasına dayanmaktadır (10,11). İlacın terapötik ve toksik etkileri, fosforamid hardalı ve akrolein adı verilen iki önemli aktif metaboliti sayesinde gerçekleşir. Antineoplastik etkileri daha çok fosforamid hardalı ile ilişkili halde iken, akrolein apoptozis, nekrozis, onkozis gibi hücre ölümü mekanizmaları ile ilişkilidir (11).

Terapötik etkinliğine rağmen, CP'nin genital sistem dahil olmak üzere pek çok sistem üzerindeki yan etkileri klinik ve deneysel çalışmalarda bildirilmektedir (12-14). Deneysel olarak CP tedavisi uygulanan sıçanlarda, sperm canlılığı, sayı ve hareketliliğinde azalma (15), seminal sıvı hacmi ve serum testosteron, folikül stimülan hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) düzeylerinde düşüşün yanı sıra (11,16), özellikle testis dokusunda spermatogenez sürecinde histopatolojik değişimler gözlenmiştir (4,5,10,11,13). Bu değişimler, seminifer tübüllerde tübül epitelinde dejenerayon, spermatogeneziste germinal hücre kayıpları ve lümene dökülmeleri, tübül epitelinde hücre vakuolizasyonu (5,10,11,15,17), interstisyel aralıkta Leydig hücre dejenerasyonu ve bazen hemoraji şeklindedir (18,19). Ayrıca bu

değişimlerin yanı sıra, vücut ağırlığı ve testis ağırlığında azalma da yapılan çalışmalarda ifade edilmektedir (4,20).

Siklofosfamid'in testiküler toksisitedeki etki mekanizması hala netlik kazanmamış olsa da, yapılan çalışmalara göre CP, dokudaki redoks dengesini bozarak oksidatif strese sebep olmak suretiyle etki etmektedir (4,6,21).

Oksidatif stres, erkek infertilitesinin etiyolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Hücre içi oksidasyondaki artış, testiküler fonksiyon kaybındaki en önemli etken olan testiküler stresi tetiklemektedir. Artan testiküler stres ise testiküler mikroçevreyi olumsuz etkileyerek kan akışını bozmakta ve endokrin sinyal iletimini olumsuz etkileyerek germ hücrelerinde apoptozis (programlı hücre ölümü) indüksiyonuna neden olmaktadır (11).

Yapılan bir çalışmada, CP'nin Bcl-2 ilişkili X Protein (Bcl-2 associated X protein, Bax) ve B hücreli lenfoma-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) mRNA ve protein ekspresyon oranlarını arttırarak apoptotik yolağın indüksiyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, çalışmada apoptotik indeks de değerlendirilmiş ve CP apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırmıştır (22).

Maremanda ve ark. (23)'nın yaptığı bir çalışmada, CP'nin nükleer faktör kappa B (Nuclear factor kappa B, NFkB) seviyesini arttırıp, nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) seviyesini azaltarak inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, CP'nin apoptotik hasara da neden olduğu bildirilmiştir (23).

Erkek genital sistem göz önüne alındığında, tüm bu etkilerin sonucunda ortaya çıkan en önemli klinik bulgu şüphesiz infertilitedir. İnfertiliteye çözüm yolları üretebilmek için geçmiş yıllarda yapılan pek çok çalışmada CP'nin antioksidan savunma sistemini bozarak oksidatif strese yol açması ile testiste oluşan hasara karşı çeşitli antioksidan maddeler kullanılarak bu hasarlar önlenmeye ya da azaltılmaya çalışılmıştır (4,5,15,17,24-26).

Quercetin (QRC), fenolik bileşenlerden oluşan bitkilerden elde edilen ve pek çok besin kaynağında bulunan, flavonoid grubu üyelerinden biridir (27,28). Antioksidan (29), antiapoptotik, antiinflamatuvar (30), antitümoral (31), antiviral (32), antiiskemik (33), ve antiallerjenik (34) özellikleri bildirilmiştir.

Polifenol yapısında güçlü bir antioksidan etkinliğe sahip olan QRC, hücre içinde reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS)'nin şekillenmesini engellemekte, bu sayede hücreyi lipit peroksidasyonuna karşı koruyarak oksidatif stres ve apoptozis gibi etkilerin önüne geçmektedir (29,35).

Khorsandi ve ark. (36), titanyum dioksit nanopartiküllerine karşı QRC'nin koruyucu etkisini değerlendirdikleri çalışmada, QRC'nin ön tedavi olarak uygulanmasının testis dokusundaki oksidatif stresi azalttığını bildirmişlerdir. Yapılan deneysel çalışmalarda, oksidatif stres sebebiyle doku hasarı oluşturan pekçok ajana karşı, QRC'nin koruyucu etki göstererek biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerde iyileşme sağladığı ifade edilmektedir (27,37-41).

Yaptığımız literatür taramasında CP'nin neden olduğu testis doku hasarına karşı, QRC'nin antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak; CP'nin neden olduğu testis hasarı üzerine QRC'nin olası koruyucu etkisinin incelendiği çalışmamızın, özellikle morfolojik, morfometrik, hormonal ve immünohistokimyasal düzeyde araştırılarak literatüre ve dolayısıyla hasar nedeniyle erkekte ortaya çıkabilecek infertilitenin önlenmesine/azaltılmasına yönelik katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

GENEL BİLGİLER

TESTİS GELİŞİMİ

Embriyonun genetik ve kromozomal olarak cinsiyeti, oositin döllenmesini sağlayan spermin taşıdığı kromozom özelliklerine (X veya Y) bağlıysa da erkek ve dişi embriyo gelişiminde morfolojik değişimler, embriyonal gelişimin 7. haftasından itibaren ortaya çıkar. Genital sistemi oluşturan primordiyal yapılar her iki cinste de birbirine benzerlik gösterir. Bu yüzden embriyonal gelişimin ilk 7 haftası "farklanmamış dönem" olarak isimlendirilirken, ortaya çıkan pirimitif gonadlar "farklanmamış gonadlar" olarak tanımlanırlar (42).

Her iki cinsiyettede gonadlar, posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel, altında yer alan mezenkimal doku ve primordiyal germ hücreleri (PGH)'nden köken alırlar (42,43). Gonadal yapılanma ve farklılaşma süreci, mezodermal epitel proliferasyonu ve altında yer alan mezenkimal dokunun yoğunlaşmasıyla "gonadal kabartı" adı verilen bir çift kabartının oluşmasıyla başlar (44,45). Embriyonal gelişimin yaklaşık 5. haftası civarı oluşan gonadal kabartılar mezonefrozun medialinde şekillenir. Yüzeyde yer alan epitel parmaksı uzantılar halini alarak gonadal kordonları oluştururlar ve iç kısımdaki mezenkim içlerine doğru büyürler. Bu aşamada gonad, içte medulla dışta korteks olarak organize olmuş durumdadır. Eğer embriyo XY seks kromozom kompleksine sahipse, gonad testis olarak farklanacak ve içteki medulla testiküler kordonlara dönüşürken dıştaki korteks büyük ölçüde dejenere olacaktır (42,43).

Primordiyal germ hücreleri, farklı kaynaklarda ufak farklılıklar olmasıyla birlikte ortalama olarak gestasyonun 4. hafta başlarında ekstraembriyonik mezoderm kaynaklı yolk kesesi duvarında özellikle, allantoisin başlangıç bölümüne yakın ve endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar (Şekil 1) (42,44,45). 4.-6. haftalar arasında bu hücreler,

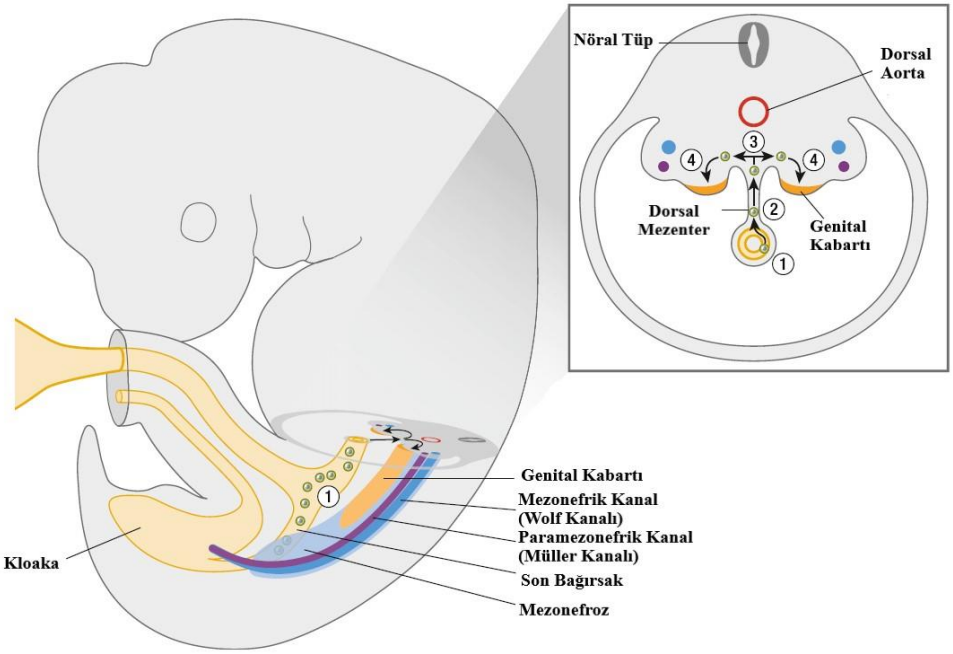
gestasyonunda sağladığı embriyonel katlanmalar sırasında umblikal kordun dorsal bölümünün vücut içine alınmasıyla, önce primitif barsağa, oradan primitif barsak mezenteri yoluyla dorsal vücut duvarına ve ardından 5. hafta civarında gonadal kabartılara göç ederler (42-44) (Şekil 1). PGH'leri bu göç yolculukları boyunca art arda mitotik bölünmeler geçirmeye devam ederler. Bazı PGHler ise, göç sırasında ekstragonadal bölümlerde dinlenmeye uğrayarak oldukları yerde kalabilirler ve teratom olarak adlandırılan bir tümör türüne neden olabilirler (44).

Primordiyal germ hücreleri, çeşitli şekillerde göç eder ve her göç basamağı farklı mekanizmalarla düzenlenir. Gelişme sırasında PGH'ler aktif ve pasif bir dizi mekanizma ile ekstraembriyonik bölgeden son bağırsak epiteli aracılığıyla genital kabartılara doğru çoklu geçitlerin sayesinde göç ederler. Bu germ hücreleri epitel benzeri bir hücre şeklinde ortak aktif göç mekanizmaları ile kontrol edilir. Bununla birlikte diğer gelişim evrelerinde bu hücre göçü, barsak endodermal morfogenezi ve lümen sıvısı akışı ile pasif taşıma gibi diğer mekanizmaları takip ederek göç yolunu tamamlar. Yolk kesesinden endoderm epiteline aktif olarak yönelen PGH'ler, sonbarsak morfogenezi ile pasif hareket ettirilirler. Devamında, genital kabartılara doğru aktif hareket eden hücreler, testis inişi sırasında pasif olarak göç ederler ve son olarak gonad hücrelerinin bazal membrana doğru göçü ile gelecekteki sperm üretiminden sorumlu olan seminifer tübülleri şekillendirmiş olurlar (46) (Şekil 2A).

Cinsiyet farklanması pek çok genin görev aldığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Kromozomal ve genetik cinsiyet tayini, fertilizasyon sırasında sekonder oositi dölleyen spermin X veya Y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir (47,48). Erkek fenotipinin ortaya çıkması için gerekli olan Y kromozomudur (42). Embriyo genetik açıdan erkekse, primordiyal germ hücreleri XY cinsiyet kromozomuna sahiptir. Y kromozomunun kısa kolunda yerleşen ve testis belirleyici faktörü (testis determining factor, TDF) kodlayan cinsiyet belirleyici gen bölgesi (Sex determining region Y, SRY) geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları şeklinde testis olarak farklanır (42,43,45,49,50).

Testiküler farklılaşma TDF tarafından sağlanmaktadır. Bu faktörün etkisiyle, gonadal kordonlar testis kordonları (seminiferöz tübül primordiyumu) olarak şekillenir. Erkeklerde SRY ekspresyonu, SRY-Box 9 (SOX9)'u aktive ederken dişi gelişimini sağlayan Wingless-tipe MMTV integration site family 4 (WNT4) ekspresyonunu inhibe etmesidir ve SOX9 ve Fibroblast Büyüme Faktörü 9 (Fibroblast Growth Factor 9, FGF9) gen ekspresyonlarının bu primitif kordonların oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (42,43,45). Yapılan çalışmalar, insanlarda kendiliğinden mutasyon, delesyon, duplikasyon veya translokasyonların

gerçekleşmesiyle ya da transgenlerin farelere transfer edilmesiyle, sadece bir SRY veya SOX9 geninin bir XX embriyosunda testis gelişimini indüklemek için yeterli olduğunu göstermiştir. SOX gen ailesi içerisinde özellikle SOX10 ve SOX3, insanlarda görülen 46 XX ovotestiküler sendromu ile ilişkilendirilmiştir (49).



Şekil 1. Primordiyal germ hücrelerinin göçü ve gonadal kabartılara yerleşimi. 5. ve 6. hafta boyunca yolk kesesinin allantoise yakın yerinden primordiyal germ hücrelerinin (yeşil noktalar) göçü görülmektedir. Gonadal kabartıların bulunduğu transvers kesitte primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartıya ulaşması izlenmektedir (49).

Birkaç transkripsiyon faktörü de SRY ifadesinde yer almıştır. NR5A1 olarak da bilinen Steroidojenik faktör 1 (SF1), ekspresyonu sölomik epitelde başlayan ve hem destekleyici hem de steroidojenik hücrelerde devam eden bir nükleer reseptör transkripsiyon faktörüdür (43,50). LIM homeobox 9 (LHX9) ifadesi de önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve LHX9 geninden yoksun farelerin, SF1 ekspresyonunda önemli bir azalma sergilediği ve gonadal agenezisi gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, Wilms'in tümör baskılayıcı gen 1 (WT1)'i ise SF1 düzenlenmesini sağlayan bir transkripsiyon faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır ve gonad oluşumunda etkilidir. DAX1 geni ise, bir nükleer reseptör olan Dax-1'in kodlanmasından sorumlu gen olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu reseptörün aktivasyonu SRY genini baskılayarak doza duyarlı cinsiyet dönüşümü ve adrenal hipoplazi nedeni olmaktadır (50).

Fetal dönemde oluşan testislerin ürettiği testosteron, dihidrotestosteron ve antimüllerian hormon (AMH) 7. haftadan itibaren erkek embriyo gelişiminin belirlenmesinde etkindir. Y kromozomu yokluğu testis yerine yaklaşık 12. hafta civarı over gelişimi ile sonuçlanır (42,47). Anormal cinsiyet kromozomu taşıyan embriyolarda fazladan bulunan X kromozomunun cinsiyetin belirlenmesinde bir önemi yoktur. Erkek cinsiyet gelişimi için gerekli olan Y kromozomu varlığıdır ve XXY kromozomlu bir embriyo da erkek olarak gelişim gösterir (47).

Gelişen embriyo genetik olarak erkek ise, primordiyal germ hücreleri XY cinsiyet kromozomuna sahiptir ve testis belirleyici faktörü kodlayan SRY geninin etkisiyle primitif cinsiyet kordonları meduller sahada testis, seminiferöz ya da meduller kordonları oluştururlar. Bu kordonlar, hücrelerin proliferasyonuyla medulla derinlerine doğru çoğalarak devam eder. Hilus bölgesinde birbirleriyle anastomozlar yaparak rete testis tübüllerini oluşturacak olan hücre dizileri halinde dağılırlar. İlerleyen evrelerde, yoğun fibröz bir bağ doku tabakası olan tunika albuginea gelişerek oluşan testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır. Tunika albuginea gelişimiyle testis genişleyerek karakteristik görünümüne daha yakın hale gelir (Şekil 2B). Genişleyen testis kademeli olarak mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorşiyum ile asılı olarak varlığını sürdürür (42,45,47) (Şekil 2A-B).

Testis kordonlarından seminifer tübüller, tübüli rekti ve rete testis şekillenecektir (42). Dördüncü ay civarı, atnalı şekline benzemeye başlayan testis kordonlarının açık uçları rete testis ile devamlılık gösterir (45).

Testis tübülleri, puberteye kadar lümen bulundurmaksızın solid halde bulunurlar. Puberte ile birlikte testis tübüllerinde lümen oluşumu görülür. Bu aşamadan itibaren seminifer tübül adını alırlar ve devamında kanalize olan diğer boşaltım kanallaryla devamlılık gösterirler (47) (Şekil 2A-B).

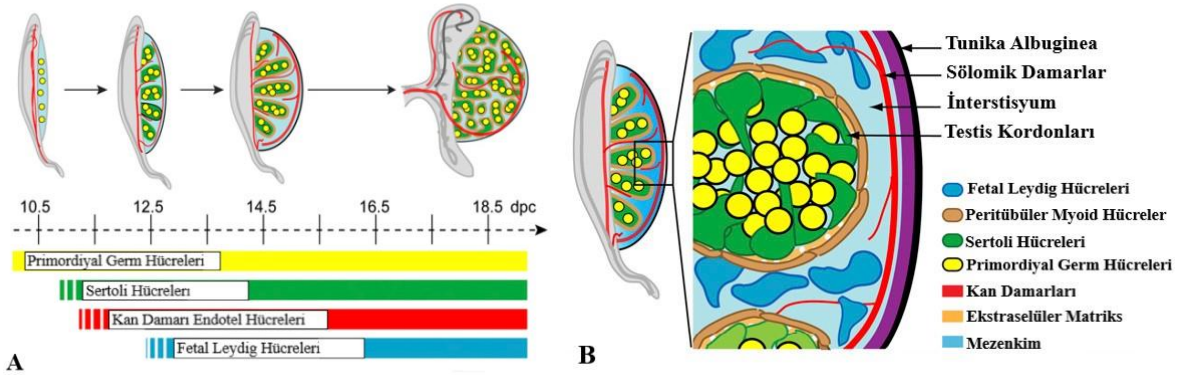
Fetal testiste çoğunluğu oluşturan hücreler Sertoli hücreleridir. Ayrıca, glikoprotein karakterli bir hormon olan AMH, testis tübüllerinde yerleşim gösteren Sertoli hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Hormonun üretimi puberteye kadar sürer sonra seviyesi azalır. AMH'ın varlığı, dişi genital organları olan uterus ve tuba utarinaların geliştiği paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılamaktadır (51).

Testis kordonları arasındaki mezenkimal doku içerisinde Leydig hücreleri de yer almaktadır (47). 8. haftadan itibaren androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenedion, Leydig hücreleri tarafından salgılanmaya başlar. Salgılanan bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital yapılanmasının maskülen yönde farklanmasında etkilidir. Sertoli

hücrelerinin ürettiği AMH ile birlikte erkek cinsiyet karakterinin gelişmesinde etki gösterirler (42).

Testis gelişiminin son aşamasında ise, yassılaşan yüzey epiteli yetişkin testislerde yüzeyi döşeyen tek katlı mezotele farklanır (47).

Testisin devamında gelişen genital kanallar ise, gelişimin ilk 6 haftası boyunca hem dişi hem de erkek embriyoda, bir çift mezonefrik kanallar ve onların yanında bir çift olarak yer alan paramezonefrik kanallar (Müller kanalları) olarak varlığını gösterir (45).



Şekil 2. A. Testis organogenezisi sırasında hücre farklılaşmalarının şematize gösterimi. B. Fetal testis organizasyonu (52).

Testislerin Skrotuma İnişi

Testis taslakları intrauterin yaşamın başlarında L3-5 vertebra seviyesinde, böbreğin hemen alt kısmında yer alır (53) ve embriyonal gelişimde ikinci ayın sonlarına doğru mezonefroz ve testisler karın arka duvarına ürogenital mezenterle asılı olarak karın boşluğu içinde bulunurlar. Mezonefrozun gerilemesiyle birlikte bu yapı sadece gonadın mezenteri haline gelir ve kaudal kısmı kaudal genital ligament olarak bilinir (45). Testis gelişimi sırasında, kaudal kutbundan çıkan ve ekstraselüler matriksten zengin, yoğun mezenkimal bir yapı olan gubernakulum, testis inişi öncesi internal ve eksternal abdominal kasların arasında sonlanırken, testis inişinin başlamasıyla birlikte inguinal bölgeden skrotal şişkinliğe doğru büyümeye başlar (53).

İntraabdominal testis göçünün, gubernakulumun ekstraabdominal parçasının uzamasıyla gerçekleştiği, organogenez ile birlikte organlardaki büyümenin intraabdominal basıncı arttırarak inguinal kanaldan geçişini sağladığı ifade edilmektedir (45,48). Ayrıca androjen ve insüline-like peptide 3 (INSL3) sinyal yollarının gubernakulum gelişimine primer etki ederek testislerin inişini sağladığı yapılan rodent çalışmalarında gösterilmiştir (49,54). Embriyogenez sırasında Leydig hücreleri tarafından yapılan ve salgılanan INSL3, dolaşıma katılarak gubernakular hücreler üzerindeki reseptörüne (relaxin family receptor 2, RXFP2) bağlanır

(54). Gubernakulumun retraksiyonuyla birlikte, testisler abdominal lokasyonundan skrotuma göç ederler. Farelerde INSL3 ve RXFP2 homozigot delesyonlarında gubarnakular eksiklik nedeniyle bilateral testislerin abdominal pozisyonda kaldıkları bildirilmiştir (54). İnsanlarda da benzeri mekanizma ile INSL3, testis inişinde muhtemelen rol almaktadır. Azalmış INSL3 düzeyleri konjenital inmemiş testislerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, INSL3 veya reseptör gen mutasyonları bu hastalarda oldukça nadir görülmektedir (49).

Normal şartlarda testisler, yaklaşık olarak gestasyonun 12. haftasında inguinal bölgeye gelir, inguinal kanaldan 28. haftada geçerek skrotuma 33. hafta civarı ulaşmaktadırlar (45). Bu süreçte androjenler ile birlikte çeşitli hormonlar rol oynamaktadır (45,55). İniş sırasında testisler ana boşaltıcı kanallar olan duktus deferens beraberinde kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinirleri de beraberinde getirmektedir (48).

Bazı durumlarda testis inişi obstrüksiyona uğrayarak kriptoşidizm de denilen inmemiş testis ile sonuçlanabilmektedir. Miadında doğanlarda % 1-4 arasında görülürken, prematüre bebeklerde bu oran % 1-45 arasında değişebilmektedir (54). Kriptorşidizm tedavi edilmezse, inguinal kanal ve abdominal kavitedeki skrotuma oranla daha yüksek olan ısı dolayısıyla spermatogenez etkilenerek semen kalitesinin bozulması sonucu infertilite ve germ hücreli tümör görülme riski ortaya çıkar (53,56,57).

TESTİSİN ANATOMİK VE HİSTOLOJİK YAPISI

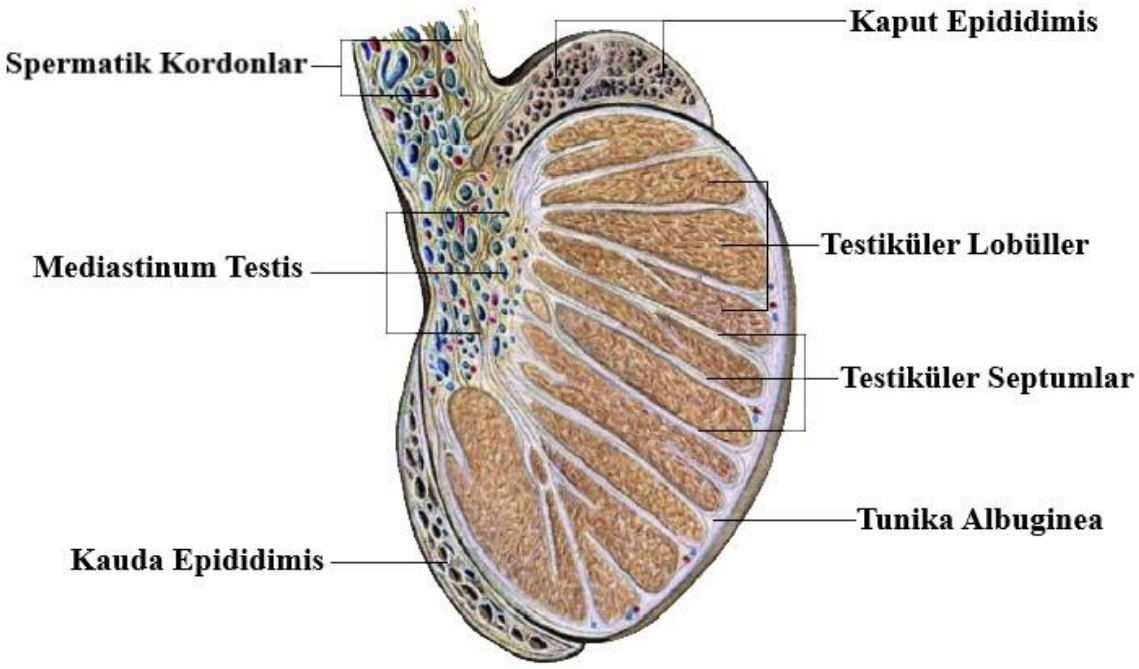
Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi; üreme hücrelerinin üretiminden sorumlu olan testisler, üretilen üreme hücrelerinin iletimini sağlayan iletici yollar (tubuli rekti, rete tstis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus) ve yardımcı üreme bezleri (seminal vezikül, prostat, bulboüretral bezler) olmak üzere üç bölümden oluşur. Kopulasyon organı olan penise uzanan iletici bölüme yardımcı üreme bezleri açılmaktadır (58-60).

Testisler, erkekte sperm ve testosteron üretimini sağlayan temel üreme organıdır (55) ve skrotum içerisinde yer alırlar. Oval şekilli, yanlardan basık, kuş yumurtasını andıran bir görünüme sahiptirler. Büyüklükleri herbiri 2,5x3x5 cm boyutlarında 10-15 g ağırlığında çift olarak bulunurlar (61-63). Testisler erkek üreme hücreleri olan spermatozoonların ve erkek seks hormonları olan androjenlerin üretiminden sorumludurlar. İki yüzü (facies lateralis ve medialis), iki kenarı (margo anterior ve posterior) ve iki ucu (etremitas superior ve inferior) bulunur. Sol testis sağ testise göre 1cm daha aşağıda bulunur. Bunun sebebi, kan stazı nedeni ile sol testisin daha ağır olmasıdır (61,62).

Skotum perinede yer alan ve içinde hem testisleri hem de epididimleri barındıran kutanöz fibromusküler bir torba şeklindedir. Tesislerin inişi ve skrotum içinde yer almaları normal fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için oldukça önemlidir. Çünkü, testislerin vücut ısısından daha düşük bir ısıya ihtiyaçları vardır ve skrotum yapısal özellikleriyle (derisinde yer alan bol miktardaki ter bezleri, diğer katmanlarındaki kas lifleri) ile düşük ısıyı (34-35 ^{0}C) sağlar (64).

Testisler tunika albuginea adı verilen kalın bir kapsül ile çevrelenmiştir. Bu kapsül, arka kenarından testisin içerisine girerek mediastinum testis'i oluşturur. Mediastinum testis hem testise giriş ve çıkış yapan damarları, hem rete testisi, hem de gönderdiği bölmelerle testisi sayıları 250-300 arasında değişen lobçuklara böler. Bu lobçuklarda sayıları 1-4 arası değişebilen ve total testis dokusunda sayıları yaklaşık 1000 kadar olan seminifer tübüller bulunur (59,61-63). Testiste seminifer tübüller arasında gevşek bağ dokusu yerleşim gösterir ve interstisyel doku olarak da isimlendirilir. Bu bağ doku içerisinde testosteron üretimi yapan Leydig hücreleri bulunur (59,61). Seminifer tübüller mediastinum testise uzanırlar ve bu bölgede düz tübüller olan tübüli rekti'yi ve rete testis'i oluşururlar. Devamında, sayıları kaynaklarda farklılıklar gösterebilen (6-20 arası) duktuli efferentes bulunur (61-63) (Şekil 3).



Şekil 3. Testisin anatomik yapısı (65).

Testisler abdominal aortadan çıkan testiküler arterler ile kanlandırılır. Testislerin venöz kanı sağda v. cava inferior, solda v. renalis ve o da v. cava inferior'e dökülür. İnnervasyonu otonom sinirlerle olmaktadır (61).

Testis Histolojisi

Skrotum içinde bulunan testisler histolojik olarak 3 katmanlı bir kapsül ile çevrelenmiştir.

Tunika vajinalis, testislerin karın boşluğundan skrotuma inişleri sırasında sürükledikleri iki katlı periton tabakasıdır. Anterolateral yüzeyde yer alır ve mezotel ile döşenmiştir.

Tunika albuginea, kapsülün en belirgin ve en kalın tabakasıdır ve yoğun bir fibroelastik bağ dokudan oluşur. Testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Testise giriş çıkış yapan an damarları, lenf damarları ve kanallar bu tabaka içinde ilerler.

Tunika vasküloza, damardan zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır ve en içte yer alır (66,67).

Testis fonksiyonel birimleri, seminifer tübüller ile interstisyel dokuda yer alan ve androjen salgılayan Leydig hücreleridir (48).

Testis hacminin çok büyük bir kısmını oluşturan seminifer tübüller, yaklaşık olarak ortalama 30-80 cm uzunluğunda, 150-250 µm kalınlığında kıvrımlı kanallardır (66). Her bir seminifer tübül, germinal veya spermatogenik epitel olarak isimlendirilen özelleşmiş çok katlı epitel ile döşelidir. Fibröz bir bağ doku katmanı ile çevrili olan epitelin bazal membranı en içte yer alan miyoid hücreler ile komşuluk halindedir. Bu hücreler düz kas özelliği taşıyan hücrelerdir ve tübüllerin zayıf bir şekilde kasılmalarını sağlar (48,63,66).

Germinal epitel iki tip hücreden oluşmaktadır;

- destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da isimlendirilebilen, oldukça büyük olan ve bölünmeyen hücreler olan Sertoli hücreleri,
- düzenli olarak çoğalan, bölünebilen ve olgun spermin oluşumunu sağlayan spermatogenik seri hücreleri (48,59,68).

Sertoli hücreleri: Bölünme özelliği olmayan hücrelerdir. Puberteye kadar çoğalırlar puberte sonrası bölünme olmaz. Komşu spermatogenik seri hücrelerini çevrelerler, beslenmesini korunmasını ve desteklenmesini sağlarlar. Ayrıca onların arasındaki boşlukları doldururlar ve yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip hücrelerdir. Tübüllerin yapısal düzenini sağlayan hücrelerdir ve kendi aralarında sıkı bağlantı komplekslerine sahiptirler. Bu

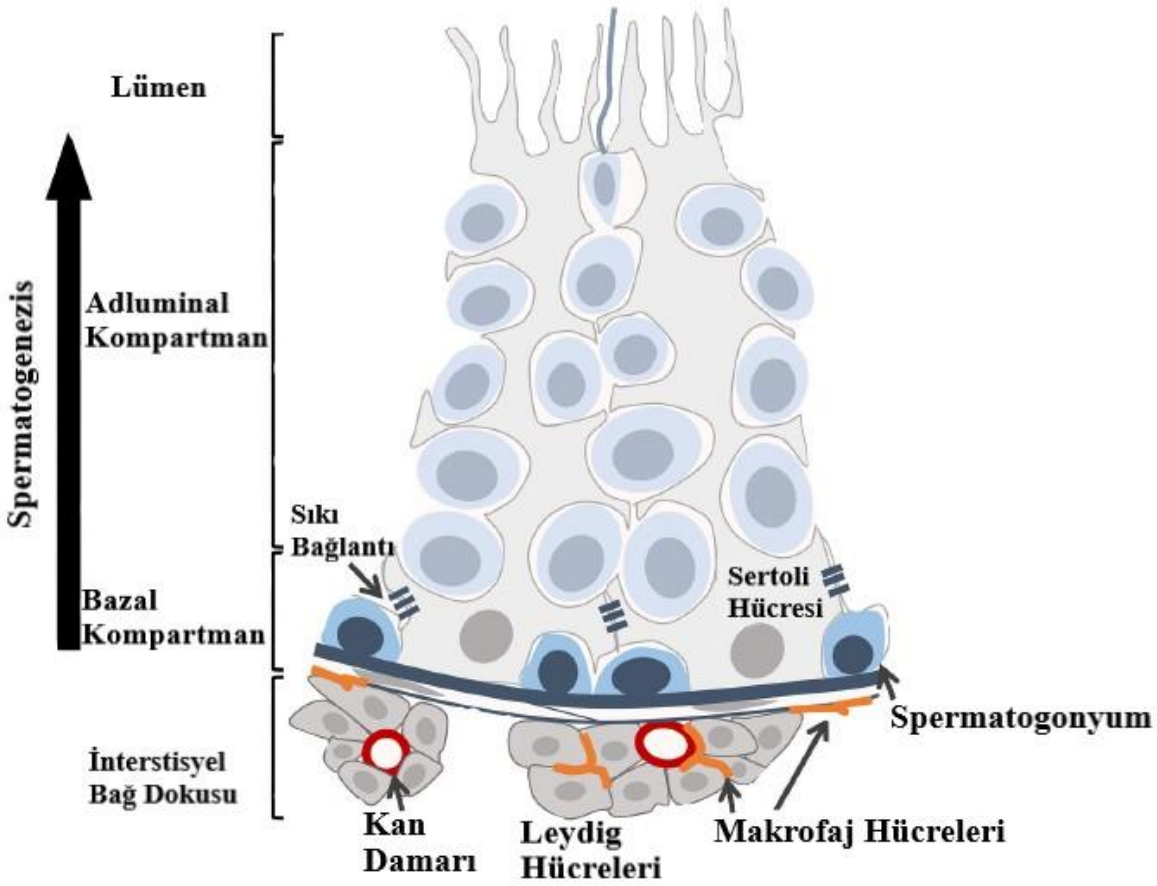
bağlantılar ile kan testis bariyerini oluştururlar (Şekil 4). Bağlantıların alt kısmında yerleşen spermatogenik hücreler olgunlaşırken bu bağlantı bölgelerini aşmak zorundadırlar (48,66).

Sertoli hücrelerinin görevleri özetle aşağıdaki şekildedir,

- Spermatogenik hücrelerin desteklenmesini, beslemesini ve korunmasını sağlarlar,
- Sperm taşınmasını sağlayan sıvı salgılanmasından sorumludurlar,
- Sperm sitoplazmasının bir kısmını fagosite ederek ortadan kaldırırlar,
- Gelişimleri normal ilerlememiş olan spermatogenik hücreleri fagosite ederler,
- Androjen bağlayan protein, inhibin, plazminojen aktivator ve transferrin salgılarlar,
- Erkek fetusta Müller kanalının gerilemesinden sorumlu olan AMH üretiminden sorumludurlar,
- Kan-testis bariyerini oluştururlar (64,66).

Germ hücreleri, spermatogenez boyunca tübül lümenine doğru ilerleyerek farklılaşırken, Sertoli ve germ hücreleri arasında bağlantı kompleksleri görülür. Gelişiminin farklı aşamalarındaki spermatogenik germ hücreleri desmozom benzeri bağlantı birimleri ve aktin bazlı hücre birleşimleri yoluyla Sertoli hücreleri ile stabil bir şekilde farklılaşma ve olgunlaşma süreci boyunca bağlı kalır. Henüz olgunlaşmamış germ hücrelerinin Sertoli hücrelerine bağlanmaması immatür germ hücrelerinin lümene bırakılmasına ve dolayısıyla infertiliteye yol açabilecek bir tablodur (69).

Spermatogenik seri hücreleri: sayıları dört ile sekiz arasında değişim gösterebilen kümeleşmiş hücre katmanlarından oluşurlar ve ilerleyen safhalarda sperm hücrelerini oluştururlar (59) (Şekil 4). Olgun bir spermin oluşumu çeşitli kaynaklara göre terimsel değişiklik göstermekle birlikte spermatogenez ve spermiyogenez olmak üzere birbirini takip eden iki süreç ile gerçekleşir (59,66). Bazı kaynaklar ise spermatogenezi spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı (spermiyogenez) olmak üzere üç aşamalı olarak açıklar (48,64).



Şekil 4. Seminifer epitelin şematik diyagramı (70).

Spermatogenez

Spermatogenez genel anlamda spermatogonyumdan spermin gelişmesi sürecidir (Şekil 5). Puberte öncesi dönemde gonadotropin seviyelerinin artışıyla birlikte spermatogenez başlar ve yaşam boyu devam eder. Puberte döneminin başlamasıyla kök ve progenitör hücreler olan spermetogonyumlar prolifere olmaya başlarlar (spermatogonyal faz) (59). Bu mitotik bölünmelerle primer spermatositler oluşur. Primer spermatositler iki mayotik bölünme geçirerek kromozom ve DNA miktarlarının azaltırlar spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar (spermatosit fazı). Son olarak spermatidler olgun sperm hücresine dönüşüm süreci geçirerek sperm olarak şekillenirler (spermatid fazı-spermiyogenez) (48,64).

Spermatogonyal faz: Kök hücre kaynağını oluşturan hücrelerin hem kendi yerlerine kalacak rezerv hücreleri hem de spermiyum oluşumunu sağlayacak olan spermatogonyumların üretiminin gerçekleştiği süreçtir (48) (Şekil 5).

Spermatogonyumlar bazal membran ile direkt ilişki içinde olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Bu hücreler Sertoli hücrelerinin tıkayıcı bağlantıları altında kalırlar. Dolayısıyla kan testis bariyerinin dışında yer almaktadırlar (64). Spermatogonyal kök hücrelerden köken alırlar puberte ile birlikte mitotik bölünmeler geçirmeye başlarlar (48,64,68). Özellikle rutin hematoksilen ve eozin (H&E) preparatlarında gösterdikleri morfolojik nükleer görünümlerinde bazı farklılıklar görülmektedir (68). Bu farklılıkların farklı spermatogonyal soyları temsil ettiği düşünülmektedir. Nükleer görünümlerine göre 3 tip spermatogonyum ifade edilir: Tip A koyu spermatogonyum, tip A açık spermatogonyum ve tip B spermatogonyum (48,59,64,66).

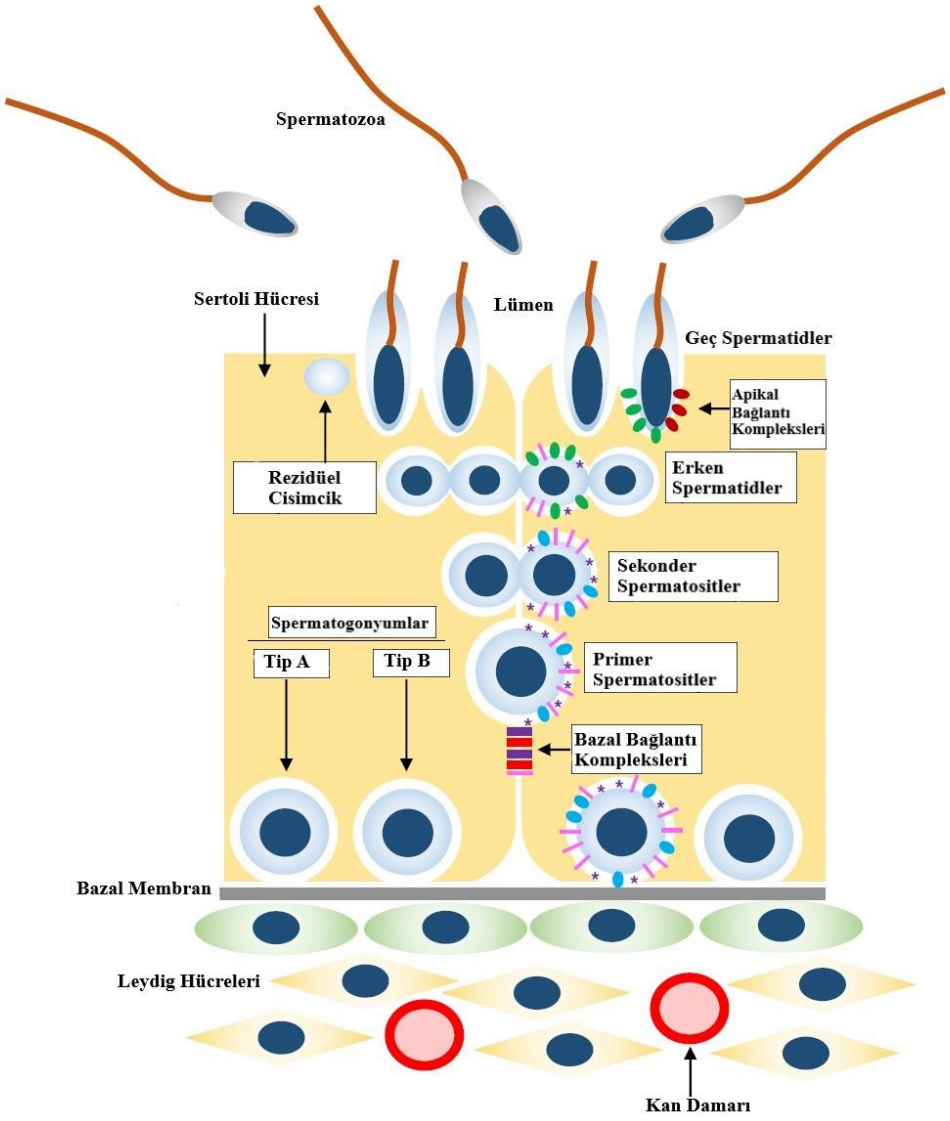
Tip A koyu spermatogonyumlar, yoğun bazofilik boyanma gösteren, ince granüler kromatin içeren oval nükleuslu hücrelerdir. Tip A koyu spermatogonyumların, semininfer epitel için kök hücre kaynağı oluşturduğu düşünülmektedir. Düzenli olmayan aralıklarla mitotik olarak bölünerek ya kök hücre olarak kalmakta ya da tip A açık spermatogonyumları oluşturmaktadırlar (48,64,66,68).

Tip A açık spermatogonyumlar, yine ince granüllü kromatine sahip fakat nükleer olarak açık renkli boyanan hücrelerdir. Bu hücreler sperm üretimine indüklenmiş hücrelerdir ve farklılaşıp çoğalarak sonunda spermiyum haline geleceklerdir. Ardışık mitotoik bölünmelerle sayılarını arttırırlar. Sonunda tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar (48,59,66,68).

Tip B spermatogonyumlar, kromatin materyali nükleer kılıf boyunca ve nükleolus çevresinde geniş kümeler oluşturarak yoğunlaşmış yuvarlak nükleuslu hücrelerdir. Tip B spermatogonyumların görülmesi spermatogonyal fazın son olayı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hücreler primer spermatositleri oluşturmak üzere bölünmeye giderler (48,59,64,66).

Tip A açık spermatogonyumların arasında bulunan sitoplazmik köprüler devam eden mitoz ve mayoz bölünmelerde de varlıklarını sürdürürler. Bu sayede spermatid oluşumunun son aşamalarına kadar hücreler birbirleriyle bağlantılarını sürdürürler (66,68) (Şekil 5).

Spermatosit fazı: Primer spermatositlerin mayoz bölünme geçirerek hem kromozom sayılarını hem de DNA miktarlarını azalttıkları süreçtir. Tip A spermatogonyumların mitotik bölünmeleriyle ortaya çıkan tip B spermatogonyumlar, mitotik bölünmeleri devam ettirirler ve primer spermatositleri üretirler. Primer spermatositler, oluşumlarının ardından DNA replikasyonunu gerçekleştirir ve mayoz bölünmeye hazır hale gelirler. Primer spermatositlerin her biri, normal sayıda kromozom (2n) ve normalin iki katı miktarda DNA (4d) içerir (48).



Şekil 5. Spermatogenik seri hücrelerinin şematik gösterimi (71).

Mayoz I, 2n miktardaki kromozom sayısını n'ye indirirken, 4d miktarındaki DNA'yı ise 2d'ye düşürür. Bu durumda oluşan sekonder spermatosit haploid kromozom sayısında (n) ve 2d miktarında DNA içerir. Mayoz II başlangıcında DNA replikasyonu gerçekleşmediği için, bu bölünme sonunda oluşan herbir spermatid n kromozoma ve d miktarında DNA'ya sahip olmaktadır (48,64,66).

Birinci mayoz bölünme ile ortaya çıkan sekonder spermatositler çok geçmeden 2. mayoz bölünmeye devam ettikleri için kesitlerde çok fazla izlenmezler. Primer spermatositlere kıyasla nisbeten daha küçük hücreler olup, DNA sentezine girmeksizin 2.mayoz bölünmeyle spermatidleri oluştururlar. Bu hücreler insanlarda 22 otozom ve bir seks

kromozomu (X veya Y) olmak üzere 23 kromozom (n) ve normalin yarısı kadar DNA içerirler (66).

Spermatid fazı (Spermiyogenez): Bir önceki fazda oluşan spermatidlerin olgun sperm hücresine farklılaştıkları süreçtir. Erken safhalarda yuvarlak şekilli olan spermatid spermiyogenez süreci sonunda hareketli olan spermiyuma dönüşür (68). Bu süreçte Sertoli hücreleri de aktif rol oynamaktadır. Spermiyogenezin son aşamalarında, spermatidler baş bölümleri Sertoli hücrelerinin sitoplazmasına gömülü olarak bulunurlar (48,64,66).

Spermiyogenez dört aşamada incelenir:

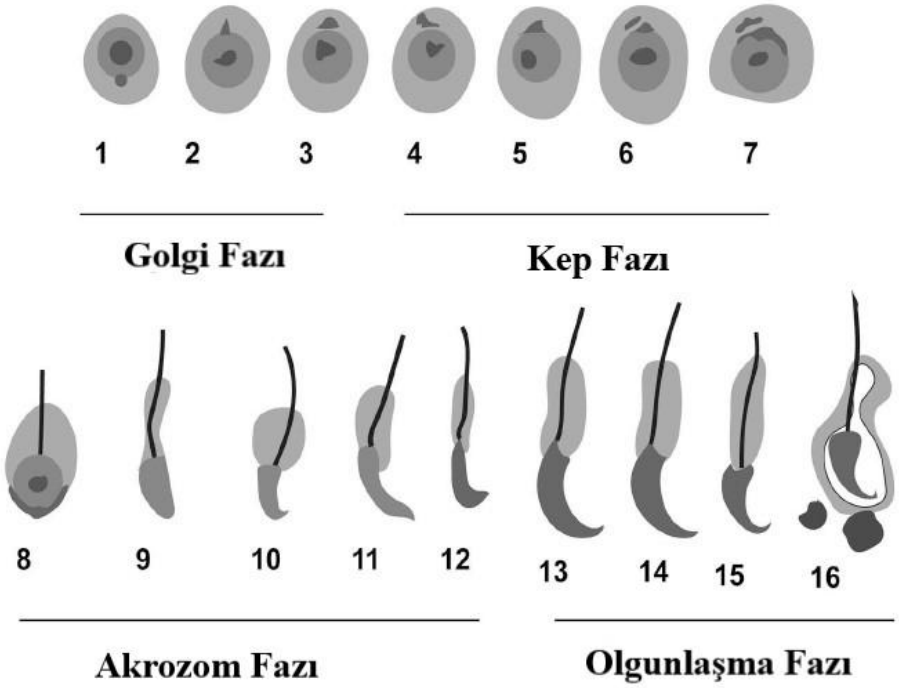
Golgi Fazı: Spermatid sitoplazmasında çok sayıda Golgi kompleksinin bulunduğu bölgede PAS (+) granüllerinin varlığı ile karekterizedir. Bu granüllere proakrozomal vezikül adı verilir ve glikoproteince zengin içeriğe sahiptir. Akrozomal veziükülün olduğu saha spermiyumun ön kutbunu belirlemektedir. Arka kutupta ise ise olgun sentriyol plazma membranına dik açı yaparak hizalanır. Sentriyol sperm kuyruğundaki aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübülün parçalarının biraraya gelmesini sağlamaktadır (48,64,66).

Kep Fazı: Bu aşamada akrozomal vezikül nükleusun ön bölümünde genişleyerek bir şapka gibi nükleusu kaplar. Bu yeni yapıya akrozomal kep adı verilir. Nükleus membranının bu bölüme bakan yüzünde porlar kaybolur ve membran kalınlaşır. Nükleer içerik artık daha yoğun haldedir (48,66).

Akrozom Fazı: Spermatid kendini yeniden hizalar. Spermiyum başı Sertoli hücresinin sitoplazmasının derinlerine gömülü haldedir. Kuyruk bölümümde flagellum iyice belirginleşir, yoğunlaşan nükleus yassılaşarak uzar. Akrozomal vezikül akrozom adını alarak apikal plazma membranına çok yakın konum alır. Sitoplazmadaki mikrotübüller akrozomdan spermatidin arka kutbuna doğru uzanarak silindirik kılıf ya da manşeti oluşturur. Ayrıca sentriyollerden kaynaklanan 9 adet kalın fibril aksonemin mikrotübülleri dışında dış kalın lifleri oluşturur. Liflerin başlangıç bölümü bağlayıcı parça adını alır (66). Tüm bunlar gerçekleşirken hücre membranı kuyruk yüzeyini de kaplamak üzere arkaya doğru uzar, manşet ortadan kalkar. Boyun bölümünde mitokondriyonlar fibrillerin etrafında heliks şeklinde dizilim gösterirler ve kuyruğun orta parçasını oluştururlar. Orta parçanın bitiminde fibröz bir kılıf, esas parçanın longitudinal liflerini çevreler ve bu saha esas parça adını alır. Bu fibröz kılıf flagellumun ucuna kadar uzanır (48,64). Esas parçanın distalinde yerleşen ve aksonem mikrotübüllerini içeren son ve kısa olan bölüm ise son parça olarak adlandırılır (66).

Olgunlaşma Fazı: Şekillenen spermiyum, flagellum etrafındaki fazla sitoplazmadan bu evrede kurtulur. Fazla sitoplazmanın olduğu bölümler boğumlanarak spermiyumdan ayrılır, Sertoli hücreleri ise bu parçaları fagosite ederek ortadan kaldırır. Spermatidler arasındaki bağlantılar ortadan kalkar ve Sertoli hücrelerinden ayrılan spermiyumlar lümene düşerler. Hücrelerin morfolojik değişimleri sırasıyla Şekil 6'da gösterilmiştir (48,64,66).

Spermatogenez sonunda spermatidler, olgunlaşma süreçlerini tamamlarlar ve spermiasyon adı verilen bir aşama ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine bırakılırlar. Burada Sertoli-spermatid bağlantı kompleksleri ortadan kaldırılır ve spermatidler Sertoli hücrelerinden ayrılırlar. Bu bağlantılarda β1 integrinlerin bulunmasının yanında, integrin bağlı kinazların aktivite artışları ve enzimatik reaksiyonların etkili olduğu düşünülmektedir (48).



Şekil 6. Spermiyogenezin şematik diyagramı (72).

Testis İnterstisyumu

Semininfer tübüller arasında interstisyel bağ doku çok sayıda kan ve lenf damarları içeren gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Bağ dokuya ait fibroblast, mast hücresi ve makrofaj gibi pek çok hücrenin bulunmasının yanısıra, Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) adı verilen ve testosteron üretiminden sorumlu endokrin fonksiyonlu hücreler de bu bağ doku içinde bulunurlar (48,66). Büyük poligonal şekilli asidofilik karakterli olan bu hücreler steroid hormon üreten hücreler olmaları dolayısıyla sitoplazmalarında bol miktarda lipid damlacıkları

içerirler. Ayrıca lipofuksin pigmenti ve çubuk şekilli sitoplazmik kristaller olan Reinke kristalleri sıklıkla gözlemlenmektedir (48).

Sertoli hücrelerinin ilk farklılaşmasından sonra, Leydig hücreleri interstisyel bağ doku içinde farklılaşmaya başlar (73). Yapılan kantitatif çalışmalar, 19 günlük fetal sıçan testislerinde Leydig hücrelerinin bolluğunu, doğum sonrası yaşamın 4. gününe kadar sayıları keskin bir şekilde azalttığını ve ardından yaşamın üçüncü haftasında doğum sonrası Leydig hücrelerinin hızlı bir şekilde geliştiğini ortaya koymuştur (74).

GONADOTOKSİSİTE VE İNFERTİLİTE

İnfertilite, dünyadaki çiftlerin yaklaşık olarak % 15'ini etkileyen önemli bir sorundur ve infertilite vakalarının yaklaşık yarısı erkek birey kaynaklıdır. Erkek infertilitesine, spermatogenezde başarısızlık, sperm taşınımındaki bozukluklar veya aksesuar bezlerde genel işlev bozuklukları neden olabilmektedir (22). Bu işlevsel bozukluklukların sebeplerine bakıldığında genetik faktörlerin yanı sıra; sıcaklık, geçirilen viral hastalıklar, spermatik kordon torsiyonları, varikosel, kriptorşidizm, testiküler tümörler ve tedavi amaçlı kullanılan ilaçların yüksek doz ve uzun süreli kullanımları olduğu görülmektedir. Bunların sonucunda testis doku harabiyeti ortaya çıkmaktadır. Tedavi amaçlı alınan ve gonadotoksisiteye sebep olan ilaçlara bakıldığında belirgin olarak, kanser kemoterapilerinde kullanılan ilaçlar olduğu görülmektedir. Tüm bunların sonucu olarak spermatogenik defekt, erkek infertilitesinin primer sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır (64).

Spermatogenez, karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir, üç ana faz içerir: Mitotik, mayotik ve postmayotik fazlar. Spermatogenik hücrenin apoptozisi, göç ve farklılaşma gibi diğer hücresel olaylar da spermatogenez sürecinde hayati rol oynar. Hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki dinamik denge, testisin seminifer tübüllerindeki hücrelerin sayısını belirler. Aşırı apoptozis sperm üretiminin tükenmesine neden olur. Tüm spermatogenez süreci ayrıca, testosteronun androjen reseptörüne bağlanarak spermatogenezi düzenlemede hayati bir rol oynadığı bir dizi hormon tarafından kontrol edilir. Spermatogenez süreçlerinde testosteron veya androjen reseptörünün olmaması, testosteronun etkilerini zayıflatacak ve spermatogenezin işlev bozukluğu ile sonuçlanacaktır (22).

Gonadal toksisite, çeşitli malign hastalıkların kemoterapi tedavisinde karşılaşılan ciddi bir problemdir. Tanı teknolojisinin ve tedavinin gelişmesiyle birlikte, son yıllarda birçok malign hastanın hayatta kalma oranı hızla artmıştır. Fakat hayatta kalanların karşı karşıya kalmaları gereken bir sonraki olumsuz durum kemoterapinin neden olduğu infertilitedir. Bu

problem, bu hastalar için büyük fiziksel ve duygusal baskıya yol açabilir ve daha sonra aile yaşamlarını da büyük ölçüde etkileyebilir. CP, antitümöral özelliği bilinen, alkilleyici kemoterapötik bir madde olarak kullanılmaktadır (15). Önceki çalışmalar CP uygulamasının testosteron sentezini engelleyebileceğini göstermiştir (22). Yine yapılan deneysel hayvan çalışmalarında, CP'nin testis ağırlığında azalmaya, geçici oligospermiye, spermatogonyumlarda DNA sentezinde ve spermatidlerde protein sentezinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (15).

Tüm bu nedenler, CP'nin sebep olduğu gonadotoksisiteye çözüm arayışına gidilmesine ve alternatif koruyucu mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapılması ihtiyacını doğurmuştur.

Antikanser İlaçlar

Günümüzde pek çok kanser türü için tek başına kemoterapi ya da kemoterapi-cerrahi veya kemoterapi-radyoterapi kombinasyonlarıyla yüksek başarılı tedavi oranları elde edilebilmektedir. Vücuda ait normal bir hücre ile kanser hücresini birbirinden ayıran spesifik bir özellik bulunmamasına karşın, bazı metabolik, genetik, kinetik ve membran farklılıkları ayırt edilebilmektedir. Bu ilaçların hedefi, mümkün olabildiğince seçici olarak tümör hücrelerini öldürmektir (selektif sitotoksisite). Ancak henüz tam manasıyla selektif etki oluşturabilen bir antikanser ilaç bulunamamıştır (75). Ne yazık ki, sitotoksik antikanser ilaçlar kanserli hücre yanında normal hücrelerde de az ya da çok toksik etki göstermektedir ve bu konuda güncel çalışmalar devam etmektedir (76,77). Dolayısıyla normal hücreye en az toksisite oluşturan kematerapötik ilaç en ideal ilaçtır.

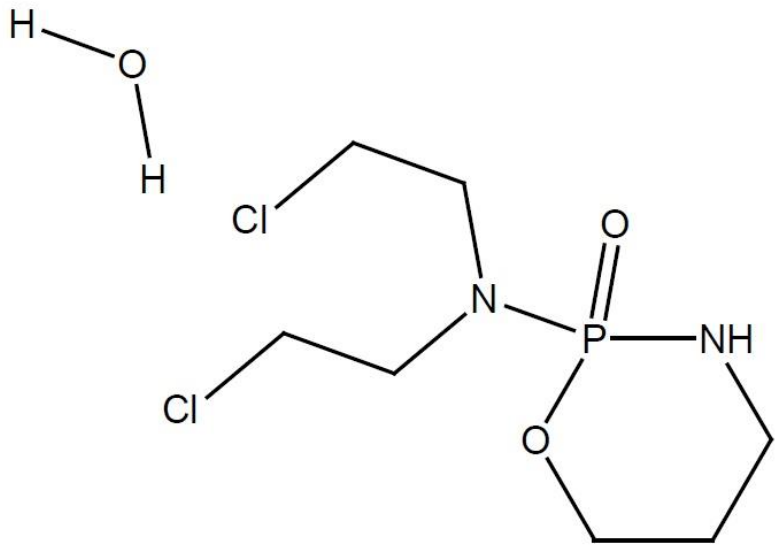
Proliferasyon aşamasındaki tümör hücrelerine, bu ilaçların etki yerleri bilinmektedir ve ilaçların buna göre bir sınıflandırması yapılabilmektedir. Bununla birlikte son zamanlarda hücre kinetiği gelişmeleri de kanser terapisi için faydalı olmuştur. İlaçların, hücre siklusunda hangi aşamada etki ettiklerinin tespit edilmiş olması, kanser terapisinde oldukça önemlidir. Siklus bağımlı olan ilaçlar sadece siklus aşamasında etki gösterirken, faz bağımlı ya da döneme özgü olarak ifade edilen grup ise, sadece siklusun özel bir fazında (G1,G2,S,M) hücreyi etkilerler ve siklus non-spesifik ajanlar olarak ifade edilirler (75,78).

SİKLOFOSFAMİD

Siklofosfamid, sitotoksik alkilleyici antikanser bir ajan olarak bilinmektedir (23). İlk olarak 1958 yılında Arnold ve Bourseaux tarafından elde edilmiştir. (79). Siklofosfamid

monohidratın moleküler formülü $C_7H_{15}Cl_{12}N_2O_2P.H_20$ ve sistematik adı 2- [bis (2 kloroetil) amino] tetrahidro-2H-1,3,2-oksazafosforin 2-oksit monohidrattır (80) (Şekil 7). Kanser tedavisi için ilk klinik CP denemeleri 1958'de yapılmıştır ve 1959'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (United State Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanan sekizinci sitotoksik antikanser ajanı olarak kabul edilmiştir (81).

Klinikte yaygın kullanıma sahip olan ilaç, çoğunlukla hematolojik (akut ve kronik lösemi, lenfoma, multipl myelom) ve solid (meme, over, testis, baş-boyun) tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun dışında güçlü immünosupresif özelliği sayesinde organ transplantasyonlarında doku reddini önlemek amacıyla ve romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (1-5,82).



Şekil 7. Siklofosfamidin kimyasal yapısı (80).

Çeşitli kaynaklarda alkilleyici ajanlar arasında en sık tercih edilen ilaç olarak ifade edilmektedir. Hem intravenöz hem de oral yoldan verilebilmektedir. Karaciğerde etkin metabolitine (fosforamid hardalına) dönüşerek etkinlik kazanır (82). Sitokrom P-400'lerin karaciğer mikrozomal sistemi tarafından aktif 4-hidroksisiklo-fosfamide dönüştürülerek etki gösterir (83). Oral kullanımda absorbsiyonu tamdır ve vücutta iyi dağılır. Yaklaşık %14 kadarı idrarla değişmeden çıkar. Neoplastik dokuda diğerlerinden daha çok bulunduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (79).

Siklofosfamidin kemoterapötik bir ajan olarak kullanımını sınırlayan en önemli etken, antitümöral etkinliği ile tümör hücrelerini öldürmesinin yanı sıra özellikle testis, böbrek,

karaciğer, kalp ve mesane olmak üzere pek çok organda toksik etki oluşturarak normal doku hasarına da sebep olmasıdır (10,11). CP, siklus bağımlı olmayan alkilleyici bir ajandır. Bölünme evresindeki hücrelere karşı belirgin bir etki gösterir ve aynı zamanda dinlenme halindeki hücreleri de alkilleyebilir (78). Tümör hücre öldürücü etkinliği, DNA'yı alkilleyerek etki etmesi mekanizmasına dayanmaktadır (10,11).

Siklofosfamidin terapötik ve toksik etkileri, fosforamid hardalı ve akrolein adı verilen iki önemli aktif metaboliti sayesinde gerçekleşir. Fosforamid hardalı, DNA'ya geri dönüşümsüz olarak bağlanarak DNA kırıklarına, DNA sentezinde aksamalara ve sonunda hücre ölümüne neden olan pozitif yüklü reaktif bir ara maddenin şekillenmesi yolu ile etkinleşir. Akrolein ise, DNA tamir proteinlerinin inaktivasyonunu sağlayarak hücresel toksisitede kısmen görev alır. Antineoplastik etkileri daha çok fosforamid hardalı ile ilişkili halde iken, akrolein; apoptozis, nekrozis, onkozis gibi hücre ölümü mekanizmaları ile ilişkilidir (11).

İlacın terapötik etkinliğine rağmen genital sistem de dahil olmak üzere pek çok sistem üzerindeki yan etkileri klinik ve deneysel çalışmalarda bildirilmektedir. Deneysel CP tedavisi uygulanan erkek ratlarda, sperm canlılığı, sayı ve hareketliliğinde azalma (15), seminal sıvı hacmi ve serum testosteron, folikül stimülan hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) düzeylerinde düşüşün (11) yanı sıra, özellikle testis dokusunda spermatogenez sürecinde histopatolojik değişimler gözlenmiştir (4,5,10,11). Bu değişimler, seminifer tübüllerde tübül epitelinde dejenerasyon, spermatogeneziste germinal hücre kayıpları ve lümene dökülmeleri, tübül epitelinde hücre vakuolizasyonu (5,17) ve interstisyel aralıkta Leydig hücre dejenerasyonu ve bazen hemoraji şeklindedir (18,19). Sertoli hücre kültürü ile ultrastrüktürel düzeyde yapılan bir çalışmada ise, CP uygulanan Sertoli hücrelerinde mitokondriyal şişkinlik, sitoplazma ve nükleusta yoğunlaşma, nükleer parçalanma ve nükleer vakuolizasyon gözlenmiştir (21). Ayrıca bu değişimlerin yanı sıra, vücut ağırlığı ve testis ağırlığında azalma da yapılan çalışmalarda ifade edilmektedir (4).

Siklofosfamidin testiküler toksisitedeki etki mekanizması hala netlik kazanmamış olsa bile, yapılan çalışmalara göre CP, dokudaki oksidasyon-antioksidasyon dengesini bozarak oksidatif strese sebep olmak suretiyle etki etmektedir (4,6,21). CP ile indüklenen testis toksisitesinde rol oynadığı düşünülen diğer patogenetik mekanizmalar arasında spermatogonyumlarda DNA sentezinde aksamalar, spermatidde azalmış protein sentezi, apoptozis ve sperm fonksiyon bozukluğu ve ilgili yolakların aktivasyonudur (6).

Maremanda ve ark.'nın (23) 2014 yılında yaptıkları çalışmada CP'nin neden olduğu testiküler hasar üzerine çinko uygulamasının etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, antikanser tedavisi sırasında çinko takviyesinin, oksidatif stres ile ilişkili tedavinin yan etkilerini azaltmada potansiyel olarak faydalı olabileceği bildirilmiştir.

Birçok antikanser ajanın etki mekanizmaları hakkında günümüze kadar yapılan çalışmalarla pek çok edinilmiş bilgi olmasına rağmen, bu hedeflerle etkileşimin nasıl ani veya nihai hücre ölümüne yol açıyor olduğu henüz net olarak belli değildir. Son zamanlarda, çeşitli antikanser ilaçların, "programlanmış hücre ölümü" olarak ifade edilen bir terim olan apoptozis özelliklerine sahip bir hücre ölümü modunu indükleyebileceği öne sürülmüştür (84).

Oksidatif stres tıp alanında ve redoks biyolojisinde bir kavram olarak 1985 yılında ifade edilmiştir. Oksidatif stres, serbest radikallerin ve reaktif metabolitlerin veya ROS üretimi ile bu metabolitlerin antioksidanlar gibi koruyucu mekanizmalar yoluyla elimine edilmesi arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanır. Bu dengesizlik tüm organizma üzerinde potansiyel bir etkiye sahip hücrelerin ve önemli hayati biyomoleküllerin zarar görmesine neden olur (85).

Normal bir hücresel metabolizma ürünü olan ROS, hücre içi ve dışı çevre koşullarındaki değişikliklere cevaben, hücrelerde sinyal yolaklarının uyarılmasında yaşamsal rol bir oynar. Çoğu ROS, hücrelerdeki mitokondriyal solunum zinciri tarafından üretilir. Endojen metabolik reaksiyonlar sırasında aerobik hücreler, moleküler oksijenin biyolojik indirgenmesinin normal ürünleri olarak, süperoksit anyonu (O_2), hidrojen peroksit (H_20_2), hidroksil radikali (OH) ve organik peroksit gibi ROS üretir. ROS üretimi kapasite eşiğinin üstüne çıkarsa, bu reaktif türler hedef hücre içi olmayan bileşiklerle kontrolsüz reaksiyonları tetikler, böylece nükleik asitleri, proteinleri, hücre zarı ve diğer lipitleri okside eder. Proteinler ve lipitler ayrıca oksidatif atak için önemli hedeflerdir ve bu moleküllerin modifikasyonu mutagenez riskini artırabilir. Artan ROS seviyeleri oksidatif strese neden olur ve bu yağlara, proteinlere ve DNA'ya ciddi şekilde zarar verir (85).

Oksidatif stres, NFkB, AP-1 aktivatör proteini 1, p53, HIF-hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α, peroksizom proliferatör ile aktifleştirilen reseptör AR (PPAR) nükleer faktör kappa hafif zincir geliştiricisi dâhil çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir. -γ, β-katenin / Wnt ve Nrf2 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, 500'den fazla farklı genin ekspresyonuna yol açabilir. Hücresel radikal temizleme sistemlerinin kapasitesini aşan suprafizyolojik seviyeler oksidatif strese neden olabilir ve proinflamatuvar yolları aktive edebilir. ROS, endotel disfonksiyonuna ve ardından aterosklerotik lezyonların oluşumuna

katkıda bulunur. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, antioksidanlar, şelatörler veya antioksidanlarla yapılan çeşitli tedaviler ve enzimlerin ROS aracılı hasarı önleyebileceğini öne sürmektedir (85).

Oksidatif stres, erkek infertilitesinin etiyolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Hücre düzeyinde görülen peroksidatif hasar, testiküler stresin oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan testiküler fonksiyondaki bozukluğun bir numaralı sebebidir. Oksidasyondaki artış, testiküler fonksiyon kaybındaki en önemli etken olan testiküler stresi tetiklemektedir. Artan testiküler stres ise testiküler mikroçevreyi olumsuz etkileyerek kan akışı ve endokrin sinyal iletimini olumsuz etkileyerek germ hücrelerinde apoptozis indüksiyonuna neden olmaktadır (11).

HÜCRELER NASIL ÖLÜR?

Birkaç hücre ölümü modu tanımlanmıştır. İlk önce Kerr ve ark. (86) tarafından özetlenen apoptozis, morfolojik olarak hücre büzülmesi ve özellikle epitel hücrelerinde hücre-hücre arasındaki etkileşim kaybıyla bir hücrenin komşularından izole edilmesi ile tanımlanan bir terim olarak gündeme gelmiştir (84,87,88). Nekrozun tam aksine apoptozis, genetik olarak düzenlendiği düşünülen termodinamik olarak yukarı yönlü devam eden bir süreçtir. Nekroz ise termodinamik olarak aşağı yönlü bir süreç olarak karşımıza çıkar. Hücrenin dış ortamındaki fizyolojik olmayan uç noktalar (örneğin, hipertermi ve hipoksi) ve yüksek miktarda toksik madde, membran bütünlüğünde progresif bir kayba, hücresel homeostazın çökmesine ve ATP seviyelerinin azalmasına neden olur. ATP'deki beklenmedik ani bir düşüş, hücrenin çalışmasını sağlayan moleküler altyapının ölümcül bir şekilde bozulmasında neden olur. Hücre, yakın bölgedeki bir inflamatuvar reaksiyona aracılık eden bozucu lizozomal enzimleri açığa çıkarmak için parçalanır. Bu genetik olarak yönlendirilmiş bir süreç değildir (84).

Apoptoz ve Hücre Morfolojisi

Işık ve elektron mikroskobik inceleme sayesinde apoptozis sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikler belirlenebilmektedir. Apoptozisin erken döneminde hücre büzülmesi ve piknoz ışık mikroskobu ile görülebilir. Hücre büzülmesinde, hücreler daha küçüktür, sitoplazma yoğundur ve organeller daha sıkı paketlenir. Piknotik görünüm, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve apoptozisin en karakteristik özelliğidir. H&E boya ile yapılan histolojik incelemede apoptozis, tek tek veya küçük hücre kümeleri içeren sahalar olarak izlenir. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazmaya ve yoğun mor nükleer

kromatin fragmanlarına sahip yuvarlak veya oval şekilde görünür. Elektron mikroskobunda, daha büyük büyütmelerde subselüler değişiklikler daha ayrıntılı incelenebilmektedir. Kromatin yoğunlaşma evresinin başlarında, elektron yoğun nükleer kromatin materyali karakteristik olarak nükleer zarın altında periferik olarak kümelenme gösterir (48,89).

Yoğun plazma zarı tomurcuklanma göstererek apoptotik cisim (body) olarak adlandırılan yapıları oluşturur. Apoptotik cisimler, nükleer bir parçası olan veya olmayan, sıkı şekilde paketlenmiş organelleri olan sitoplazma parçacılarından oluşur. Organel bütünlüğü hala korunur ve bunların tümü sağlam bir plazma zarı içine alınır. Bu parçacıklar daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve fagolizozomlar içine hapsedilir. Esasen apoptozis süreci veya apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması ile ilişkili inflamasyon tepkisi yoktur, çünkü:

(1) Apoptotik hücreler çevreleyen interstisyel dokuya hücresel bileşenlerini serbest bırakmazlar;

(2) Çevreleyen hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagositoz olduklarından, muhtemelen sekonder nekrozu önlerler;

(3) Yuvarlanan hücreler, antiinflamatuvar sitokinler üretmez (89).

Nekroz

Nekrotik hücre ölümü genellikle kimyasal stres, hipoksi, iskemi, hipoglisemi ve aşırı sıcaklık değişikliklerine cevap olarak ortaya çıkar. Uyarıcıya bakmaksızın nekrotik hücre ölümündeki genel etkenler kalsiyum ve ROS'tur. Nekroz sırasında, yüksek sitozolik kalsiyum seviyeleri tipik olarak mitokondriyal kalsiyumun aşırı yüklenmesine ve proteazların ve fosfolipazların aktivasyonuna yol açar. ROS, lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verir ve sonuç olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, iyon dengesi disregülasyonu ve membran bütünlüğü kaybıyla sonuçlanır (48).

Mitokondriyon, esas olarak solunum zincirinin I ve III komplekslerinde üretilen ROS'un ana hücre içi kaynağıdır. Mitokondriyal ROS birikimi reseptör etkileşimli protein 1 (RIP1)'e bağlıdır ve lipofilik ROS temizleyici bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve kompleks I inhibitörleri tarafından bloke edilebilir. Bu nedenle, RIP1'in doğrudan veya dolaylı olarak mitokondriyonu hedef alması düşünülebilir. Aslında, TNF stimülasyonunun RIP1'in mitokondriyona lokalizasyonuna yol açtığı ve ANT ve CypD arasındaki etkileşimi azalttığı ve ATP tükenmesi ve nekrozun indüklenmesiyle sonuçlandığı gösterilmiştir (90).

Nekroz, akut yaralanmadan dolayı hücrelerin kontrolsüz olarak ölümleri olarak nitelendirimektedir. Hücrenin nekroz ile ölümü akut yaralanma sonucu kontrolsüz hücre parçalanmasını temsil etmektedir. Bu programlı hücresel bir yanıt olarak da karşımıza çıkabilmektedir. Kontrolsüz nekrozun aksine, kontrollü nekrotik hücre ölümü tipi (nekroptoz) enfeksiyon veya DNA hasarı gibi uyaranlara karşı programlı bir yanıt olarak başlatılır. Bu koşullar altında, eğer apoptozis oluşmaz ise nekroptoz hücre ölümü için alternatif bir yol sağlar (88).

İnflamasyon

İnflamasyon, dokular patojen, hasar veya zararlı uyaranlar tarafından enfekte edildiğinde veya yaralandığında meydana gelen karmaşık bir işlemdir. İnflamasyonun amacı hücresel hasarın nedenlerini sınırlandırmak ve ortadan kaldırmak, nekrotik hücreleri ve dokuları temizlemek ve/veya absorbe etmek ve doku onarımını başlatmaktır. Patolojik inflamatuvar süreçte mast hücreleri, monositler, makrofajlar, lenfositler ve diğer immün hücreler ilk önce aktive edilir. Daha sonra bu hücreler, DNA dâhil olmak üzere birçok makromoleküllere zarar veren ROS oluşmasıyla sonuçlanan yaralanma bölgesine toplanırlar. Eş zamanlı olarak, bu inflamatuvar hücreler sitokinler, kemokinler ve prostaglandinler gibi büyük miktarlarda inflamatuvar maddeleri üretmektedir. Bu aracı maddeler lokalize iltihaplanma bölgelerine makrofajları çağırırlar ve çoklu sinyal iletimi basamaklarını ve iltihaplanma ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini doğrudan aktive ederler. NFkB, MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) ve JAK (janus kinaz) -STAT (Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri) sinyal yolakları klasik inflamasyon yolunun geliştirilmesinde rol oynamaktadır (91).

Erkek genital sistem göz önüne alındığında, doku hasarı, biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerin bozulmasıyla ortaya çıkan en önemli klinik bulgu şüphesiz infertilitedir. İnfertiliteye çözüm yolları üretebilmek için geçmiş yıllarda yapılan pek çok çalışmada CP'nin antioksidan savunma sistemini bozarak oksidatif strese yol açması ile testiste oluşan hasara karşı çeşitli antioksidan maddeler kullanılarak bu hasarlar önlenmeye ya da azaltılmaya çalışılmıştır (24,76).

QUERCETİN

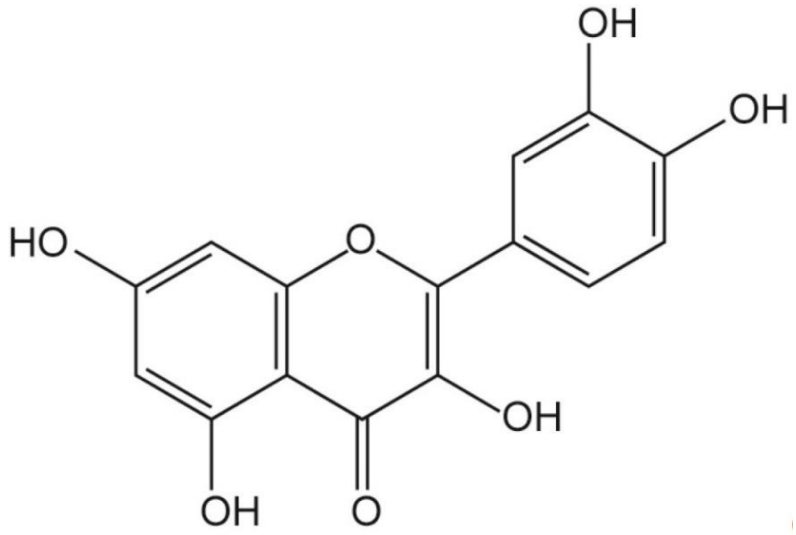
Quercetin, fenolik bileşenlerden oluşan bitkilerden elde edilen ve pek çok besin kaynağında bulunan, flavonoid grubu üyelerinden biridir (28). Antioksidan (29),

antiapoptotik, antiinflamatuvar (30), antitümoral (31), antiviral (32), antiiskemik (33), ve antiallerjenik (34) özellikleri bilinmektedir. Polifenol yapısında olup güçlü bir antioksidan etkinliğe sahiptir (27). Kimyasal yapısı Şekil 8'de gösterilmiştir.

Quercetin hücre içinde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemekte, bu sayede hücreyi lipit peroksidasyonuna karşı koruyarak oksidatif stres ve apoptozis gibi etkilerin önüne geçmektedir (29).

Oliveira ve ark. (35)'nın pek çok çalışmanın bulgularından yola çıkarak düzenledikleri derlemede, QRC'nin hücre içindeki ana hedefinin özellikle mitokondriyon olduğu vurgulanmaktadır. QRC'nin faydalı bir etki oluşturmasını sağlayan özelliği, serbest radikal temizleyici bir etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Bulgular değerlendirildiğinde, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkileri dışında doku ve hücre hasarına karşı koruyucu etkinliği direkt olarak hücreleri ve dokuları etkileyen mitokondriyal işleyişin düzenlenmesinde görev almasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bunu da, mitokondriyal membran potansiyelinin, mitokondriyal biyogenezin, oksijenli solunumun, ATP anabolizmasının, mitokondriyon içi redox dengesinin ve sonuç olarak mitokondriyal apoptozisin düzenlenmesine etki ederek sağlamaktadır. Bu ifade edilen yolakların regülasyonu üzerinden pek çok ekzojen ve endojen hücresel stres ve oksidadif strese yanıt olarak, mitokondriyon hasarını önleyerek koruyucu etki göstermektedir (35).

Khorsandi ve ark. (36) ise, titanyum dioksit nanopartiküllerine karşı QRC'nin koruyucu etkisini değerlendirdikleri çalışmada, QRC'nin ön tedavi olarak uygulanmasının testis dokusundaki oksidatif stresi azalttığını ifade etmişlerdir.



Şekil 8. Quercetinin kimyasal yapısı (92).

NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B SİNYAL YOLAĞI

Hücreler, bilgileri aktarmak ve işlemek için moleküler komponentler ile etkileşimler sayesinde gerçekleşen karmaşık bir sinyal ağına sahiptir (93). Bunlardan biri olan NFkB, DNA'ya doğrudan bağlanarak çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre canlılığında, immünitede, hücre çoğalmasında, bellek ve öğrenme süreçlerinde etkin göreve sahiptir ve ilk olarak Sen ve Baltimore adlı bilim insanlarının yaptıkları çalışma ile tanımlanmıştır. (94). Ayrıca, hormonlar gibi çeşitli uyarıcı moleküller tarafından da aktive olur ve çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenleyerek görev yapmaktadır (95,96).

Nükleer faktör kappa B sinyal yolu, proinflamatuvar sitokinler tarafından NFkB'nin aktive edilmesine dayanan prototipik bir proinflamatuvar sinyal yolu olarak uzun zamandan beri kabul görmektedir. NFkB aktivasyonunu sağlayan genel proinflamatuvar sitokinler interlökin 1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörü α (TNF α) olarak bilinmektedir. Bunların dışında, sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri dahil olmak üzere diğer proinflamatuvar genlerin ekspresyonu da, oluşan NFkB sinyal yolu indüksiyonunda etkilidir (97).

Nükleer faktör kappa B, Rel domaini içeren ve memeli genomunda beş alt birimden (p52, p50, RelA, RelB, c-Rel) oluşan bir protein ailesi olarak bilinmektedir. Hücrede inaktif halde bulunan NFkB'nin aktifleşebilmesi için bu alt birimlerin homodimer ya da heterodimer oluşturması gerekir. (93,98). NFkB ailesi üyeleri birbirleriyle homodimerler veya heterodimerler oluştururlar ve inhibitör kappa B (IkB) adı verilen inhibitör proteinlerle inaktif bir sitoplazmik kompleks içinde bağlı kalırlar (93). NFkB yolağının öncül elemanları, IkB proteinleri, IkB kinaz (IKK) kompleksi, ve NFkB dimerleridir. Sitokinler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çok çeşitli agonistler tarafından uyarıldığında, IkB fosforillenir, ubikitinize edilir ve indirgenir, NFkB üyelerinin nükleer translokasyonlarını teşvik ederek nükleer lokalizasyon dizilerini açığa çıkarırlar (99). IkB proteinleri, IkBa, IkBb, IkBe, IkBz, B hücreli lenfoma-3 (B cell lymphoma-3, Bcl-3) ve IkBns ve öncü proteinler p100 (NFkB2) ve p105 (NFkB1) olarak çoklu ankirin tekrar alanlarının varlığı ile tanımlanmışlardır (98).

Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörleri ailesi RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 ve p52, esas olarak NFkB / IkBα sinyal yolu aracılığıyla inflamatuvar ve apoptozis yanıtlarını düzenler. Çok sayıda çalışma, kanonik NFkB/IkB sinyal transdüksiyon yolağının, spesifik NFkB dimerlerinin sitoplazmadan nükleusa translokasyonuyla gerçekleştiğini göstermiştir. İlgili mekanizmalar arasında, IKK aktivasyonu, IkB fosforilasyonu ve ubikitinasyonu, ilgili

NFkB dimerlerinin nükleer translokasyonu ve daha sonra NFkB hedef genlerinin transkripsiyonu bulunur (96).

İnflamatuvar cevabın, yerleşik doku hücreleri ve kandan alınan lökositlerdeki hem pro- hem de antiinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu düzenleyen çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonu ve koordinasyonuyla sağlandığı düşünülmektedir. Günümüzde inflamatuvar yolağa dair edinilen bilgiler IL-1 ve TNF α reseptör aileleri ile IL-1R ailesine ait (Toll-like receptors, TLRs) ailesi ile elde edilmiştir. IL-1 ve TNF α, doku hasarı üzerine hızla salınan proinflamatuvar sitokinleri temsil etmektedir. TLR'ler ise, mikrobiyal yapıları tanıyarak bu aktivasyonu sağlamaktadır (98).

Son yıllarda, NFkB aktivasyonunu gerçekleştiren en az iki ayrı yolak olduğu ortaya çıkmıştır. "Kanonik" yol, daha önce tarif edildiği gibi mikrobiyal ürünler ve TNF α ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından tetiklenir ve genellikle RelA veya cRel içeren komplekslerin aktivasyonuna yol açar. Alternatif "non-kanonik" NFkB yolu ise TNF ailesi sitokinleri lenfotoksin β (TNFSF3), CD40 ligand (CD40L ve TNFSF5), B hücresi aktivasyon faktörleri (BAFF ve TNFSF13B) ve NFkB ligandının reseptör aktivatörleri (RANKL ve TNFSF11) ile aktive edilir. Bu yollar IKK alt birimleri için farklı gereksinimler ile tanımlanır. (97). Hücreler TNF α veya IL-1β'ya maruz kaldıklarında IkB kinaz fosforlanır, bu da NFkB'nin serbestleşip nükleusa girerek gen ekspresyonunu aktive etmesine neden olmaktadır (100).

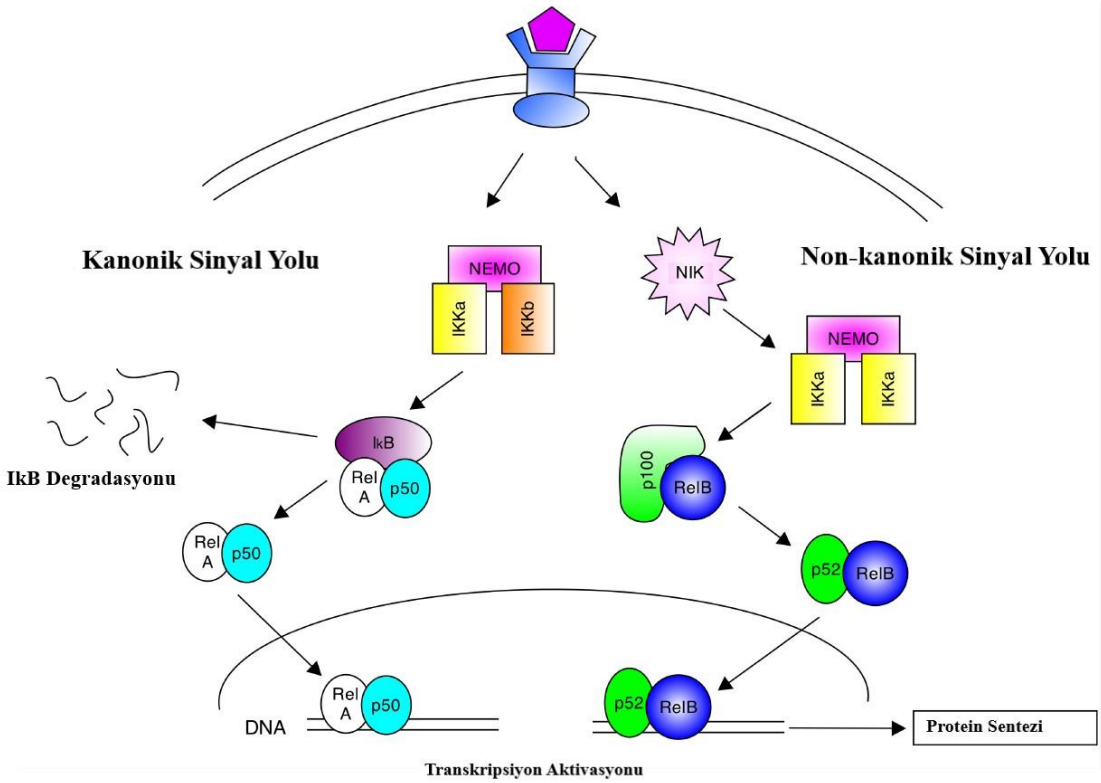
Nükleer faktör kappa B 'nin düzenlenmesi üzerine yapılan araştırmalar, IKK kompleksini aktive eden mekanizmalara, NFkB'nin IkB proteinleri tarafından inhibe edilme mekanizmalarına ve NFkB ailesi üyelerinin seçilen hedef genlerin promotörlerine bağlanma ve bunları destekleme kapasitesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Yolağın inaktive edilmesi, IKK kompleksinin deaktivasyonunu, IkB proteinlerinin yeniden sentezini ve NFkB dimerlerinin hem DNA'dan hem de transkripsiyonel koaktivatörlerden yer değiştirmesini gerektirir (98) ve yapılan deneysel çalışmaların öncelikli amacı bu inaktivasyonu sağlamaktır. NFkB'ye ait yolaklar şekilde gösterilmiştir (Şekil 9).

Nükleer faktör kappa B/Ikb aracılı sinyal yolağı yanısıra, Bax/Bcl-2 sinyal yolağı apoptozisde önemli bir rol oynar. Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 ve proapoptotik Bax proteini, Bcl-2 süper ailesinin en çok çalışmalara konu olan iki üyesidir ve apoptozisin mitokondriyal yolunun birincil düzenleyicileri olarak işlev görür. Klasik Bax/Bcl-2 sinyal yolu, sinyal transdüksiyon proteinleri olan tBid ve Bim'in aktivasyonu, antiapoptotik protein Bcl-2'nin ve proapoptotik protein Bax'ın bu aktivasyona cevabı, mitokondriyal dış membran

permeabilitesinin gerçekleşmesi, sitokrom C'nin salınımı ve kaspazın aktifleştirilmesini içerir (96).

Bir başka çalışmaya göre, Bcl-2'nin transkripsiyonel düzenlemesinin B hücresi gelişimi için önemli olduğu, NFkB ekspresyon modelinin B hücresi gelişimi sırasında değiştiği ve dolayısıyla hem Bcl-2 hem de NFkB'nin apoptozis düzenlemesinde yer aldığı düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak bu protein aileleri arasındaki ilişki incelenmiş, Bcl-2 promotörü içindeki NFkB aracılı transkripsiyonel baskı ile sitokin yoksunluğuna cevaben Bcl-2'nin azaldığı ve apoptotik yolağın indüklendiği gösterilmiştir (99).

Nükleer faktör kappa B, normal fizyolojik süreç için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. NFkB aktivitesinde ortaya çıkan düzensizlikler romatoid artrit, osteoartrit, astım, multiple skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, tip 2 diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (100).



Şekil 9. NFkB ilişkili sinyal yolakları (93).

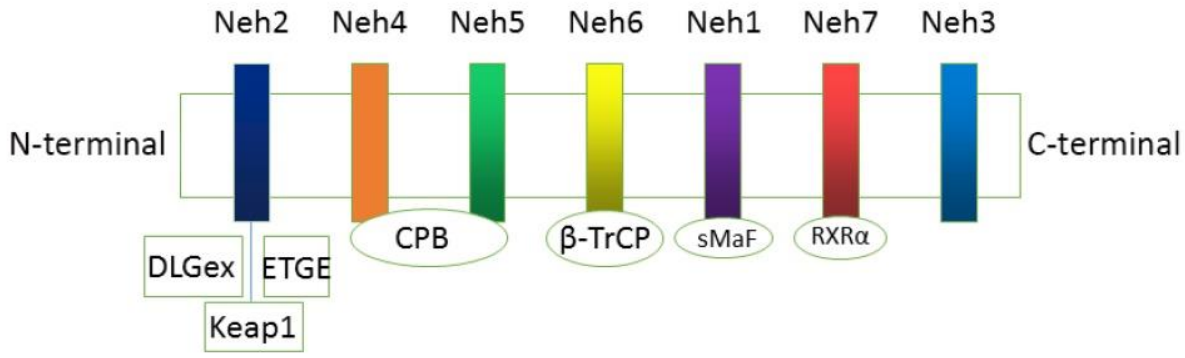
NÜKLEER FAKTÖR ERİTROİD-2 İLİŞKİLİ FAKTÖR 2 SİNYAL YOLAĞI

Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2, inflamatuvar hücrelerin toplanmasını düzenleyen ve antioksidan cevap elemanı (antioxidant responsive element, ARE) yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyerek antiinflamatuvar sürece katkıda bulunan bir faktördür. Kelch -

benzeri ECH - ilişkili protein 1 (Keap1) ise Nrf2'nin transkripsiyon faktörü olarak görev yapmasını engelleyen bir proteindir (85). Keap1/Nrf2/ARE sinyal yolu, temel olarak antiinflamatuvar gen ekspresyonunu düzenler ve inflamasyonun ilerlemesini inhibe eder (101). Bu nedenle, yeni Nrf2'ye bağımlı antiinflamatuvar fitokimyasalların tanımlanması ilaç keşfedilmesinde kilit bir nokta haline gelmiştir. (102-104).

Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2, Cap 'n' Collar (CNC) alt ailesine aittir (104) ve yedi işlevsel alan olan Neh1den Neh 7'ye kadar isimlendirilen birimlerden oluşan ve 605-amino asit zinciri içeren transkripsiyon faktörüdür. N-terminal Neh2 domaini, inhibitör protein Keap1 için bağlayıcı bölgedir ve Keap1 homodimerini iki yerde bağlar (85, 102) (Şekil 10).

Kelch - benzeri ECH - ilişkili protein 1, Cul3-Rbx E3 ubikitin ligaz kompleksi için bir adaptör olarak işlev gören 624-amino asit, sistein bakımından zengin, homodimerik bir çinko-parmak proteinidir. Keap1, üçü karmaşık yapıda (BTB), biri müdahale edici bölge (IVR) ve ikisi glisin tekrar eden bölgeler (DGR) olarak şekillenen altı alandan oluşur. Keap1, Nrf2'nin N-terminal Neh2 alanına Kelch alanı yoluyla bağlanır ve Keap1'in BTB alanı, Cul3'ü alır. Nrf2'nin DGR alanına bağlanması, p62 ve BRCA2'nin ortağı ve lokalizatörü gibi spesifik motiflere sahip proteinler tarafından inhibe edilir. IVR alanı, Roc ile birlikte E3 ligaz kompleksi içeren Cul3 proteini ile etkileşiminin yanı sıra, Keap1'in sitoplazmada lokalizasyonu için de önemlidir (85).



Şekil 10. Nrf2'nin moleküler yapısı (85).

Keap1-bağımlı Nrf2 düzenleme

Neh1, Nrf2'nin küçük muskuloaponerotik fibrosarkom (Maf) proteini, DNA ve diğer transkripsiyon partnerleri ile heterodimerize olmasına izin veren ve ubikitin-konjuge enzim UbcM2 ile bir nükleer kompleks oluşturan CNC-bZIP alanıdır. Neh2, Nrf2 ve negatif regülatörü Keap1 arasındaki etkileşim için gerekli olan DLG ve ETGE olarak bilinen iki

önemli motif içerir. Keap1, Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesini normal koşullar altında ubikitinasyon ve proteozomal degradasyon yoluyla engelleyen cullin bazlı E3 ubikitin ligaz için bir substrat adaptörüdür. Keap1 homodimerinin Kelch alanları DLG ve sitozolde Nrf2-Neh2 bölgesinin ETGE motifleri ile bağlanır. Burada ETGE daha yüksek afiniteye sahip bir menteşe görevi görürken DLG bir mandal görevi görür. Oksidatif stres altında veya Nrf2 aktivatörlerine maruz kaldığında Nrf2, Nrf2 ubikitinasyon ve proteazomal bozunmayı önleyen Keap1 sistein kalıntılarının tiyol modifikasyonu nedeniyle Keap1 bağlanmasından ayrılır. Daha sonra Nrf2 nükleusa transloke olarak, küçük Maf proteinleri ile heterodimerize olur ve genler için bir batarya görevi yapan ARE ile işlenir. Neh3'ün karboksi terminali, kromo-ATPase/helikaz DNA bağlayıcı protein (CHD6) olarak bilinen transkripsiyon koaktivatörü ile etkileşime girerek bir işlem alanı olarak görev yapar. Neh4 ve Neh5 ayrıca transaktivasyon alanları olarak işlev görür, ancak cAMP-cevap elemanı-bağlayıcı protein (CBP) olarak bilinen başka bir transkripsiyonel ortak aktivatöre bağlanır. Ayrıca, Neh4 ve Neh5, nükleer kofatör RAC3/AIB1/SRC-3 ile etkileşime girerek, Nrf2 hedefli ARE gen ekspresyonunun artmasına neden olur (Şekil 11). Neh5, Nrf2'nin düzenlenmesi ve hücresel yerleşimi için çok önemli olan redoks duyarlı bir nükleer çıkış sinyaline sahiptir (85,102) (Şekil 11).

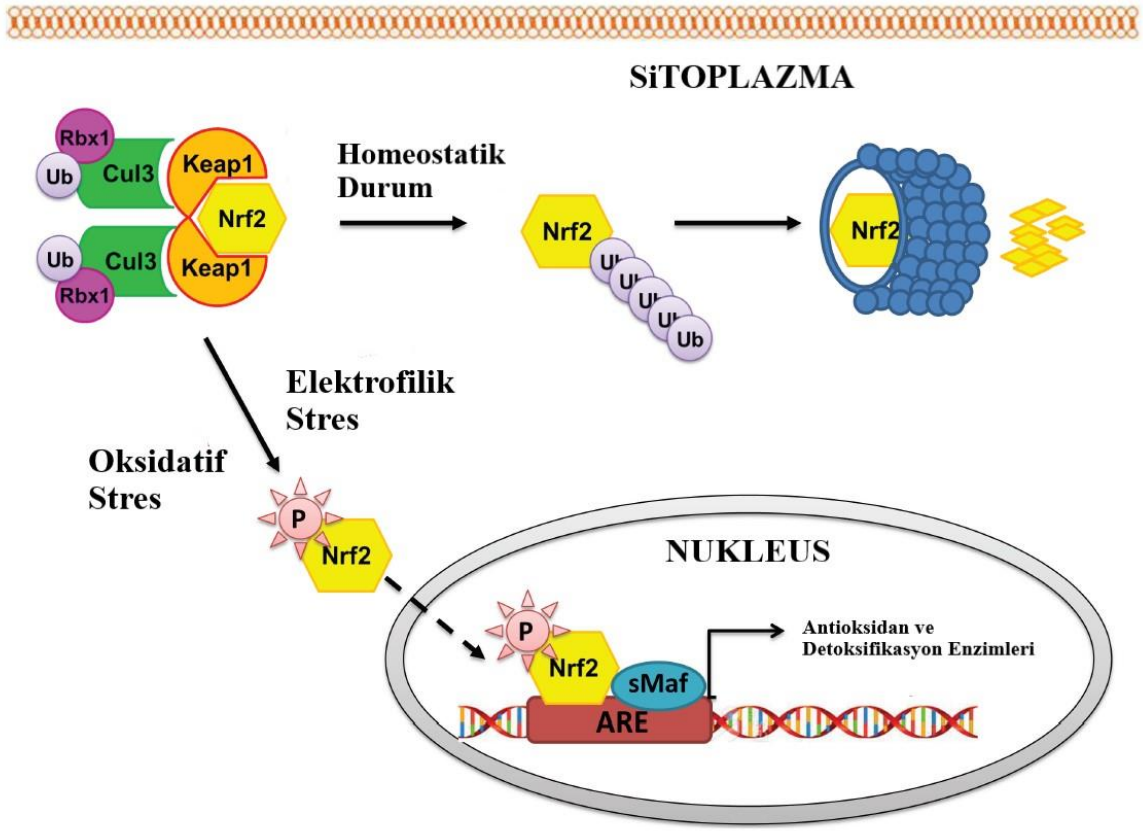
Keap1-bağımsız Nrf2 Düzenleme

Ortaya çıkan kanıtlar, Keap1'den bağımsız yeni bir Nrf2 düzenleme mekanizması ortaya koymuştur. Nrf2'nin serin zengini Neh6 alanı, bu düzenlemede iki motifiyle (DSGIS ve DSAPGS) β-transducin tekrar içeren proteine (β-TrCP) bağlanarak çok önemli bir rol oynar. β-TrCP, ubikitinasyon ve proteazomal degradasyon için Nrf2'yi hedef alan Skp1 - Cul1 - Rbx1 / Roc1 ubiquitin ligaz kompleksi için bir substrat reseptörüdür. Glikojen sentaz kinaz-3, Keap1'den bağımsız Nrf2 stabilizasyonunda ve düzenlenmesinde rol oynayan çok önemli bir proteindir. Nrf2'deki Neh6 domainini fosforile eder, Nrf2'nin β-TrCP ile tanınmasını ve ardından protein parçalanmasını kolaylaştırır (102,106) (Şekil 11).

Diğer Nrf2 Regülatörleri

Kanonik olmayan bir p62-bağımlı Nrf2 aktivasyonunun p62'nin Keap1'in nihai olarak Nrf2'nin stabilizasyonuna ve Nrf2'ye bağlı genlerin transaktivasyonuna yol açan otofajik degredasyonuna yol açtığı ortaya koyulmuştur (102).

Ayrıca yapılan bir çalışma, Nrf2'nin, inflamasyon belirteci olarak görülen NFkB yolu ile antagonistik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir Yani NFkB bağlanma bölgeleri, Nrf2 geninin promotör bölgesinde tanımlanmıştır. (107).



Şekil 11. Nrf2/Keap1/ARE sinyal yolu (106).

Nükleer faktör kappa B ve Nrf2 aktiviteleri, hücre veya dokunun inflamatuvar durumu ve hücresel faaliyetlerin sürdürülebilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Nrf2 ve NFkB yolakları arasındaki dengesizlik, nörodejenerasyon, otoimmün bozukluklar, kanser ve maruz kalınan toksik ajan gibi değişen çok sayıda klinik tablo ile ilişkilidir. Nrf2 ve NFkB sinyal yollarının etkileşimleri çoklu moleküler etkileşimler ile gerçekleşmektedir ve son yıllarda bu iki transkripsiyon faktörü arasındaki cross-talk olarak nitelendirilen ilişki üzerine çalışmalar yapılmaktadır (104). Xu D ve ark. (108) tarafından yapılan bir çalışmada, QRC'nin antioksidan etkinliği değerlendirilmiş, enzim aracılı ve enzim bağımlı olmayan antioksidan savunma sistemini düzenleyebildiği ifade edilmiştir. ROS'un, APE1 / Refl'in üretimini ve p53-aracılı apoptozis, MAPK ve NFkB yolaklarını indüklediği ve antioksidan özellikli bir

bileşen olan QRC'nin hücrede ROS regülasyonu sağlayarak antioksidan cevap elemanı olan ARE aracılı Nrf2 aktivasyonunu arttırdığı belirtilmiştir.

BAX / BCL-2 YOLAĞI

Hücre ölümü, iyonlaştırıcı radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar gibi DNA'ya zarar veren maddeler tarafından indüklenebilen aktif bir süreçtir (109). Bcl-2 protein ailesi, öncelikle mitokondriyal dış membran geçirgenliğini düzenleyen doğrudan bağlanma etkileşimleriyle hücre ölümünü kontrol eden önemli hücre ölümü düzenleyicisidirler (110). Bax ve Bcl-2 proteinleri apoptozisle ilişkili olan Bcl-2 protein ailesine dahil proteinlerdir (111). Homeostazın normal dokularda korunması, hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengeyi yansıtır. Hücre içi Bcl-2/Bax aktivasyon oranı, apoptotik bir uyaranın ardından hücrelerin hayatta kalmasını veya ölüme gidişini belirleyen bir denge olarak karşımıza çıkmaktadır (112).

B hücreli lenfoma 2 protein ailesi, yeni oluşan hücreler ve eski ölmekte olan hücreler arasındaki dengeyi korumak için etkileşime giren 25 proapoptotik ve antiapoptotik üyeden oluşur. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri aşırı eksprese edildiğinde, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin oranı bozulur ve apoptotik hücre ölümü önlenebilir. Çalışmalarda antiapoptotik Bcl-2 protein ailesine ait protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi hücrelerdeki apoptotik yolağın işleyişine dair önemli bilgiler vermektedir. Bu sayede, kanser kemoterapisine karşı ilaç direncinin üstesinden gelinebilir ve kanser tedavisi sırasında normal dokuların korunmasına yönelik moleküler mekanizmalar aydınlatılabilir (113).

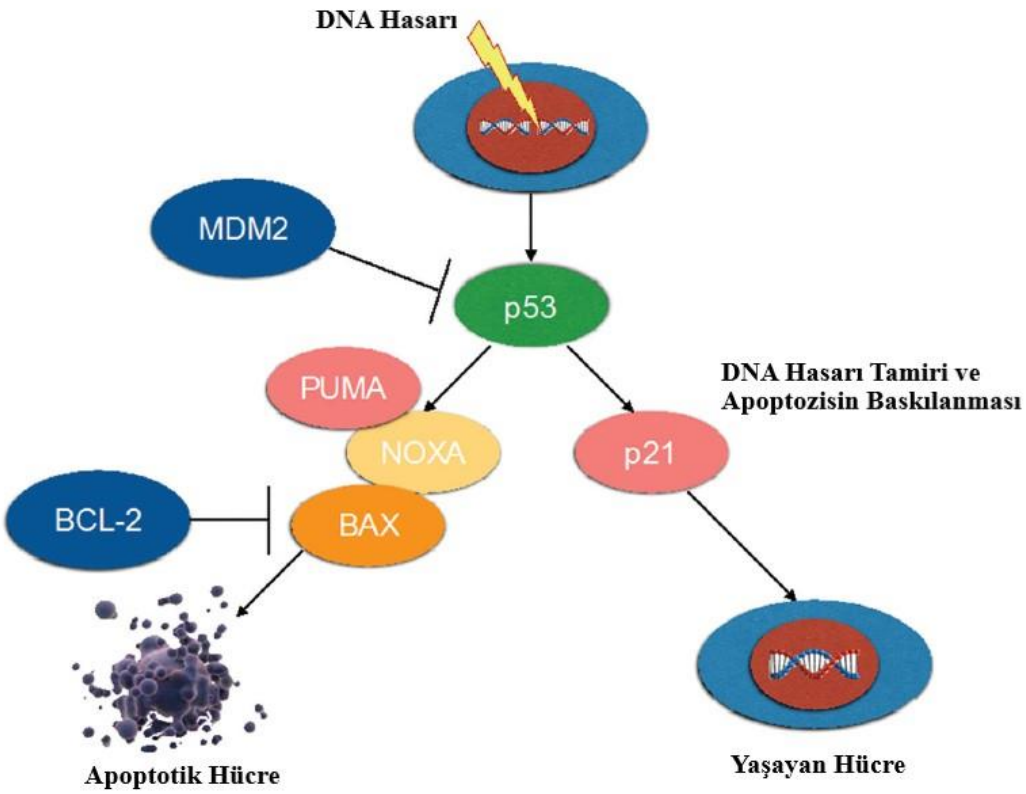
Bugüne kadar tespit dilen Bcl-2 protein ailesinin 25 üyesi, hematopoetik hücrelerde mitokondriyon, düz endoplazmik retikulum ve perinükleer membranlarda lokalizedir. Bcl-2 proteinleri, dört adete kadar nispeten kısa sekans motifinin varlığı ile karakterize edilir (113).

B hücreli lenfoma 2 protein aile üyeleri yapısal ve fonksiyonel özelliklere göre üç alt aileye ayrılmaktadır. Antiapoptotik alt familya, apoptozisi baskılayan ve dört Bcl-2 homoloji alanının tümünü içeren Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl1 / A-1 ve Bcl-B proteinlerini içerir. Bax, Bak ve Bok gibi bazı proapoptotik proteinler, Bcl-2 homoloji 1-3 alanları içerir ve "multidomain proteinleri" olarak adlandırılır. Bim, Bad ve Bid gibi diğer apoptotik proteinler yalnızca BH3 alanını içerir ve "BH3 proteinleri" olarak adlandırılır (113) (Şekil 12).

Bcl-2 associated x protein, proapoptotik bir proteindir. Bcl-2 ile %43 yapısı aynıdır ve Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilmektedir. Bax predominant olduğunda

apoptozis artmaktadır. Hücre ölüm sinyali geldiği durumlarda Bax sentezi artar ve Bcl-2'nin etkisini nötralize ederek apoptozisi arttırır. Normalde sitozolde lokalize olarak bulunur; apoptozis sırasında mitokondriyon membranına yerleşir. İyon kanallarını açarak sitokrom-c salınımına neden olur ve apoptozisi sağlar (114).

Hücrede sağkalım yanlısı Bcl-2 ve hücre ölümü yanlısı apoptotik Bax, Bcl-2 ailesinin en çok çalışılan iki üyesidir ve apoptozisin mitokondriyal yolunun birincil düzenleyicileri olarak işlev görür. Klasik Bax/Bcl-2 sinyal yolu, tBid ve Bim sinyal iletimi proteinlerinin, antiapoptotik protein Bcl-2 ve proapoptotik protein Bax'ın aktivasyonunu içerir. Bu yolak aktivasyonuna tepki olarak, mitokondriyal dış membran geçirgenliği artar, sitokrom C salınımı gerçekleşir ve kaspaz-3 aracılı apoptozis ortaya çıkar (96).



Şekil 12. Bax / Bcl-2 sinyal yolu (115).

Bcl-2 proteini, antiapoptotik etkilerinden dolayı, önemli bir çoklu ilaç direnç molekülü olarak kabul edilir (109). İntrinsik yolak (mitokondriyon yoluyla) çeşitli uyaranlara cevap olarak hücre ölümünün düzenlenmesinde kilit rol oynar. İntrinsik apoptotik yol, Bcl-2 gen protein ailesi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu proteinler, mitokondriden spesifik kaspaz aktive edici faktörlerin salınımını kontrol eder (111).

Yuan ve ark.'nın (116) yaptığı bir çalışmada, CP'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı flavonoid özelliği bilinen *Epimedium* adı verilen bitki ekstratı uygulanmasının antioksidan etkinliği yanı sıra, CP'nin arttırdığı proapopitotik bir protein olan Bax ekspresyonunda azalmaya, yine CP'nin azalttığı antiapopitotik bir protein olan Bcl-2 ekspresyonunda ise artışa sebep olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada apoptozis sonucunda ortaya çıkan DNA hasarının tespitini sağlayan TUNEL boyama yöntemine göre CP uygulanan grupta apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış görülürken flavonoid uygulanan grupta bu hücre sayısında azalma olmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ETİK KURUL ONAYI VE BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ DESTEĞİ

Çalışmanın deneysel kısmı için, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 01.03.2017 tarih ve 2017.02.06 no'lu karar ile onay alındı (Prot no: TÜHADYEK-2017/07) (Ek-1).

Etik kurul onayı alındıktan sonra çalışma içi gerekli malzemelerin teminini sağlayabilmek amacıyla, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) birimine başvuruldu ve TÜBAP-2017/79 no'lu proje olarak çalışmanın desteklenmesi kararı verildi (Ek-2). Daha sonra çalışmanın deneysel kısmı, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Labaratuvar'ında yapıldı.

DENEY HAYVANLARI VE DENEY PLANI

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 3 aylık, ağırlıkları 250-350 g arasında değişen 40 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip erkek sıçanlardan rastgele onar hayvan seçilerek toplam 4 grup oluşturuldu. Tüm denekler, deney süresi boyunca kafeslerinde optimum laboratuvar koşulları (22±1 ^{0}C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Hayvanlar çalışmaya başlamadan önce 1 hafta beklenerek ortam şartlarına adaptasyonu sağlandı.

Gruplar aşağıdaki şekilde düzenlendi:

1. Grup (Kontrol): Mısır yağı, intragastrik (ig.) yol ile 14 gün boyunca verildi (n=10).

2. Grup (Quercetin): QRC (Alfa Aesar, Kandel, Almanya) (100 mg/kg/gün, mısır yağı içinde çözülerek) ig. yol ile 14 gün boyunca verildi (n=10).

3. Grup (Siklofosfamid): CP (Endoxan, EIP ECZACIBASI, İstanbul, Türkiye) (200 mg/kg), serum fizyolojik içinde çözülerek, intraperitoneal (ip.) olarak 7. gün tek doz verildi (n=10).

4. Grup (Siklofosfamid + Quercetin): QRC (100 mg/kg, mısır yağı içinde çözülerek) ig. yol ile 14 gün ve CP (200 mg/kg) ip. olarak 7.gün tek doz olarak verildi (n=10) (Tablo 1).

Çalışmamızda kullandığımız QRC ve CP ajanlarının dozları, uygulama şekli ve süresi konu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalara göre belirlendi. Buna göre; CP, 200 mg/kg tek doz olarak 7. gün ip. olarak uygulandı (11,117). QRC dozu ise 100 mg/kg/gün olarak belirlendi ve mısır yağı içinde çözülerek hazırlandıktan sonra ig. yol ile verildi (118,119).

Son uygulanan QRC dozundan 24 saat sonra ksilazin (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve ketamin (Ketasol-Richter Pharma, Viyana, Avusturya) anestezisi altında servikal dislokasyon yöntemi ile hayvanlar sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı. Bütün gruplardaki hayvanlardan hızlı bir şekilde kardiak ponksiyon ile kan örnekleri alındı ve testis dokuları çıkarıldı. Elde edilen dokular, histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda rutin işlemlere tabi tutuldu.

Tablo 1. Deney Planı

Deney Grupları	Denek Sayısı	Verilen Madde	Dozu ve Verilme Şekli	Süresi
Kontrol	10	Mısır Yağı	/ig.	14 gün
Quercetin (QRC)	10	QRC	100 mg/kg/ig.	14 gün
Siklofosfamid (CP)	10	CP	200 mg/kg/ip.	7. gün tek doz
Siklofosfamid +Quercetin (CP+QRC)	10	CP+QRC	200 mg/kg/ip. 100 mg/kg/ig.	7. gün tek doz 14 gün

Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serum örnekleri epondorflara aktarılarak çalışılana

kadar -80 ^{0}C'de dondurularak saklandı. Daha sonra, serum testosteron, FSH ve LH değerleri ELISA yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ayrıca deney başında ve sonunda tüm hayvanların vücut ağırlık ölçümü ve deney sonunda testis ağırlık ölçümü yapıldı. Deney sonunda sakrifikasyon öncesi ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için testis vücut ağırlığı oranı belirlendi.

Testis / Vücut Ağırlığı Oranı: sağ ve sol testis ağırlıkları toplamı /vücut ağırlığı × 100

HORMONAL ANALİZLER

Hayvanlardan kardiak ponksiyon yoluyla alınan kan örneklerinden elde edilmiş ve -80 ^{0}C'de bekleyen serum örnekleri kullanılarak total testosteron, FSH ve LH hormon analizleri Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile gerçekleştirildi. Serumda total testosteron (Elabscience, Houston, Teksas, ABD), FSH (Elabscience) ve LH (Elabscience) tespiti için hazır kit kullanıldı. Her üç hormon analizide üretici firmanın önerdiği prosedür doğrultusunda gerçekleştirildi. Prosedürler gerçekleştirilmeden önce deneklerden elde edilen ve -80'de bekleyen serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Standart ve serum örneklerinden herbir ELISA pleyt kuyucuğuna 50'şer µl eklendi ve devamında firma önerileri doğrultusunda ELISA prosedür aşamaları gerçekleştirildi. Her bir kuyucuk mikroplate okuyucuda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Biotek ELx800, Winooski, Vermont, ABD). Firmanın önerdiği logaritmik formül ile hesaplanan sonuçlar, testosteron ve FSH için ng/ml ve LH için mIU/ml olarak verildi.

HİSTOLOJİK ANALİZLER

Elde edilen testis dokuları için gerekli takip işlemleri, histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Alınan testis doku örnekleri %10 luk tamponlu nötral formalin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya) solüsyonunda fikse edildikten sonra çeşme suyuna alınarak fiksatif dokudan uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından, dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular toluen (Merck, Darmstadt, Almanya) ile muamele edilerek, önce erime sıcaklığı 42-44 °C olan yumuşak parafine (Merck), sonrasında ise erime sıcaklığı 56-58 °C olan sert parafine (Merck) alındı ve parafin bloklar elde edildi. Tüm histolojik değerlendirmeler için bu dokulardan silindirli

mikrotom (Leica RM-2245, New Jersey, ABD) kullanılarak alınan 5 μm kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerinin incelenmesi için H&E boyası uygulandı. Entellan (DPX Mounting Medium, Atom Scientific Ltd, Manchester, İngiltere) ile kapatılarak kalıcı preparat haline getirildikten sonra, ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) incelenerek bulgular değişik büyütmelerde (x100, x200 ve x400) fotoğraflandırıldı (Olympus DP20 mikroskobik dijital kamera sistemi).

Hematoksilen ve Eozin Boyama

Hematoksilen ve Eozin boya prosedürü için; %10 luk tamponlu nötral formalin ile fikse edilip parafine gömülen testis dokularından elde edilen 5 μm kalınlığındaki kesitler, lam üzerine alınarak dikey cam şalelere dizildi ve 1 gün kurumaya bırakıldı. Kuruyan kesitler deparafinizasyon işlemi için toluene (Merck) alındı ve 30 dk bekletildi. Parafini giderilen kesitler, alçalan alkol serilerinden (100°, 100°, 96°, 90°, 70°) geçirilerek suya indirildi. Kesitler nükleus boyanması için Mayer's hematoksilen (Merck) boyası ile 10 dk muamele edildi. Daha sonra morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 1 dk bekletilen kesitlere, sitoplazma boyanması için Eozin (Merck) boyası 7sn uygulandı. Dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek suyu alındı ve 10 dk toluende (Merck) bırakıldıktan sonra entellan (DPX Mounting Medium) kulanılarak kesitlerin üzeri lamel ile (Thermo Scientific / Lab Vision, Fremont, CA, ABD) kapatıldı ve kurumaya bırakıldı. Böylece mikroskopta incelenmek için kalıcı preparatlar elde edilmiş oldu.

Morfometrik Analizler

Hematoksilen ve Eozin boyanmış preparatlarda, testislerde seminifer tübül çapı, seminifer epitel kalınlığı ve iki tübül arasında kalan interstisyel aralıktaki genişlik; Görüntüleme Analiz Sistemi (Versiyon 2.11.5.1, Kameram-Argenit, İstanbul, Türkiye) kullanılarak x100 veya x400 büyütmede ölçüldü. Bu ölçümler için, her hayvana ait testis kesitinde yuvarlak ya da yuvarlağa yakın rastgele seçilen 100 tübülün enine kesiti iki farklı araştırmacı tarafından ölçülüp ortalaması alınarak değerlendirildi. Aynı şekilde, 100 farklı interstisyel aralık ölçümü yapılarak interstisyel aralıklar hesaplandı. Tüm bu parametreler, her hayvana ait beş testis kesiti ve 20 farklı saha üzerinde değerlendirilerek yapıldı (120).

Histolojik Skorlama

Germinal seri hücre değişiklikleri, histolojik olarak, her hayvana ait 6 testis kesiti x100 büyütmede incelenerek aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi: Ayrılma (spermatosit hücre

kitlesinin seminifer epitelden kopup ayrılması), dökülme (germ hücre kümesinin seminifer epitelden ayrılıp lümene dökülmesi) ve vakuolizasyon (seminifer tübül içerisinde boşluklar oluşması). Her parametre için normal ve hasarlı tübüllerin ortalama yüzdesi belirlendi. Ortalama yüzde, her örnek için histolojik olarak hasarlı (vakuolizasyon, ayrılma, dökülme) ya da normal yuvarlak tübül sayısının aynı sahadaki total yuvarlak tübüllere bölünmesiyle elde edildi ve sonuç 100 ile çarpıldı. Her kesit için üç saha değerlendirilerek bunların ortalaması alındı (121).

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

İmmünohistokimyasal olarak; NFkB, Nrf2, Bax, Bcl-2 proteinlerinin immünoreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için, yine parafin bloklardan 5 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda immunohistokimyasal işlemler uygulandı.

Adheziv lamlar üzerine alınan 5 µm'lik kesitler 56 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün kesitler 5 dk soğumaya bırakıldı ve deparafinizasyon işleminden sonra, azalan alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Antijen geri kazanımı için kesitler, 20 dk boyunca 10 mM'lık sitrik asit tamponunda (pH 6) mikrodalgada kaynatıldı. Ardından, oda sıcaklığında 20 dk soğumaya bırakılan kesitler, fosfat tampon solüsyonu (phosphate buffer saline, PBS) (Sigma Aldrich) ile 3 kez 5'er dk yıkanıp, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için 15 dk hidrojen peroksit (Thermo Scientific/Lab Vision) ile muamele edildi. PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandıktan sonra, özgün olmayan antijenleri bloklamak için bloklama solüsyonunda (Ultra V Block-Thermo Scientific/Lab Vision) 5 dk oda sıcaklığında nemli çember içerisinde bekletildi. Primer antikor basamağında kesitlere; anti-NFkB antikoru (Thermo Scientific/Lab Vision) 1/100 dilüsyonda oda sıcaklığında bir saat uygulanırken, anti-Nrf2 antikoru (Abcam, Cambridge, MA, ABD) 1/400, anti-Bax antikoru (Abcam) 1/250 ve anti-Bcl-2 antikoru (Abcam) 1/200 dilüsyon ile +4˚C'de bir gece inkübe edildi.

Negatif kontrol için ise, kesitlere primer antikor yerine PBS damlatıldı. Bunu takiben PBS ile 3 kez yıkamanın ardından biotinlenmiş sekonder antikor (Biotinlated Goat AntiPolyvalent, Thermo Scientific/Lab Vision) ile oda sıcaklığında 10 dk muamele edildi. Yine 3 kez PBS ile yıkama sonrasında, streptavidin peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific/Lab Vision) 10 dk uygulanarak kromojen olarak 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Thermo Scientific/Lab Vision) kullanıldı. Distile suda 5 dk yıkanan kesitlere daha

sonra hematoksilen (Merck) zıt boyama yapıldı. Tekrar sudan geçirilen kesitler su bazlı uygun kapatma solüsyonu (Vision Mount, Thermo Scientific/Lab Vision) ile kapatıldı.

Yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda NFkB, Nrf2, Bax, Bcl-2 proteinleri HSCORE yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirmeler her hayvana ait testis kesitinde rastgele 5 alan seçilerek x400 büyütmede ışık mikroskobunda (Olympus BX-51) yapıldı. Skorlama, kesitlerde immünoreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi (Pi) ve boyanma derecesi (i) dikkate alınarak gerçekleştirildi. Boyanma derecesi 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Ortalama HSCORE her bir hayvana ait kesit için H SCORE= Σ i x Pi formülü ile hesaplandı (122).

IN SİTU DNA UÇ İŞARETLEME METODU (TUNEL) PROSEDÜRÜ

Testis dokularındaki apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanıldı. TUNEL analizi, adeziv lamlara alınmış 5 μm kalınlığındaki parafin kesitler üzerinde ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla kesitler, bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi ve ardından oda ısısında 5 dk soğumaya bırakıldı. Deparafinizasyon işlemi için toluenden (Merck) ve dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden (Merck) geçirilen kesitler, PBS (İnvitrogen, CA, ABD) ile yıkandı. Daha sonra kesitler, proteinaz K (20 μg/ml) ile inkübe edilerek proteinlerin sindirilmesi sağlandı. Ardından, endojen peroksidaz inhibisyonu için %3'lük H_2O_2 ile muamele edildikten sonra, oda sıcaklığında 30 dk dengeleme tamponunda inkübe edildi. Digoksigenin işaretli dUTP kuyruğunun bağlanması için 37°C'de 1 saat terminal deoksinükleotidil (TdT) transferaz enzim solüsyonu ile inkübe edilip, ardından kesitler oda ısısında 10 dk durdurma /yıkama tamponunda yıkandı. Devamında oda sıcaklığında 30 dk antidigoksigenin peroksidaz antikoru ile muamele edilen kesiitler, 3,3'diaminobenzidine (DAB) ile kromojenize edildi ve hematoksilen (Merck) ile zıt boyama yapıldı.

Her bir denekten rastgele seçilen yuvarlak veya yuvarlağa yakın en az yüz seminifer tübül kesiti, koyu kahverengi boyanmış apoptotik hücrelerin varlığı açısından değerlendirildi. Tübül kesidi başına düşen ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı ve en az bir TUNEL pozitif hücrenin bulunduğu apoptotik tübüllerin sayısı belirlenerek her hayvan için ortalama apoptotik hücre/tübül oranı (apoptotik hücre indeksi) ile apototik tübül indeksi hesaplandı (123).

Mikroskopta yapılan tüm semikantitatif değerlendirmeler, birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından yapılarak ortalamaları alındı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler için, SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, version 20.0, Lisans no: 10240642) programı kullanıldı, sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verilerek $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneklere ait verilerin normal dağılıma uygunluğu tek örneklem üzerinden Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra, normal dağılım gösteren verilerin değerlendirmesi tek yönlü varyans analizi (Tek Yönlü ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası anlamlı fark saptandığında, farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede grup varyansları homojense Tukey, homojen değilse Tamhane çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Deneklere ait normal dağılım göstermeyen veriler için, Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve gruplar arası farkı saptamak için Mann-Whitney U testi yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda; kontrol, QRC, CP ve CP+QRC gruplarındaki hayvanların deney başında ve sonunda vücut ağırlığı ölçülerek ağırlık değişimleri ve deney sonunda elde edilen testislerin ağırlıkları ölçülerek testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı hesaplandı. Ayrıca, hayvanlardan kardiyak poksiyon yöntemiyle alınan kan örneklerinden hormon düzeyleri belirlendi. Bunlara ek olarak, elde edilen testis dokularında morfometrik ölçümler ile histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Gözlemlerimiz;

1. grup: 14 gün boyunca ig. yol ile mısır yağı verilen kontrol grubu,

2. grup: 14 gün boyunca ig. yol ile QRC (100 mg/kg, mısır yağı ile çözülerek) verilen QRC grubu,

3. grup: 7. gün tek doz ip. olarak CP (200 mg/kg) verilen CP grubu,

4. grup: 14 gün boyunca ig. yol ile QRC (100 mg/kg, mısır yağı içinde çözülerek) ve 7. gün tek doz ip. olarak CP (200 mg/kg) verilen CP+QRC grubu bulguları olarak değerlendirildi.

VÜCUT VE TESTİS AĞIRLIK BULGULARI

Deney başında ve deney süresinin sonunda yapılan tartımlar sonucunda, tüm gruplardaki sıçanların vücut ağırlık değişimleri ve testis ağırlıklarının deney sonundaki ölçümü ile testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı hesaplanarak Tablo 2'de sunulmuştur. Kontrol ve QRC grupları arasında hayvanların vücut ağırlık değişimleri bakımından anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), kontrol ve QRC grupları ile CP grubu arasındaki vücut ağırlık değişimlerine bakıldığında, CP enjeksiyonu yapılan gruba ait hayvanların vücut ağırlıklarında

istatiktiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (her ikisi için p<0,001; Tablo 2). CP ve CP+QRC grupları kendi içinde değerlendirildiğinde ise, CP grubunda vücut ağırlığında daha fazla azalma olduğu ve bu azalmanın CP+QRC grubuna göre anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi (p<0,05; Tablo 2).

Testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, kontrol ve QRC grupları arasında testis ağırlıklarında anlamlı bir fark görülmezken (p>0,05), CP grubu testis ağırlıkları kontrol ve QRC ile kıyaslandığında, testis ağırlıklarının anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (her iki değer için p<0,05; Tablo 2). CP ile CP+QRC grupları testis ağırlıkları arasında QRC etkisi ile hafif bir artış görüldü ise de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05; Tablo 2).

Testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranları karşılaştırıldığında, kontrol ve QRC grupları arasında anlamlı düzeyde bir farklılık bulunmazken (p>0,05), CP grubunda bu oranın kontrol ve QRC gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı görüldü (p<0,05; Tablo 2). CP+QRC grubunda ise bu oran CP grubuna göre nispeten daha düşük olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlılık göstermemekte idi (p>0,05; Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlıkları (VA) değişimi, testis ağırlıkları (sağ-sol), testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarının (TA/VAx100) karşılaştırılması

Parametre	Kontrol (n=10)	QRC (n=10)	CP (n=10)	CP+QRC (n=10)	p değeri
VA değişimi (g)	10,1±5,17	8,7±3,5	-54,9±11,72*†	-41,4±13,61$^{*\dagger\#}$	p<0,001
Testis ağırlığı (sağ)	1,25±0,13	1,25±0,06	1,15±0,07**††	1,19±0,09	p<0,05
Testis ağırlığı (sol)	1,28±0,12	1,28±0,07	1,17±0,07**††	1,2±0,07††	p<0,05
Testis ağırlığı (TA) toplam	2,52±0,24	2,53±0,13	2,32±0,13**††	2,38±0,16††	p<0,05
TA/VAx100	0,95±0,1	0,94±0,09	1,05±0,06**††	1,01±0,08	p<0,05

Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.
* p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p<0,05 kontrol ile karşılaştırıldığında
† p<0,001 QRC ile karşılaştırıldığında; †† p<0,05 QRC ile karşılaştırıldığında
$^{\#}$ p<0,05 CP ile karşılaştırıldığında.

HORMONAL BULGULAR

Sakrifikasyon öncesi hayvanlardan kardiak ponksiyon yoluyla kan örnekleri alınarak serumda total testosteron, FSH ve LH hormon analizleri ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Tablo 3'te sunulmuştur.

Serum örneklerinde yapılan hormon analizlerine göre; testosteron, FSH ve LH hormon seviyelerinde kontrol ve QRC grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi (her üç değer için p>0,05; Tablo 3). Testosteron, FSH ve LH seviyelerinin, CP grubunda, kontrol ve QRC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı (her üç değer için p<0,001). Ayrıca, CP ile CP+QRC grupları kıyaslandığında, QRC uygulamasının, serum testosteron, FSH ve LH hormon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi (sırası ile p<0,001, p<0,001, p<0,05; Tablo 3).

Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarının serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması

Parametre	Kontrol (n=10)	QRC (n=10)	CP (n=10)	CP+QRC (n=10)	p değeri
Testosteron (ng/ml)	9,47±4,29	9,85±5,96	0,75±0,13*†	1,76±0,58$^{*\dagger\#}$	p<0,001
FSH (ng/ml)	20,52±10,91	22,83±8,98	0,63±0,2*†	1,92±1,03$^{*\dagger\#}$	p<0,001
LH (mIU/ml)	56,42±19,79	57,89±16,83	0,7±0,16*†	1,49±0,96$^{*\dagger\#\#}$	p<0,001

Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.
* p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında
† p<0,001 QRC ile karşılaştırıldığında
$^{\#}$ p<0,001 CP ile karşılaştırıldığında; $^{\#\#}$ p<0,05 CP ile karşılaştırıldığında.

MORFOMETRİK BULGULAR

Çalışmamızdaki seminifer tübül çapı, seminifer tübül epitel kalınlığı ve interstisyel aralıklar her hayvan için H&E ile boyanan beş farklı kesit ve 20 farklı sahadan toplam 100 ölçüm olacak şekilde gerçekleştirildi. İki farklı araştırmacı tarafından gerçekleştirilen ölçümler her bir parametre için 100'er ölçüm olacak şekilde tamamlandı. Bu verilerin ortalaması alındı ve böylece seminifer tübül çapı, seminifer tübül epitel kalınlığı ve interstisyel aralıklar hesaplandı.

Elde edilen veriler Tablo 4'te gösterilmiştir. Kontrol ve QRC grupları seminifer tübül çapı, seminifer tübül epitel kalınlığı ve interstisyel aralık için kıyaslandığında anlamlı bir fark göstermedi (her üç değer için p>0,05). CP grubu kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, CP grubunda seminifer tübül çapı ve seminifer tübül epitel kalınlığının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı (her iki değer için p<0,001; Tablo 4), buna karşılık interstisyel aralığın ise istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (p<0,001). CP grubu ile CP+QRC grubu kıyaslandığında, 14 gün boyunca gerçekleştirilen QRC uygulamasının

seminifer tübül ve seminifer tübül epitel kalınlığındaki azalmayı ve interstisyel aralıktaki artışı anlamlı ölçüde önlediği tespit edildi (her üç değer için p<0,001; Tablo 4).

Tablo 4. Kontrol ve deney gruplarının seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve interstisyel aralıklarının karşılaştırılması

Parametre	Kontrol (n=10)	QRC (n=10)	CP (n=10)	CP+QRC (n=10)	p değeri
Seminifer tübül çapı (µm)	288,69±2,25	289,98±7,25	237,06±5,79*†	263,88±7,47$^{*\dagger\#}$	p<0,001
Germinal epitel kalınlığı (µm)	61,51±2,14	64,52±4,24	37,45±2,4*†	53,3±2,05$^{*\dagger\#}$	p<0,001
İnterstisyel aralık (µm)	19,41±2,23	20,3±2,55	56,49±7,71*†	39,15±4,31$^{*\dagger\#}$	p<0,001

Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.
* p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında
† p<0,001 QRC ile karşılaştırıldığında
$^{\#}$ p<0,001 CP ile karşılaştırıldığında.

HİSTOLOJİK BULGULAR

Hematoksilen ve Eozin Boyama

Çalışmaya ait tüm deneklerin testis doku kesitleri H&E ile boyandı. Bu preparatlarda, testis kapsülü, seminifer tübüller arasındaki interstisyel aralıklar, seminifer tübül genel yapısı, seminifer tübül epiteli bazal membranı, spermatogenetik seriye ait germ hücreleri değerlendirildi. Tüm bu değerlendirmeler, Olympus BX51 mikroskobunda değişik büyütmelerde incelenerek ve Olympus DP20 mikroskobik dijital kamera sistemi ile fotoğraflandırılarak gerçekleştirildi.

Kontrol grubuna ait bulgular: Kontrol grubu deneklerinden alınan testis doku kesitleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde, en dışta sıkı bağ dokudan oluşan kapsül (tunika albuginea), seminifer tübüller ve aralarındaki interstisyel bağ doku (interstisyel aralık) yapısı normal olarak izlendi. Seminifer tübül germinal epiteline ait bazal membranın yapısının düzenli olduğu, epitelden ayrılma göstermediği ve tübülü belirgin olarak sarmakta olduğu izlendi (Şekil 13,14). Seminifer tübül çapları ve seminifer tübül epitel kalınlıkları değerlendirildiğinde, sırasıyla ortalama 288.69 µm ve 61,51 µm olduğu belirlendi (Tablo 4).

Seminifer tübül epiteline bakıldığında, germinal seri hücreleri düzenli yerleşime sahip olup, normal bir organizasyon sergilemekteydi. Bazal membrandan itibaren ilk yerleşim

gösteren oval nükleuslara sahip olan spermatogonyumlar ve üçgenimsi nükleuslara sahip olan Sertoli hücreleri görülmekteydi ve normal histolojik özelliklere sahiptiler. Spermatogonyumların üzerine yerleşim gösteren primer spermatositler spesifik görünümlü kromatin yapısına sahip yuvarlak ve büyük nükleusları ile dikkat çekmekteydi. Sekonder spermatositler, nispeten daha küçük hücreler olarak tübül epiteli içinde normal görünümlü bir şekilde nadiren izlendi. Bu hücrelerin mayotik bölünmeleri sonucunda oluşan spermatidler, lümene yakın sahada yoğun olarak yerleşmekteydi. Bazı sahalarda iki tabaka halinde gözlenen bu hücreler, yuvarlak nükleuslu olarak erken spermatidler ile uzamış nükleus ve uzamakta olan kuyruklarıyla izlenen geç spermatidler olarak normal morfolojik karakterde izlendi. Olgun spermiyumların seminifer tübül lümeninde var olması ise, normal bir spermatogenezisin gerçekleşmekte olduğunu gösterdi. Seminifer tübül bazal membranının dış kısmında, tübül kontraksiyonunda görev alan peritübüler myoid hücreler izlendi (Şekil 15). Histolojik yapı değişimindeki skorlamaya göre, kontrol grubuna ait hayvanların seminifer tübüllerinin %90,45'i normal görünümde iken, %5,36 ayrılan, %2,06 dökülen ve %2,13 vakuolize tübüller olarak kalan yüzdeyi oluşturmaktaydı (Tablo 5).

Seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel bağ dokusu, içerisinde yer alan bağ doku hücreleri, eozinofilik boyanan sitoplazmalarıyla ayırt edilen ve gruplar halinde izlenen Leydig hücreleri ile kan damarları normal görünümde idi (Şekil 16). Morfometrik ölçümler ile kontrol grubu interstisyel aralık ortalaması 19,41 µm olarak belirlendi (Tablo 4).

Quercetin grubuna ait bulgular: Normal görünümlü tunika albuginea, düzenli yerleşim gösteren germinal seri hücreleri ve Sertoli hücrelerinin oluşturduğu seminifer tübüller ile interstisyel bağ dokusu; QRC grubundaki deneklerden elde edilen testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik olarak incelenmesiyle kontrol grubuna benzer olarak gözlendi (Şekil 17). Seminifer tübül çapları ve seminifer tübül germinal epitel kalınlıkları değerlendirildiğinde, sırasıyla ortalama 289,98 µm ve 64,52 µm, interstisyel aralık ortalaması ise 20,3 µm olarak belirlendi ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (her üç değer için $p>0,05$; Tablo 4). QRC grubu histolojik yapı değişimindeki skorlamaya göre, kontrol grubuna benzer olarak, QRC grubuna ait hayvanların seminifer tübüllerinin %91,28'i normal görünümde iken, geri kalan yüzdeyi %5,42 ayrılan, %1,17 dökülen ve %2,12 vakuolize tübüller oluşturmaktaydı (Şekil 18,19; Tablo 5).

Siklofosfamid grubuna ait bulgular: Sadece CP verilen 3. grup deneklerimizin testis doku kesitleri incelendiğinde, kontrol ve QRC gruplarından farklı olarak seminifer tübüllerde, seminifer tübül germinal epitel hücrelerinde ve tübüller arasındaki bağ dokusu olan interstisyel aralıkta dejenaratif değişiklikler saptandı (Şekil 20,21). Seminifer tübül çapları (237,06 µm) ve seminifer tübül germinal epitel kalınlığının (37,45 µm) kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 4). Sertoli hücrelerinde herhangi bir değişiklik görülmez iken, seminifer tübül germinal hücre organizasyonunda bozulma ve hücre kayıplarına bağlı olarak vakuolizasyonlara rastlandı. Germinal seri hücreleri arasında, daha çok primer spermatositlerden itibaren spermatogenetik seri hücrelerinin bazal membrandan ayrıldığı, hücreler arası mesafenin arttığı, germinal epiteldeki düzenli konfigürasyonun bozulduğu ve tüm bu nedenlerle spermatogenezdeki aksamalara bağlı olarak geç spermatidlerin lümene yakın alanlarda daha az gözlendiği belirlendi. Ayrıca bazı seminifer tübüllerin lümeninde olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülmüş olan immatür hücrelere de rastlandı. Ek olarak, yine bazı seminifer tübüllerde bazal membran ondülasyonları izlendi (Şekil 22-26). Histolojik skorlamaya göre kontrol ve QRC grubu ile karşılaştırıldığında CP verilen gruptaki deneklerin normal görünümlü seminifer tübüllerinin sayısı azalarak %31,46'lık kısmını oluştururken, kalan yüzdeyi sayıları anlamlı derecede artış gösteren ayrılan (%28,87), dökülen (%21,59) ve vakuolize (%27,93) tübüller meydana getiriyordu (Tablo 5).

İnterstisyel bağ dokusu incelendiğinde, Leydig hücre dejenerasyonu, kan damarlarında konjesyon veya bazı sahalarda hemoraji odaklarının yer aldığı dejenere olmuş bağ dokusu ve ödem izlendi (Şekil 23,25). CP grubu deneklerdeki interstisyel aralık ölçümlerine bakıldığında kontrol ve QRC gruplarına kıyasla anlamlı bir artış (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 4) sağlayarak 56,49 µm'ye genişlediği tespit edildi.

Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait bulgular: CP verilmesinden 7 gün önce başlayarak 14 gün boyunca QRC verdiğimiz 4. grup deneklerimizden elde ettiğimiz testis doku kesitleri incelendiğinde ve sadece CP enjeksiyonu yapılan 3. grup ile kıyaslandığında, genel olarak yapının korunduğu tespit edildi (Şekil 27,28). Seminifer tübül çapları (263,88 µm) ve seminifer tübül germinal epitel kalınlıklarının (53,3 µm) CP grubu ile kıyaslandığında, anlamlı derecede artış gösterdiği görüldü (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 4). Ayrıca CP verilen gruba kıyasla, seminifer tübül germinal epitel hücre organizasyonunda bozulma ve buna bağlı ayrılma (%13,96), immatür hücre dökülmesi (%7,48) ve hücre

kayıplarına bağlı olarak vakuolizasyon (%15,38) gibi bulguların istatisitiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı izlendi (her üç değer için p<0,001; Şekil 27-32; Tablo 5). Bununla birlikte normal görünümlü seminifer tübül yüzdesinin ise CP grubundaki veriler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi (%68,93; p<0,001; Tablo 5). Kesitlerdeki normal görünümlü olan seminifer tübüller incelendiğinde, lümenlerinde olgun spermiyumların bulunduğu, dolayısı ile spermatogenezin gerçekleştiği görüldü. Yine, az sayıda olsa da, ayrılmış ve lümene immatür hücre dökülmesi gibi bulguların görüldüğü tübüllere de değişen oranlarda bazı sahalarda rastlandı (Şekil 31,32).

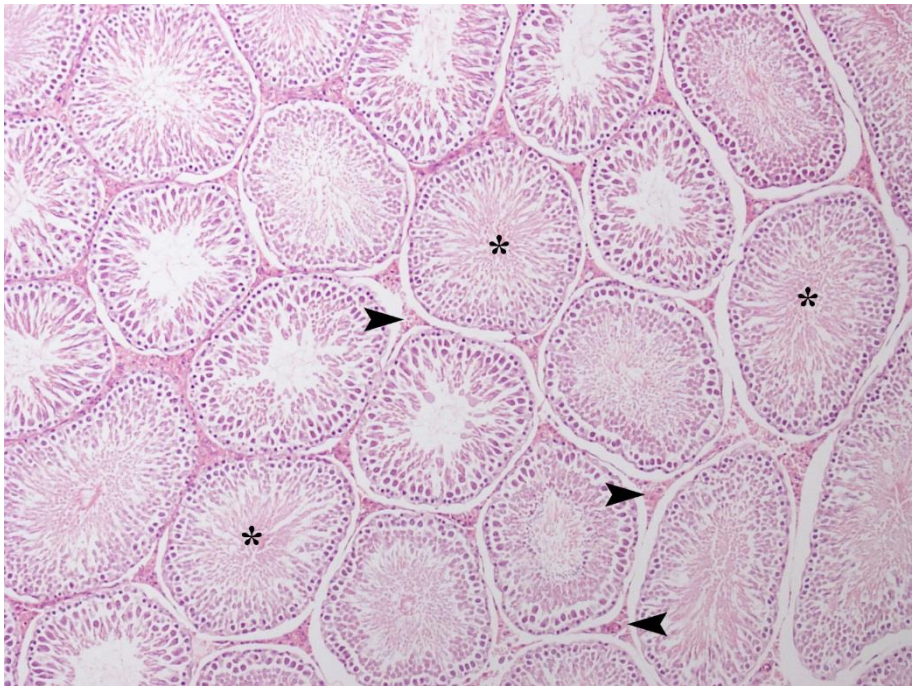
Sadece CP enjeksiyonu yaptığımız grupla karşılaştırdığımızda bu gruba ait kesitlerde interstisyel aralıklardaki ödem azalmıştı ve nispeten daha düzenli organizasyona sahipti. Ek olarak, Leydig hücrelerinin morfolojik yapısını nispeten korumuş olduğu görüldü. Hemoraji gözlenmedi, bununla birlikte, bazı alanlarda konjesyonun varlığını devam ettirdiğine rastlandı (Şekil 31,32). İnterstisyel aralık ölçümleri değerlendirildiğinde, bu grupta CP grubundaki artışa kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görüldü (39,15 μm; p<0,001; Tablo 4) ve bu durum morfolojik bulgularımızla paralellik göstermekte idi.

Bütün grupların yukarıda açıklanan seminifer tübül histolojik skor sonuçları Tablo 5'te gösterilmiştir.

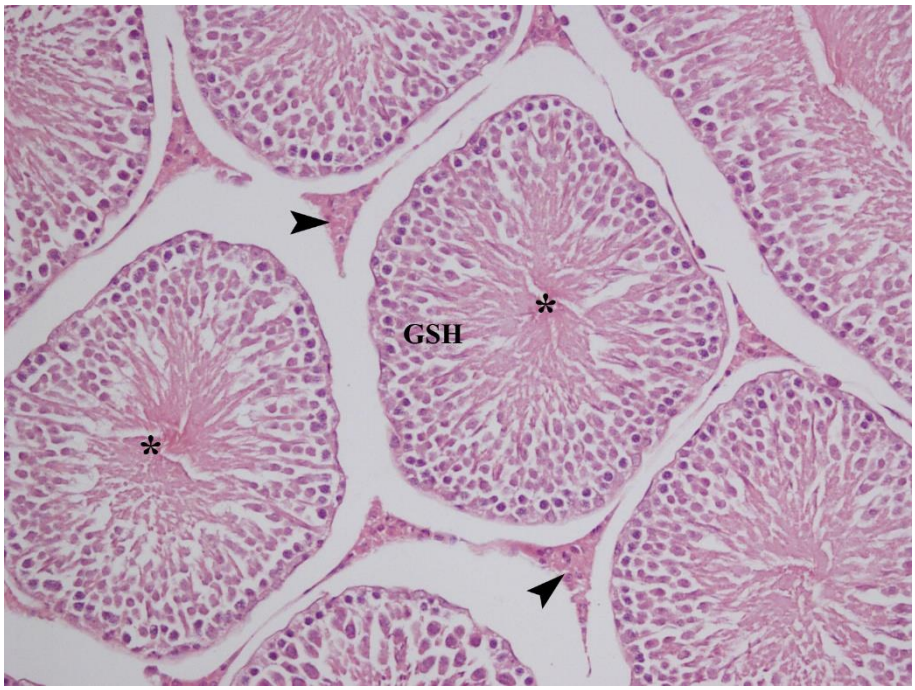
Tablo 5. Kontrol ve deney gruplarındaki seminifer tübüllerin histolojik yapı değişikliklerinin karşılaştırılması

Seminifer tübül yüzdesi	Kontrol (n=10)	QRC (n=10)	CP (n=10)	CP+QRC (n=10)	p değeri
Normal	90,45±1,94	91,28±2,67	31,46±2,63*†	68,93±2,178$^{*\dagger\#}$	p<0,001
Ayrılan	5,36±1,63	5,42±1,79	28,87±4,79*†	13,96±3,54$^{*\dagger\#}$	p<0,001
Dökülen	2,06±1,29	1,17±0,70	21,59±7,25*†	7,48±1,72$^{*\dagger\#}$	p<0,001
Vakuolize	2,13±0,73	2,12±1	27,93±3,44*†	15,38±2,32$^{*\dagger\#}$	p<0,001

Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.
* p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında
† p<0,001 QRC ile karşılaştırıldığında
$^{\#}$ p<0,001 CP ile karşılaştırıldığında.



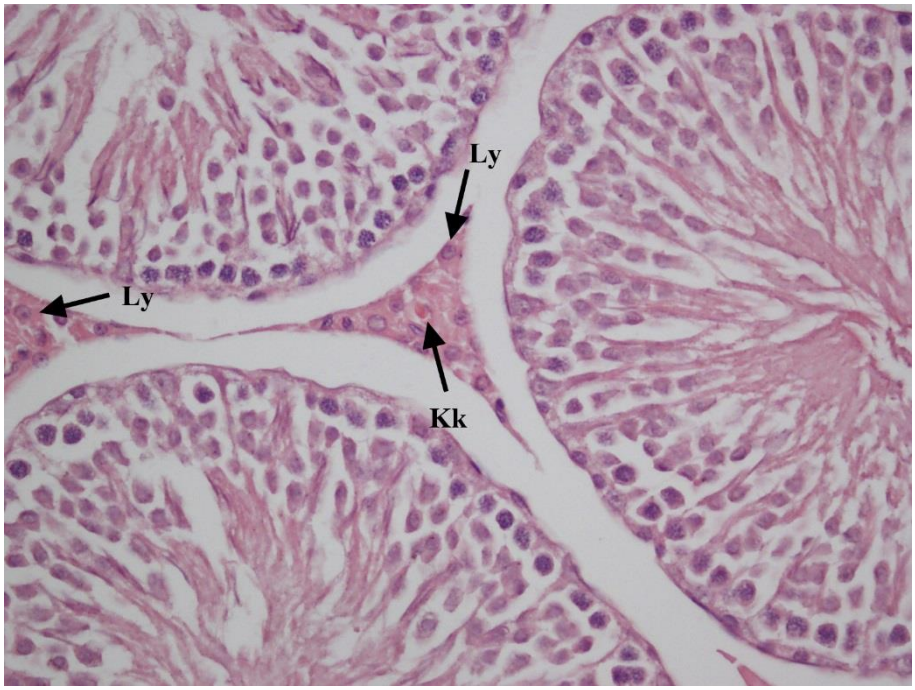
Şekil 13. Kontrol grubu testis kesitinde, spermatogenezin farklı aşamalarında olduğu görülen ve çapları birbirine yakın olan seminifer tübüller (yıldız) ile aralarındaki düzenli görünümde olan interstisyel aralık (ok başı) gözlenmektedir. H&E, x100.



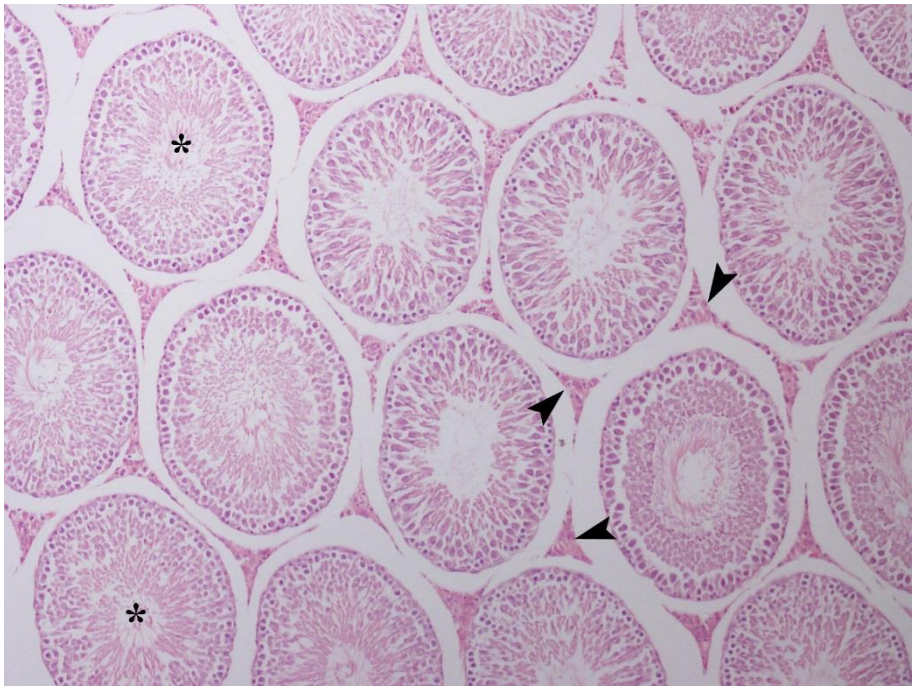
Şekil 14. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, spermatogenezin aktif olarak görüldüğü, normal görünümlü ve düzgün sınırlara sahip seminifer tübüllerin (yıldız) varlığı izlenmektedir. Seminifer tübül duvarını döşeyen germinal seri hücrelerinin (GSH) normal dağılım gösterdiği ve tübüller arası interstisyel bağ dokunun (ok başı) bütünlüğünü koruduğu görülmektedir. H&E, x200.



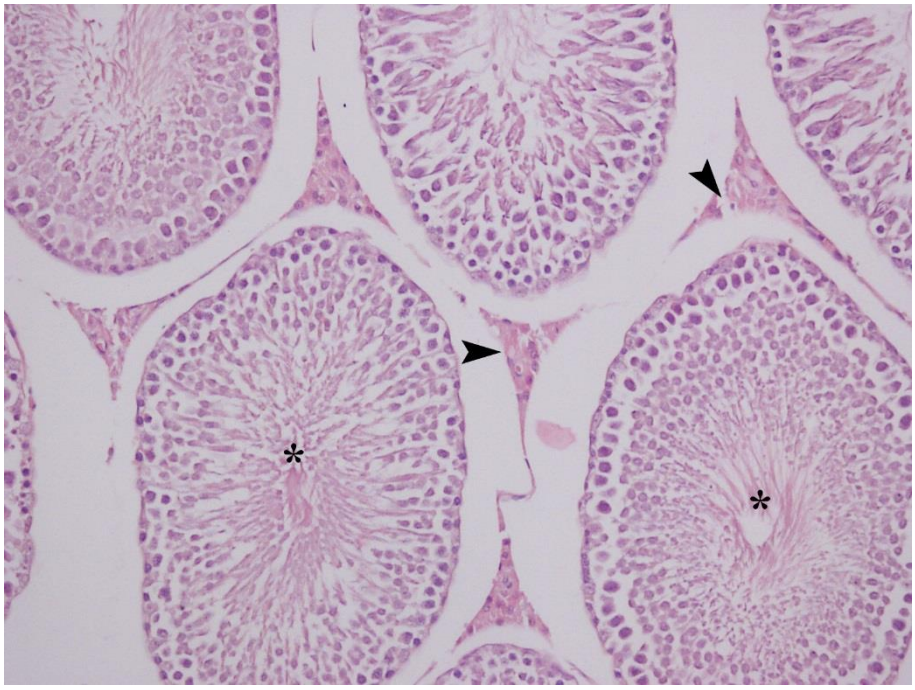
Şekil 15. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, spermatogenezin aktif olarak devam ettiği görülen bir seminifer tübülde, germinal seri hücrelerinin (GSH) bazal membrandan lümene kadar uzanan sahada düzenli organize olduğu, aralarında yerleşim gösteren Sertoli hücrelerinin (Sh) de normal görünümlü olduğu görülmektedir. Tübülleri dış kısmından saran iğ şeklindeki myoid hücreler (My) ve tübüller arasındaki interstisyel bağ dokusu içinde yer alan Leydig hücreleri (Ly) normal görünümlüdür. H&E, x400.



Şekil 16. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, normal görünümlü seminifer tübüllerin arasında yer alan düzgün görünümlü üçgen şekilli interstisyel bağ doku içinde eozinofilik sitoplazmalı Leydig hücreleri (Ly) dikkati çekmektedir. Ayrıca yine bu sahada görülen kan kapilerleri (Kk) normal görünümlüdür. H&E, x400.



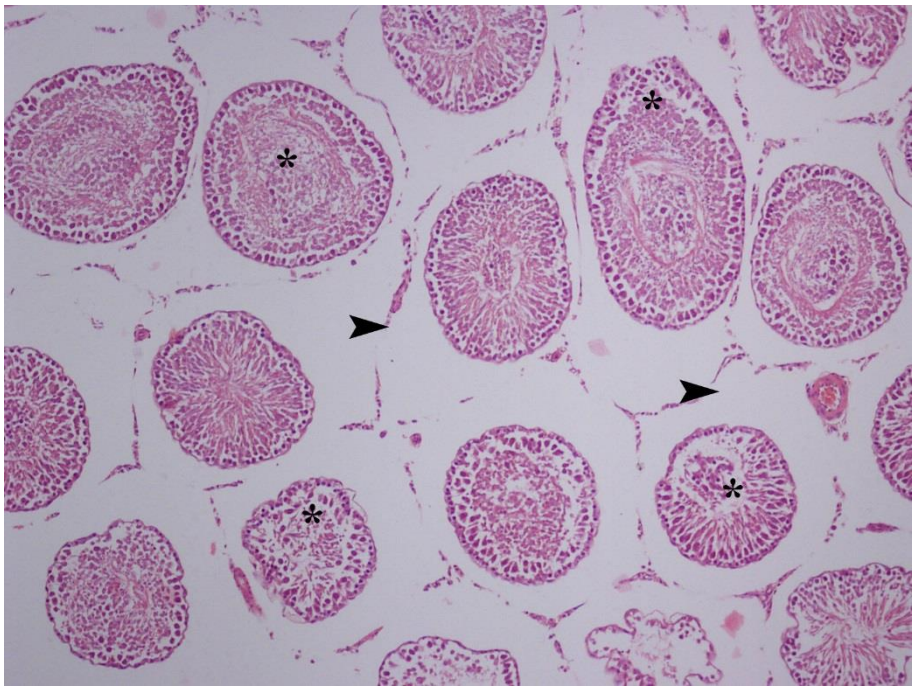
Şekil 17. Quercetin grubu testis kesitinde, seminifer tübüllerin (yıldız) ve tübüller arasında bulunan interstisyel bağ dokunun (ok başı) kontrol grubuna benzer olarak normal görünümlü olduğu gözlenmektedir. H&E, x100.



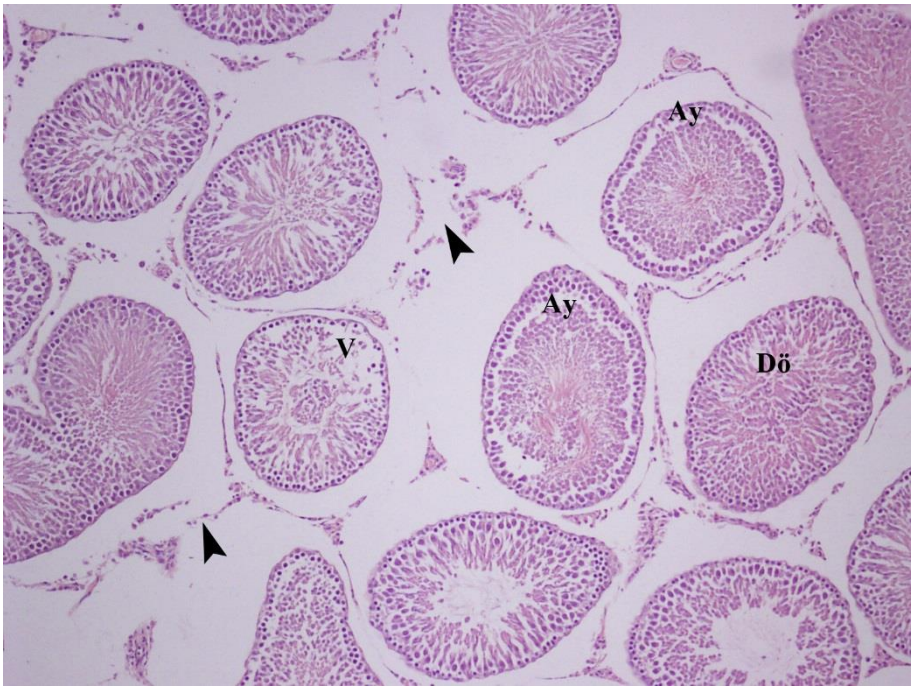
Şekil 18. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, düzgün sınırlara sahip seminifer tübüller (yıldız) kontrol grubuna benzer şekilde normal görünümlü olarak izlenmektedir. Ayrıca, interstisyel aralıkların (ok başı) düzenli yapısını koruduğu görülmektedir. H&E, x200.



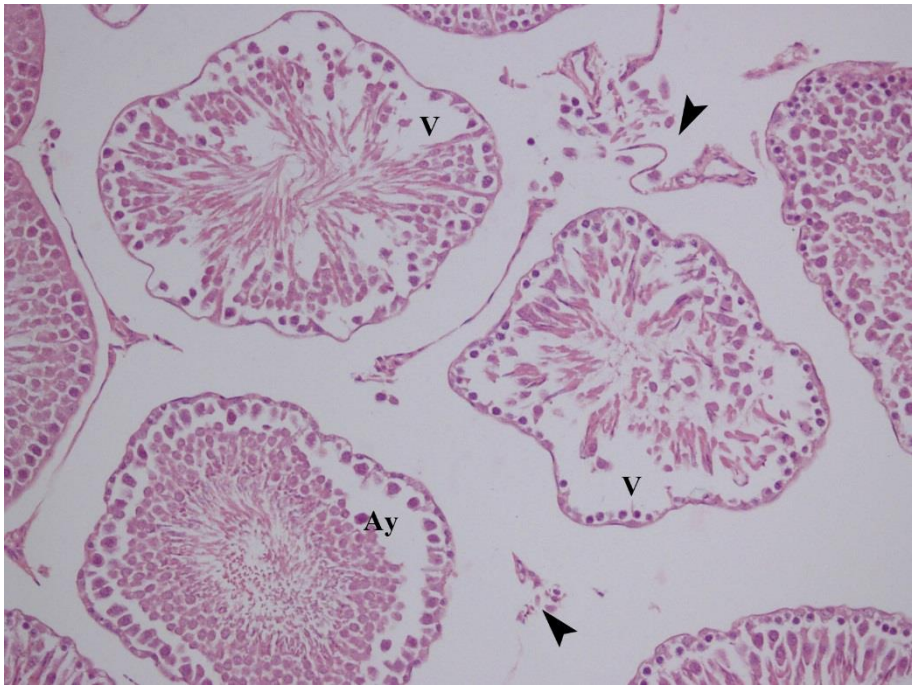
Şekil 19. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, normal görünümlü ve düzgün sınırlara sahip bir seminifer tübülde, düzenli yerleşim gösteren germinal seri hücreleri (GSH), Sertoli hücreleri (Sh) ve tübülleri saran myoid hücreler (My) kontrol grubuna benzer şekilde gözlenmiştir. Ayrıca, düzenli yapısını koruyan interstisyel bağ dokudaki eozinofilik sitoplazmalarıyla ayırt edilen Leydig hücreleri (Ly) normal yapıdadır. H&E, x400.



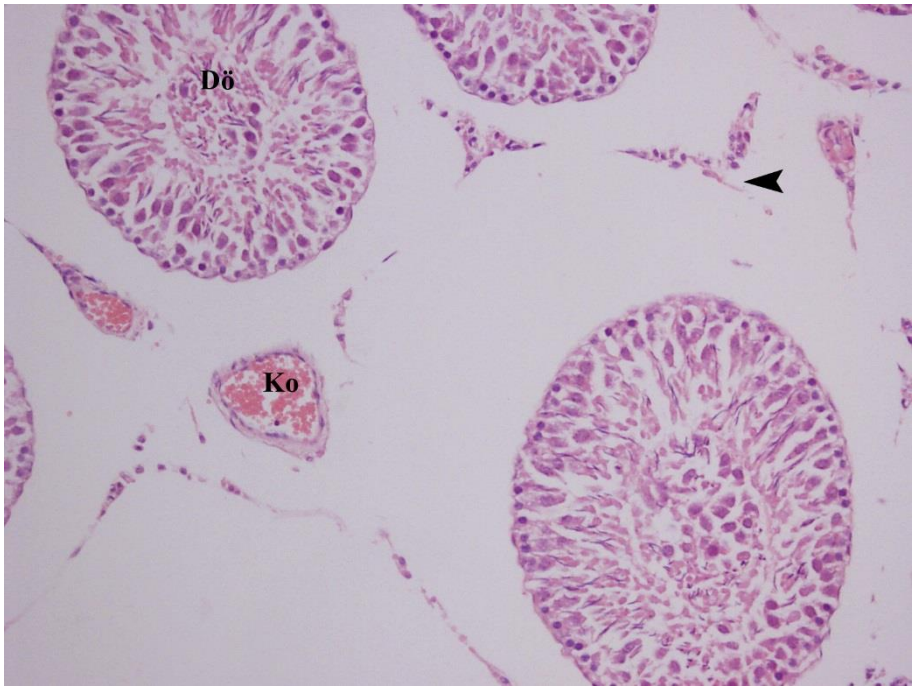
Şekil 20. Siklofosfamid grubu testis kesitinde, hasarlanmış seminifer tübüllerin (yıldız) çaplarının küçüldüğü, tübül duvarını oluşturan germinal seri hücre organizasyonunun bozulduğu ve tübüller arasındaki interstisyel aralıkların dejenerasyona uğradığı ve genişleyerek ödeme (ok başı) yol açtığı görülmektedir. H&E, x100.



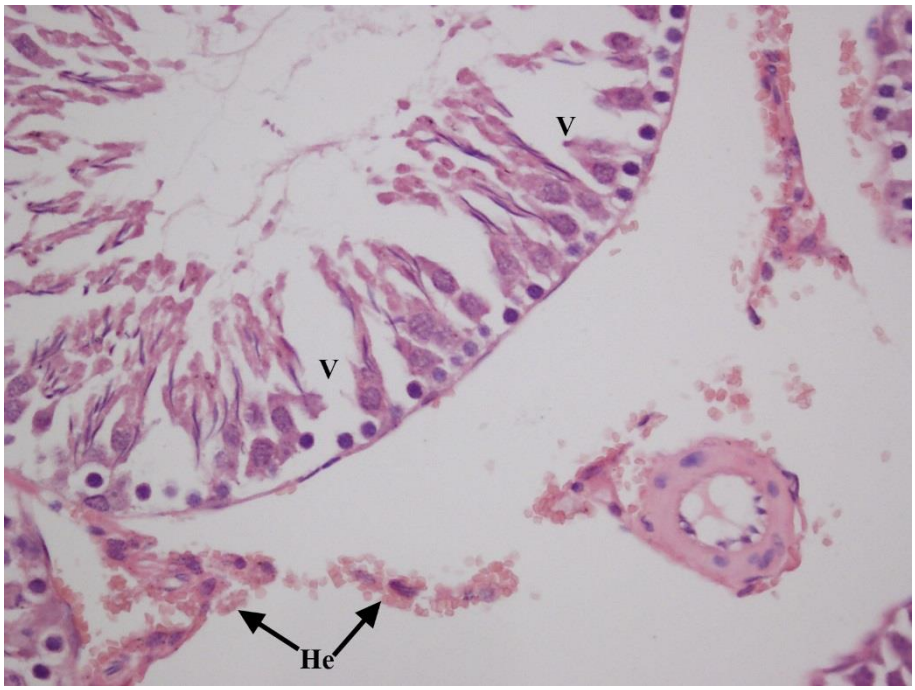
Şekil 21. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, vakuolize (V), ayrılan (Ay) veya lümenlerinde olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülmüş immatür hücrelerin görüldüğü (Dö) hasarlı seminifer tübüller ve aralarında yer alan interstisyel aralıktaki düzensiz görünüm ve genişleme (ok başı) izlenmektedir. H&E, x100.



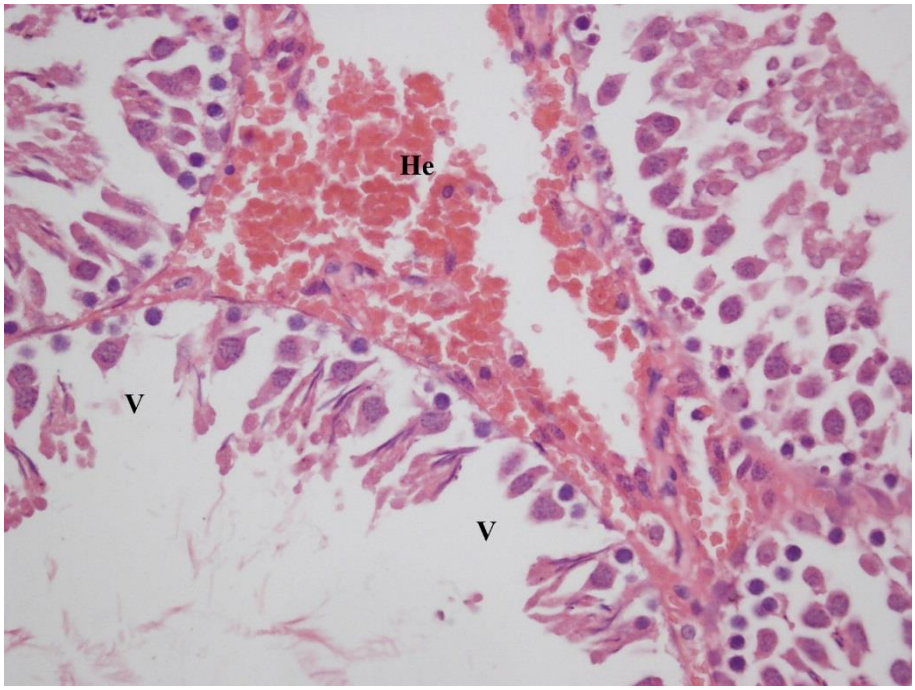
Şekil 22. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinin üst bölümünde yer alan iki seminifer tübülün germinal hücre organizasyonunda bozulma ve hücre kayıplarına bağlı olarak vakuolizasyonlar (V) görülmektedir. Alt bölümünde ise, primer spermatositlerden itibaren germinal seri hücrelerinin bazal membrandan ayrılması sonucu ayrılan (Ay) bir seminifer tübül yer almaktadır. Ayrıca interstisyel aralıkta genişleme ve düzensizlik (ok başı) göze çarpmaktadır. H&E, x200.



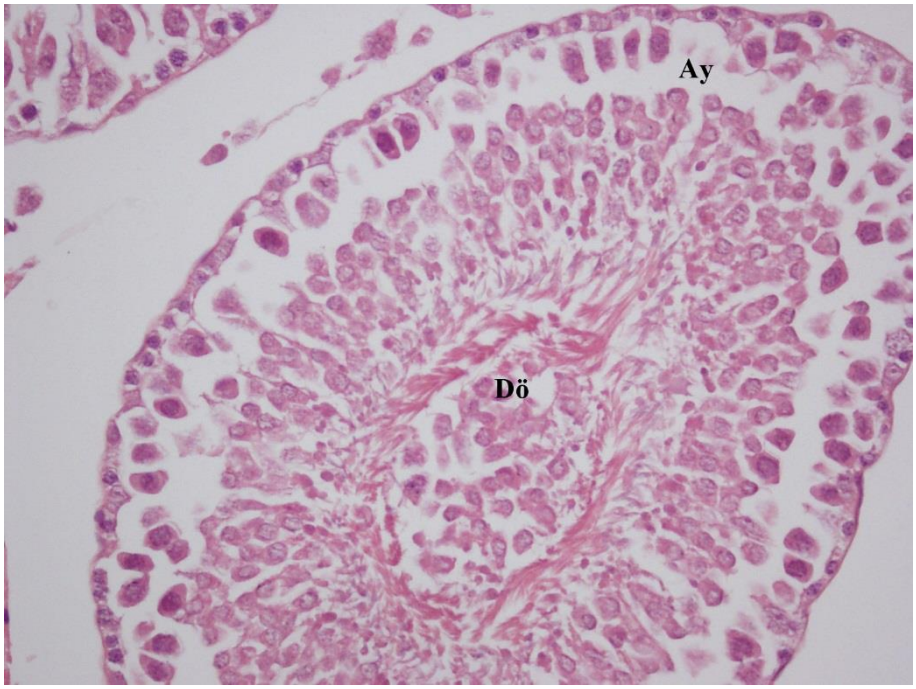
Şekil 23. Siklofosfamid grubuna ait bir başka testis kesitindeki seminifer tübüllerde, lümene dökülen immatür hücrelerin bulunduğu iki hasarlı seminifer tübül (Dö) arasında yer alan interstisyel bağ dokuda kan damarlarında görülen konjesyon (Ko) ve genişleme dikkat çekmektedir. H&E, x200.



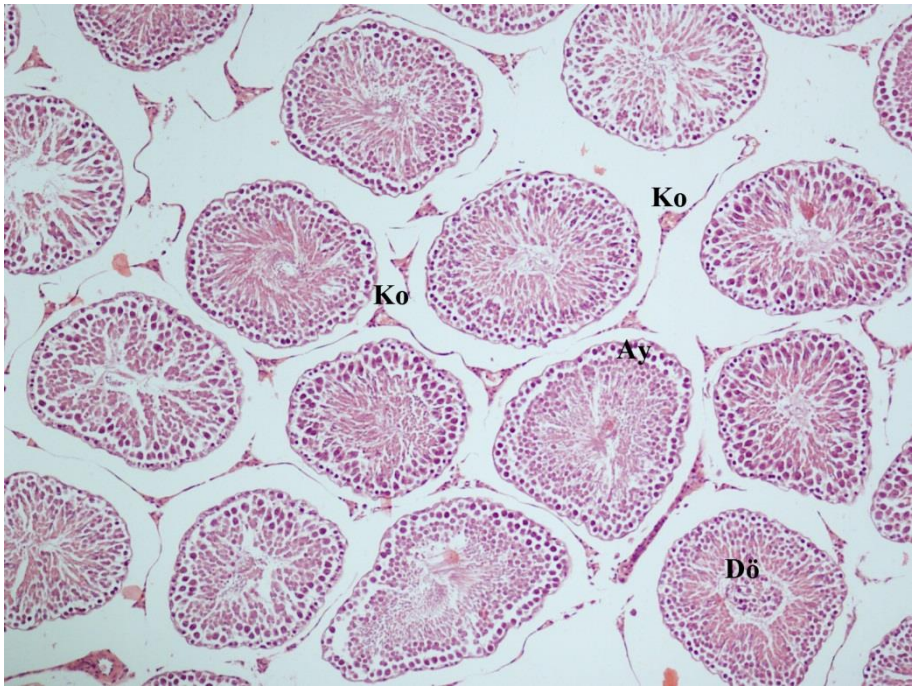
Şekil 24. Siklofosfamid grubuna ait kesit büyük büyütmeden incelendiğinde, seminifer epitel kalınlığının azaldığı, germinal seri hücreleri arasında vakuolizasyonların (V) belirgin bir şekilde yer aldığı hasarlı bir seminifer tübül görülmektedir. Dejenere olmuş interstisyel bağ dokusu ve interstisyel aralıkta genişleme ile hemoraji (He) varlığı dikkat çekmektedir. H&E, x400.



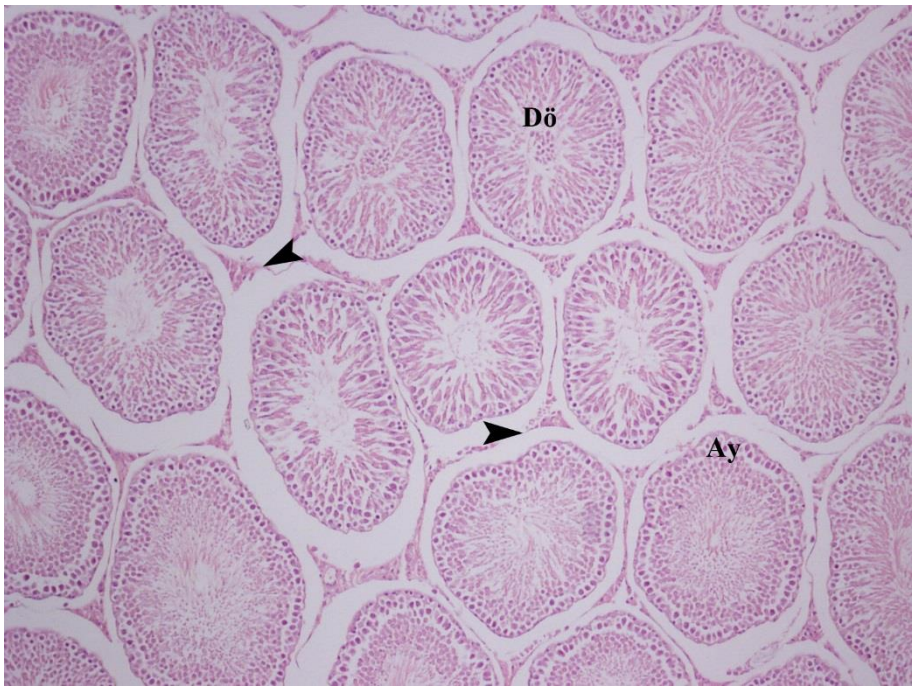
Şekil 25. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, germinal seri hücreleri arasında vakuolizasyonun (V) hakim olduğu hasarlı seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel aralıkta kan damarlarının yapısının bozulmasıyla hemoraji (He) odaklarının ortaya çıktığı ve bu sahalarda kan hücrelerinin interstisyel aralığa yayılım gösterdiği dikkat çekmektedir. H&E, x400.



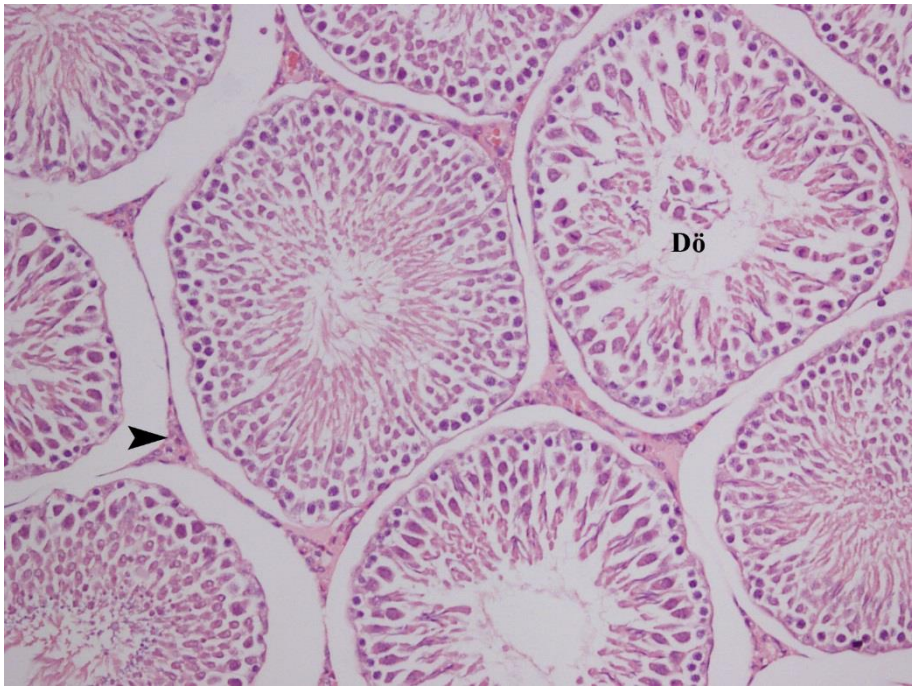
Şekil 26. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde hem ayrılma (Ay) ve hem de lümene dökülmüş immatür hücrelerin (Dö) görüldüğü hasarlı bir seminifer tübül gözlenmektedir. H&E, x400.



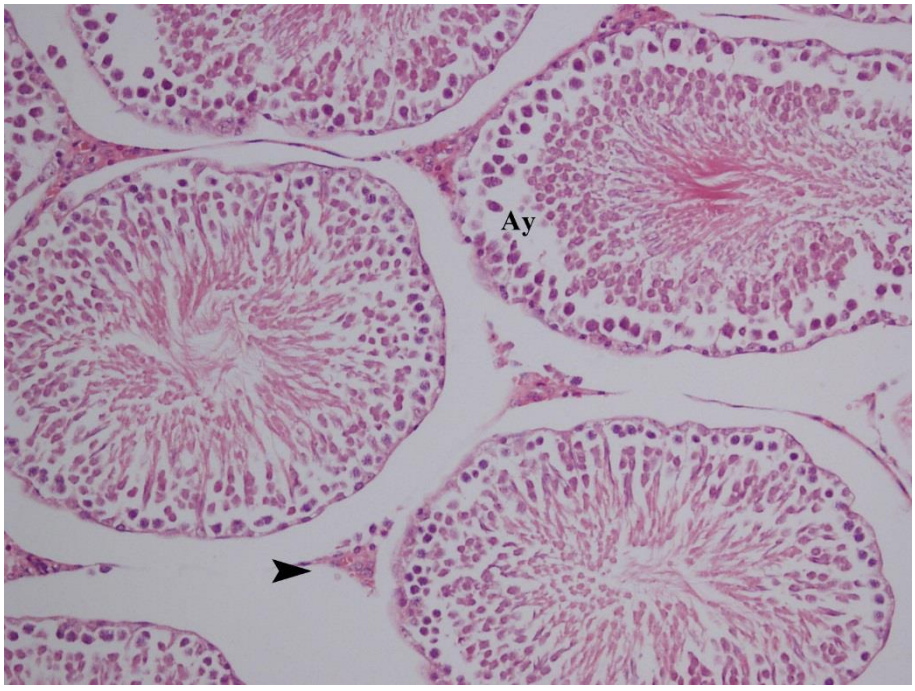
Şekil 27. Siklofosfamid+Quercetin grubu testis kesitinde, normal veya normale yakın görünüme sahip aktif spermatogenez görülen seminifer tübüllerin kısmen yapılarını korudukları, az sayıda tübülde ayrılma (Ay) ve immatür hücre dökülmesi (Dö) olduğu, buna ek olarak interstisyel aralığın (ok başı) daha az genişleme gösterdiği ve nispeten yapısal bütünlüğünü koruduğu gözlenmektedir. Ayrıca, interstisyel aralıkta bazı sahalarda konjesyonun (Ko) devam ettiği görülmektedir. H&E, x100.



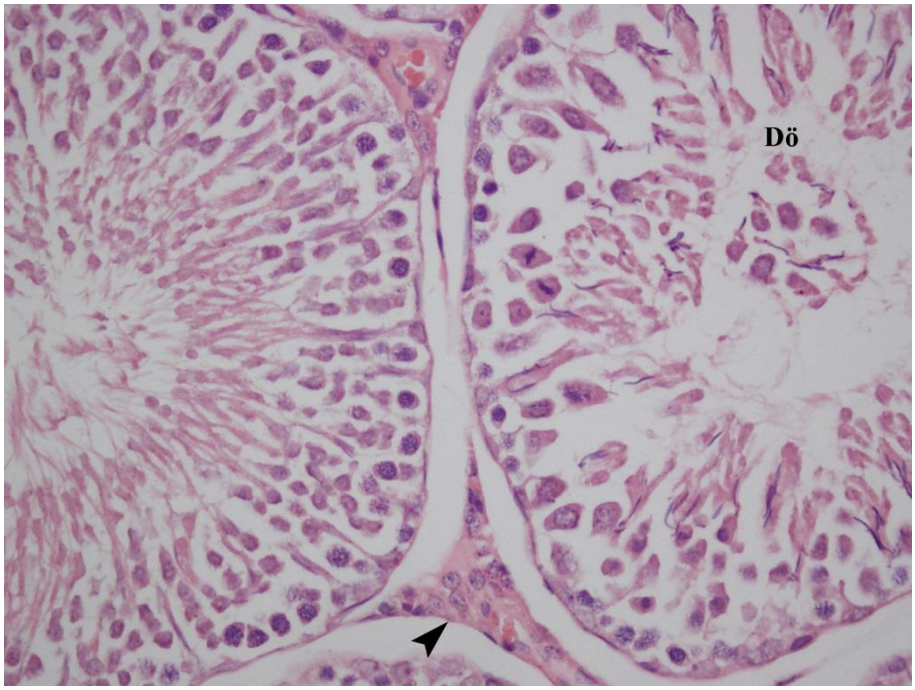
Şekil 28. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde, çoğunlukla normal veya normale yakın görünümlü olan seminifer tübüllerin arasında, yer yer lümene dökülen immatür hücreleri olan (Dö) ve ayrılmanın (Ay) görüldüğü tübüller çok daha az sayıda bulunmaktadır. İnterstisyel aralıkta (ok başı) daha az genişleme görüldüğü dikkati çekmektedir. H&E, x100.



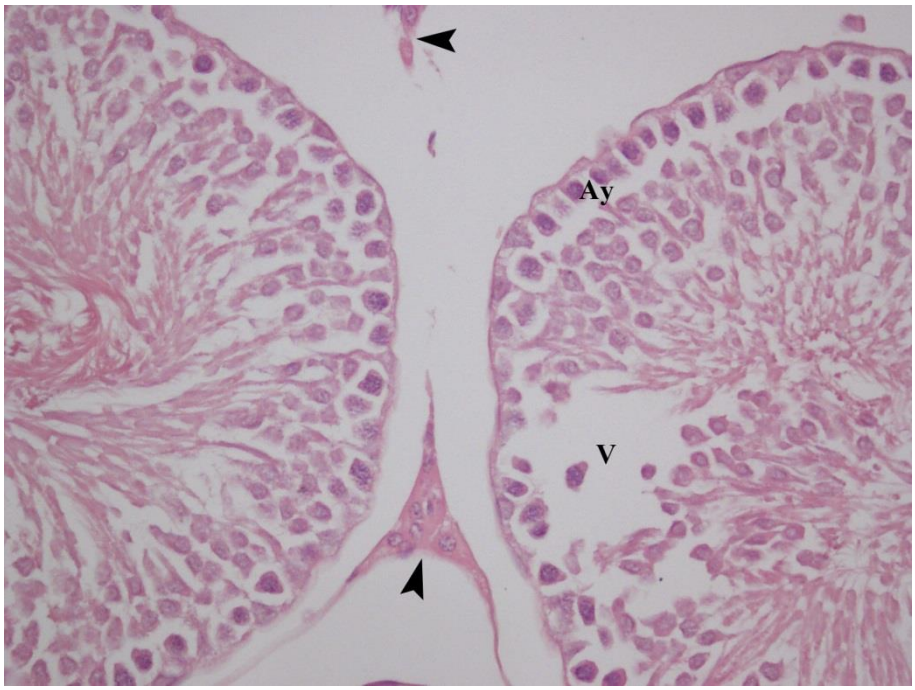
Şekil 29. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesiti daha büyük büyütmeden incelendiğinde, normal yapıda ve spermatogenezin aktif olarak devam ettiği normal görünümlü seminifer tübüller arasında, lümene dökülen immatür hücrelerin bulunduğu daha az sayıdaki seminifer tübüller (Dö) göze çarpmaktadır. Ayrıca, tübüller arasındaki interstisyel aralıkların (ok başı) daha düzenli olduğu ve genişlemenin azaldığı dikkat çekmektedir. H&E, x200.



Şekil 30.Siklofosfamid+Quercetin grubu testis kesitindeki aktif spermatogenezin görüldüğü normal yapıdaki seminifer tübüller arasında ayrılma (Ay) gözlenen bir seminifer tübül ile birlikte, interstisyel aralığın daha az genişleme gösterdiği (ok başı) izlenmektedir. H&E, x200.



Şekil 31. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitindeki izlenen iki seminifer tübülden biri normal görünümlü ve aktif olarak spermatogenez gözlenirken, diğer tübül (Dö) kesitinde lümene dökülmüş immatür hücrelerin olduğu dikkat çekmektedir. İnterstisyel aralık (ok başı) düzenli bir görünüm sergilemektedir. H&E, x400.



Şekil 32. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde spermatogenezin aktif olarak görülebildiği normal görünümlü bir seminifer tübül kesiti gözlenirken, diğer tübül kesitinde ayrılma (Ay) ve germinal seri hücreleri arasında yer alan vakuolizasyon (V) izlenmektedir. Ayrıca interstisyel aralığın (ok başı) düzenli olduğu ve daha az genişleme gösterdiği görülmektedir. H&E, x400.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarına ait testis dokularındaki NFkB, Nrf2, Bax ve Bcl-2 immünohistokimyasal boyamalar sonucunda, immünoreaktiviteleri AEC kromojenin kırmızı renk reaksiyonu vermesiyle sitoplazmik boyanma paterni ile izlenmiştir. Tüm gruplara ait belirlenen HSCORE değerleri ve bu verilere ait istatistiksel değerlendirmeler Tablo 6'da belirtilmiştir.

NFkB İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Kontrol grubuna ait testis seminifer tübül kesitlerinde özellikle primer spermatositler zayıf şiddette, spermatidler ise zayıf veya çok zayıf şiddette sitoplazmik boyanma sergiledi. Spermatogonyumlar ve Sertoli hücrlerinde herhangi bir boyanma görülmedi. Buna ek olarak testis interstisyumundaki Leydig hücrelerinde de NFkB immünoreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 33,34). QRC grubu testis kesitlerindeki immünoreaktivite değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla, bir miktar azalma ile birlikte anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$; Şekil 35,36; Tablo 6). CP enjeksiyonu yapılan deneklerin testis seminifer tübül kesitlerinde ise özellikle primer spermatositlerde güçlü şiddette boyanma izlenirken, spermatidlerde orta veya güçlü immünoreaktivite vardı. Seminifer tübüllerdeki spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve interstisyel aralıkta yer alan Leydig hücrelerinde boyanma daha çok zayıf veya orta şiddette görüldü (Şekil 37-39). CP grubu dokularındaki mevcut NFkB immünoreaktivitesinin kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 6). CP enjeksiyonu ile birlikte QRC verilen gruba ait testis kesitlerindeki NFkB immünoreaktivitesi, CP grubuna kıyasla azalma göstermişti ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$; Tablo 6). Boyanma, primer spermatositlerde ve spermatidlerde nispeten zayıf veya orta şiddette izlenirken, spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ve interstisyel aralıktaki Leydig hücrelerinde zayıf olarak değerlendirildi (Şekil 40-42). Negatif kontrol kesitlerine diğer kesitlerden farklı olarak primer antikor yerine PBS damlatıldı ve herhangi bir boyanma görülmedi (Şekil 43).

Nrf2 İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Çalışmamızda kontrol grubuna ait testis dokularındaki Nrf2 immünoreaktivitesi değerlendirildiğinde, seminifer epiteldeki germinal seri hücreleri ve Sertoli hücrelerinde güçlü veya orta şiddette ve sitoplazmik boyanma olarak izlendi. Seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel bağ dokudaki Leydig hücrelerinde boyanma genellikle zayıf veya orta şiddette

görüldü (Şekil 44,45). QRC grubu kesitlerindeki immünoreaktivite değerlendirildiğinde boyanmanın benzer şekilde olduğu gözlendi ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$; Şekil 46,47). CP grubu deneklerin testis seminifer tübül kesitlerinde ise tüm seminifer epitel hücrelerinde zayıf şiddette boyanma izlenirken, interstisyel aralıkta yer alan Leydig hücrelerinde boyanma çok zayıf olarak gözlendi (Şekil 48-50). CP grubundaki Nrf2 immünoreaktivitesinin kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 6). CP'ye ek olarak QRC verilen gruba ait hayvanların testis kesitlerindeki Nrf2 immünoreaktivitesi, CP grubu ile kıyaslandığında artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$; Tablo 6). Bu gruptaki boyanma, genellikle Sertoli hücreleri ve germinal seri hücrelerinde orta veya zayıf şiddette izlenirken, interstisyel aralıktaki Leydig hücrelerinde zayıf şiddette boyanma olarak değerlendirildi (Şekil 51-53).

Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine PBS damlatıldı ve yapılan boyama sonucunda herhangi birimmünoreaktivite görülmedi (Şekil 54).

Bax İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Çalışmamızda testis dokularındaki Bax immünoreaktivitesi değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki seminifer tübüllerde başlıca primer spermatositlerde olmak üzere zayıf şiddette boyanma izlendi. İnterstisyel aralıkta bulunan Leydig hücreleri ise çoğunlukla çok zayıf boyanma gösterdi (Şekil 55,56). QRC verilen gruptan elde edilen kesitlerde kontrol grubuna benzer özellikte boyanma tespit edildi ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$; Şekil 57,58). CP grubundan alınan doku kesitlerinde özellikle primer spermatositler ve spermatidler başta olmak üzere tüm seminifer epitelde güçlü şiddette Bax immünoreaktivitesi gözlendi. Güçlü Bax immünoreaktivitesinin özellikle perinükleer yerleşim gösterdiği izlendi. Seminifer tübüller arasındaki interstisyel aralıkta ise orta veya güçlü şiddette boyanma gösteren Leydig hücreleri görüldü (Şekil 59-61). CP grubu dokularındaki mevcut Bax immünoreaktivitesinin kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 6). CP'ye ilaveten QRC'nin verildiği tedavi grubundaki hayvanlara ait testis doku kesitlerindeki Bax immünoreaktivitesi ise CP grubuna kıyasla azalma göstermişti ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$; Tablo 6). CP+QRC grubuna ait testis dokulardaki boyanma, primer spermatositlerde ve spermatidlerde nispeten zayıf veya orta

şiddette izlenirken, diğer tübül epitel hücreleri ve interstisyel aralıktaki Leydig hücrelerinde zayıf olarak değerlendirildi (Şekil 62-64).

Yapılan negatif kontrol kesit boyamalarında diğer kesitlerden farklı olarak primer antikor yerine PBS damlatıldı ve herhangi bir boyanma tespit edilmedi (Şekil 65).

Bcl-2 İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Tüm gruplara ait testis doku kesitlerindeki Bcl-2 immünoreaktiviteleri incelendiğinde, kontrol grubundaki seminifer tübüllerde başlıca primer spermatositler ve tübül lümenine yakın yerleşen spermatidler olmak üzere seminifer epitelin diğer kısımlarında orta şiddette sitoplazmik boyanma görüldü. Bunun yanı sıra, seminifer tübüller arasındaki interstisyel aralıkta Leydig hücrelerinde orta veya zayıf şiddette boyanma görüldü (Şekil 66,67). QRC grubunda immünoreaktivite kontrol grubuna benzer şekilde gözlendi ve kontrol grubuna kıyasla bir fark saptanmadı ($p>0,05$; Şekil 68,69). CP gurubu seminifer tübül kesitleri incelendiğinde Bcl-2 boyanma paterni kontrol ve QRC grubundakiler ile korelasyon gösterirken, boyanma kontrol ve QRC gruplarına kıyasla zayıf şiddette idi. İnterstisyel bağ dokuda yer alan Leydig hücrelerinde de zayıf veya çok zayıf immünoreaktivite izlendi (Şekil 70-72). CP grubu testis dokularındaki Bcl-2 immünoreaktivitesinin, kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi (her iki değer için $p<0,001$; Tablo 6). CP ile birlikte QRC verilen tedavi grubuna ait testis doku kesitlerindeki Bcl-2 immünoreaktivitesi ise CP grubuna kıyasla artış göstermişti ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$; Tablo 6). Bu gruba ait dokularda boyanma, primer spermatositlerde ve spermatidlerde zayıf veya yer yer orta şiddette izlenirken, diğer tübül epitel hücrelerinde zayıf şiddette, interstisyel aralıktaki Leydig hücrelerinde ise zayıf veya orta şiddette boyanma olarak değerlendirildi (Şekil 73-75).

Negatif kontrol boyamalarında diğer kesitlerden farklı olarak primer antikor yerine PBS damlatıldı ve herhangi bir boyanma tespit edilmedi (Şekil 76).

Tablo 6. Kontrol ve deney gruplarındaki NFkB, Nrf2, Bax ve Bcl-2 immünoreaktivitelerinin karşılaştırılması

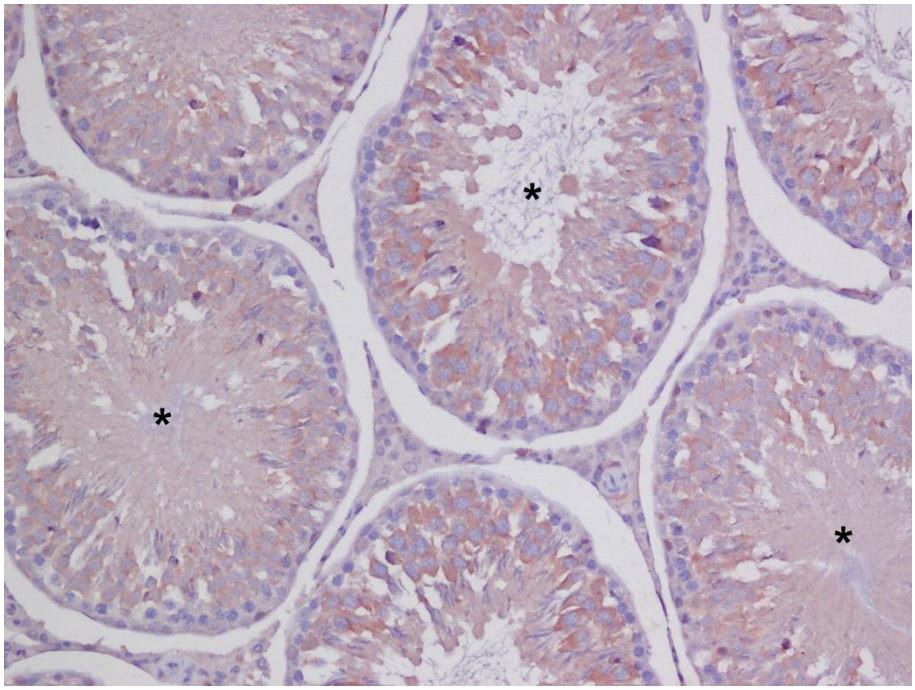
Parametre	Kontrol (n=10)	QRC (n=10)	CP (n=10)	CP+Q (n=10)	p değeri
NFkB (HSCORE)	110±14,91	89±17,13	210,50±22,29*†	154±17,61*†#	p<0,001
Nrf2 (HSCORE)	160,50±9,85	173±11,60	101±12,20*†	136,50±10,55*†#	p<0,001
Bax (HSCORE)	106±11,74	102±10,33	205±17,32*†	150±19*†#	p<0,001
Bcl-2 (HSCORE)	169,50±13,63	170±16,83	96,50±11,07*†	145±18,63*†#	p<0,001

Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.

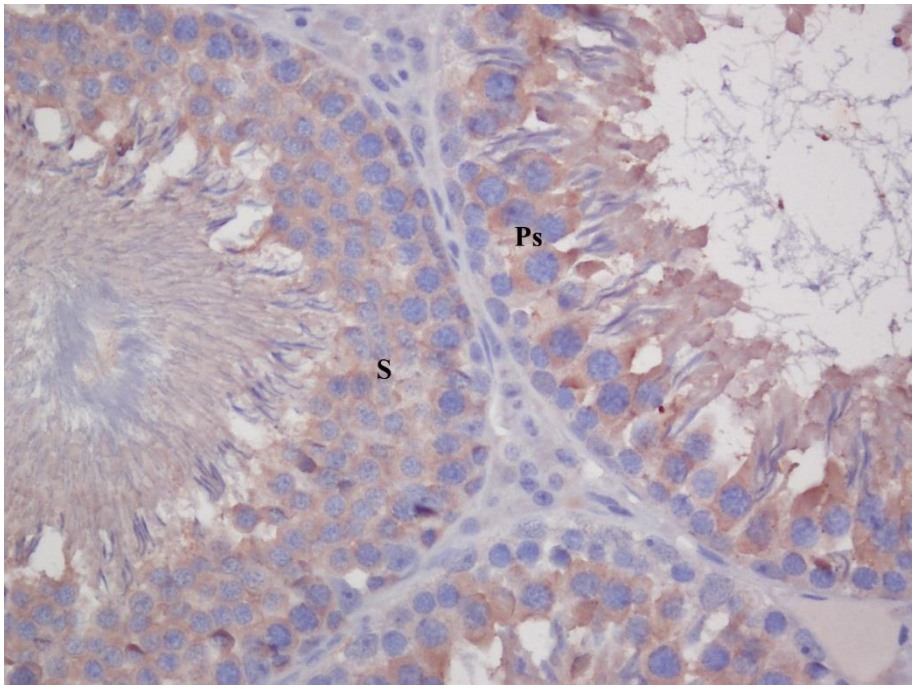
*** p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında**

† p<0,001 QRC ile karşılaştırıldığında

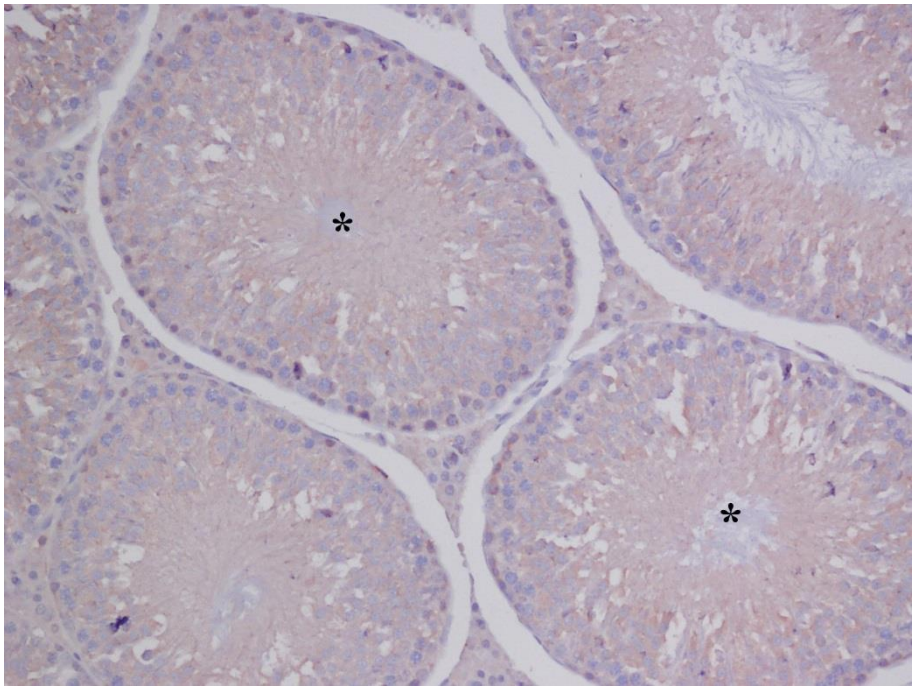
 # p<0,001 CP ile karşılaştırıldığında.



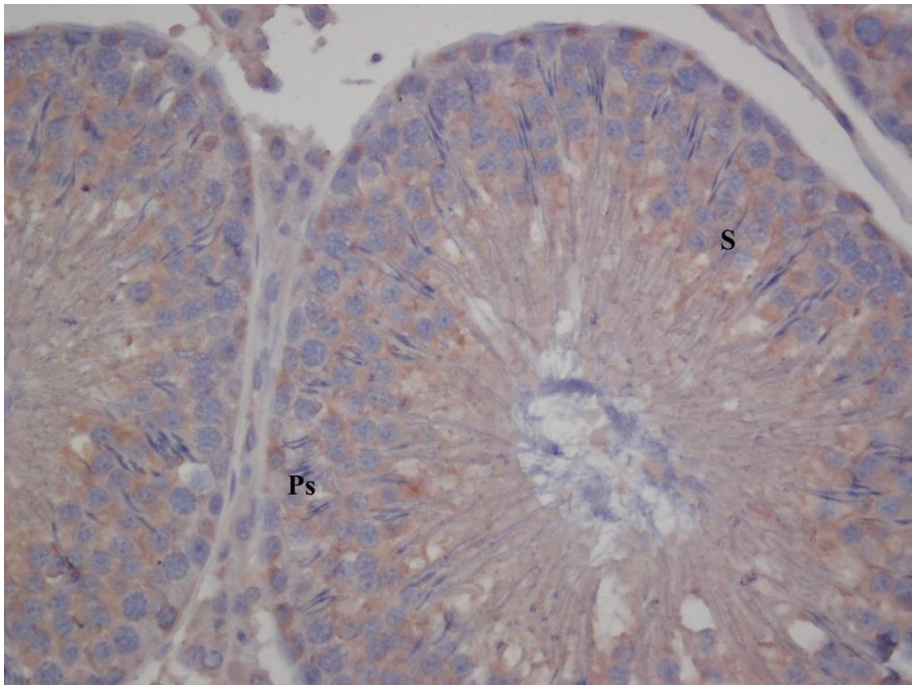
Şekil 33. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, normal yapıdaki seminifer tübüllerde (yıldız) yer alan germinal seri hücrelerinin zayıf immünoreaktivite gösterdiği görülmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200.



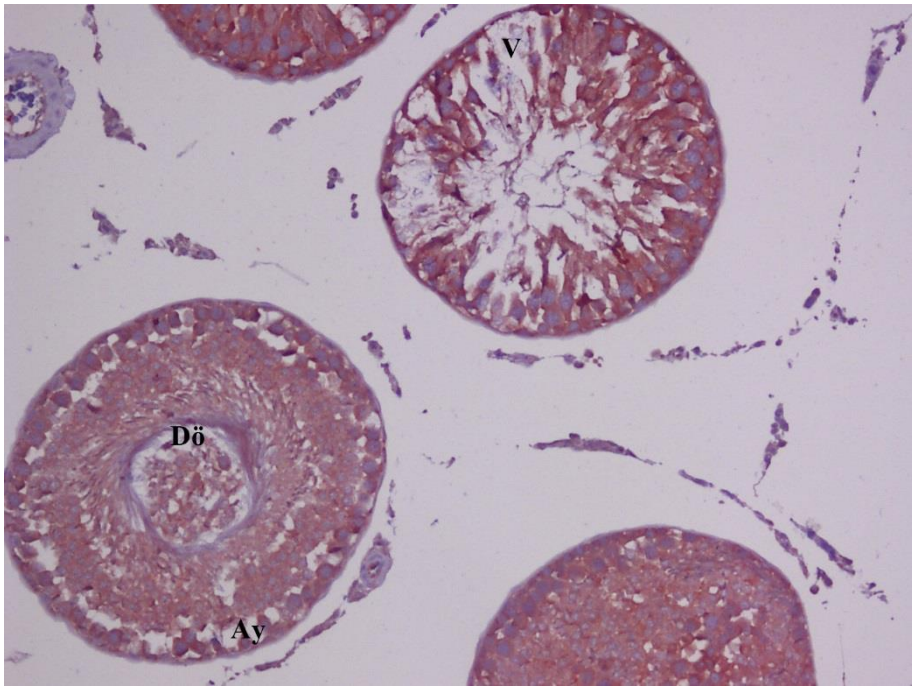
Şekil 34. Kontrol grubuna ait testis kesitindeki iki seminifer tübülde özellikle primer spermatositlerin (Ps) ve spermatidlerin (S) zayıf immünoreaktivite gösterdiği dikkat çekmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400.



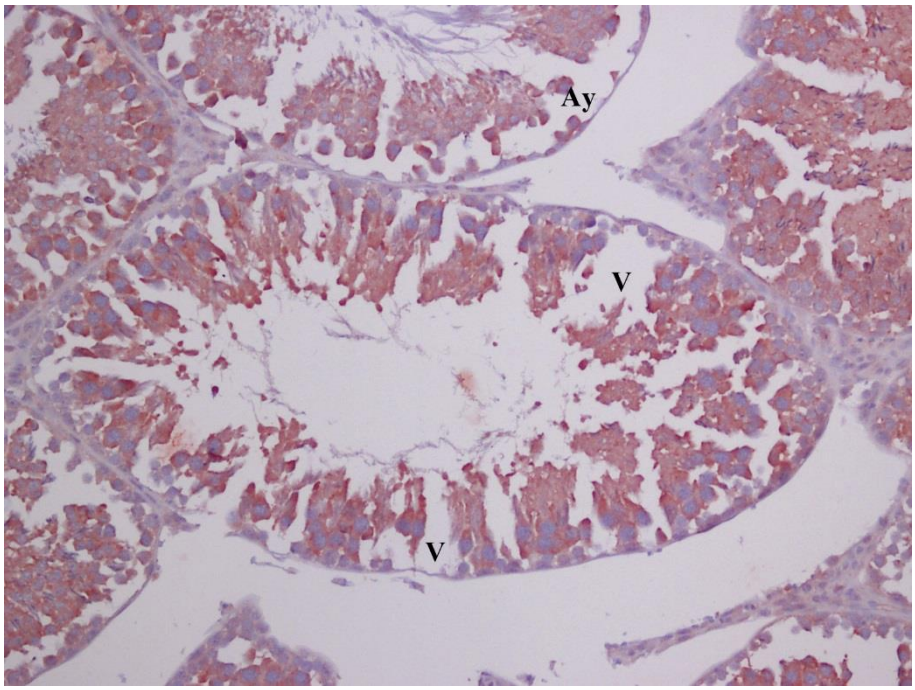
Şekil 35. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, normal yapıdaki seminifer tübüllerde (yıldız) germinal seri hücrelerinin zayıf-çok zayıf immünoreaktivite gösterdiği izlenmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200.



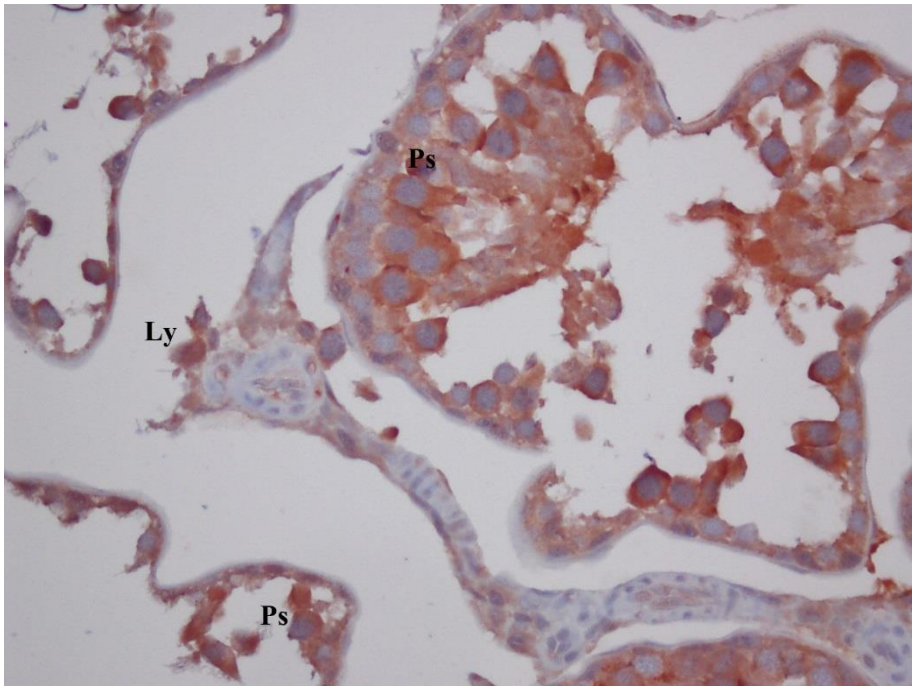
Şekil 36. Quercetin grubuna ait testis kesitindeki bir seminifer tübülde özellikle primer spermatositlerin (Ps) ve spermatidlerin (S) zayıf-çok zayıf immünoreaktivite gösterdiği dikkat çekmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400.



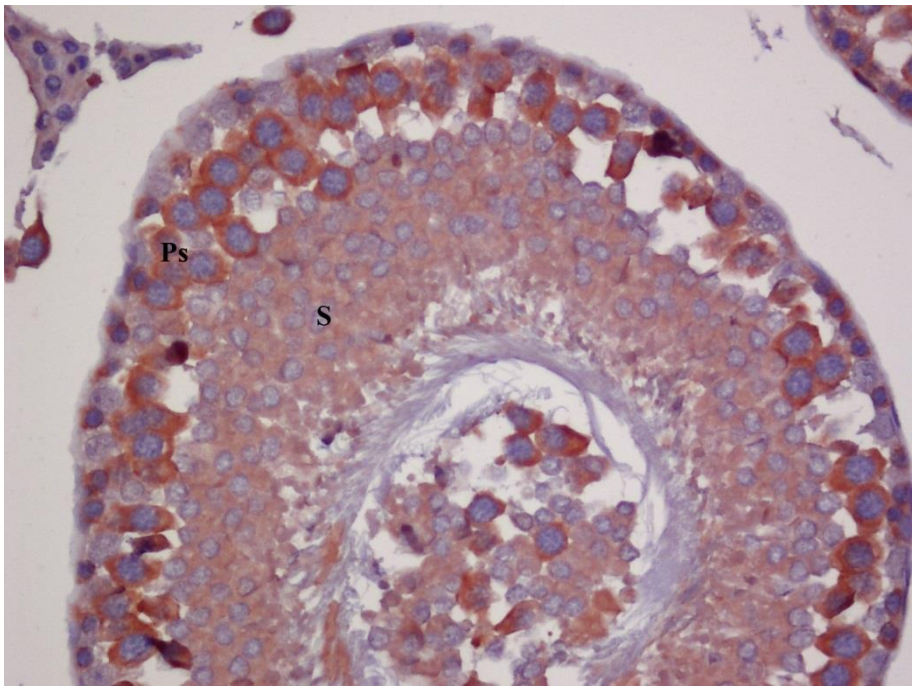
Şekil 37. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, germinal seri hücreleri arasında vakuolizasyon (V) ile lümeninde dökülen immatür hücrelerin (Dö) bulunduğu ve aynı zamanda ayrılmanın (Ay) da görüldüğü seminifer tübüllerde güçlü derecede immünoreaktivite gösteren primer spermatositler ile orta veya güçlü şiddette immünoreaktivite gösteren diğer germinal seri hücreleri görülmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200.



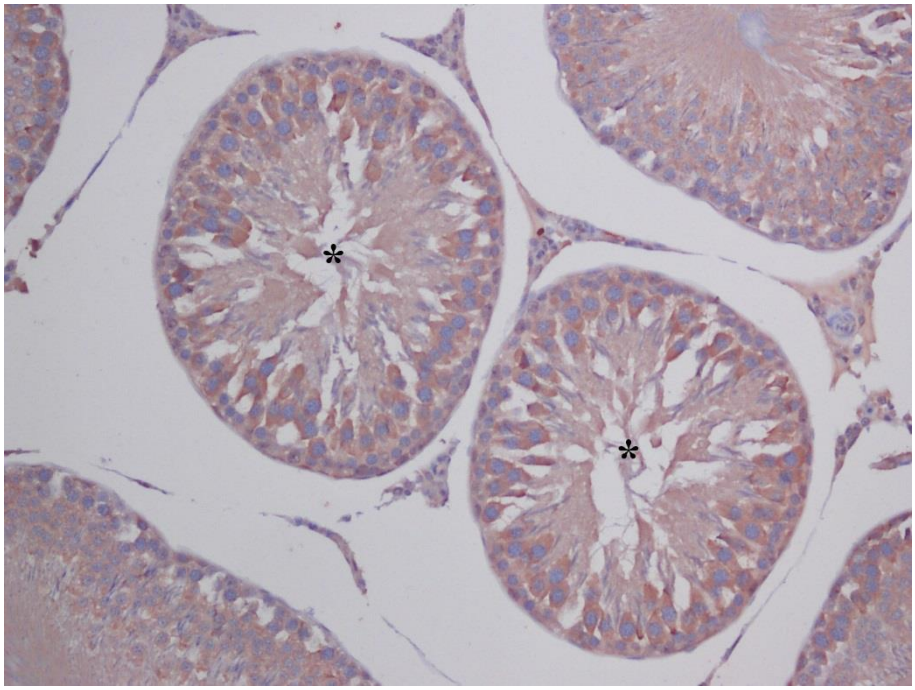
Şekil 38. Siklofosfamid grubuna ait ayrılan (Ay) ve değişen büyüklükte vakuollerin yer aldığı vakuolize (V) seminifer tübülde güçlü-orta derecede immünoreaktivite gösteren germinal seri hücreleri gözlenmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200.



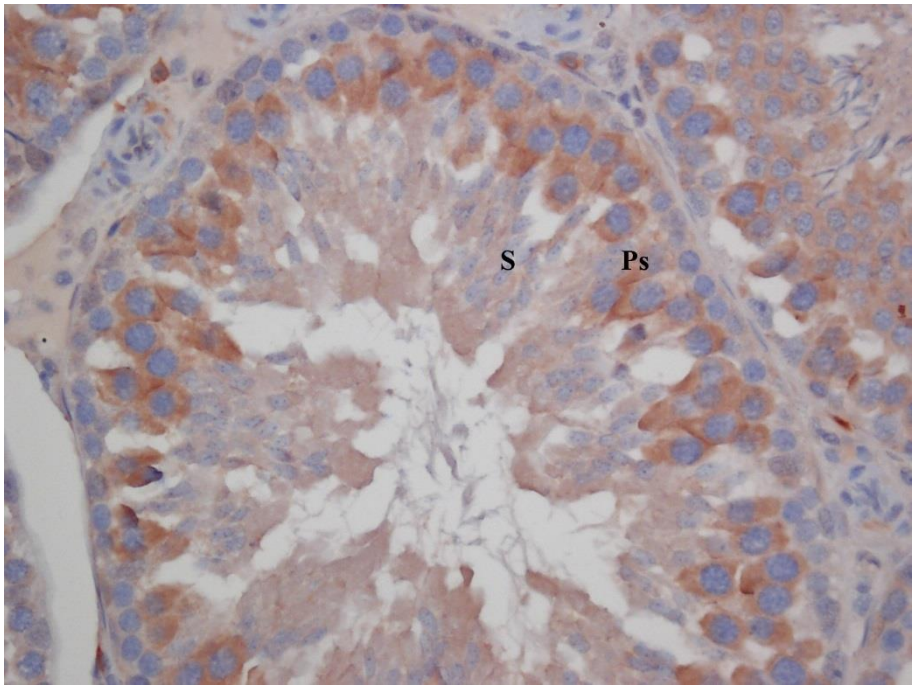
Şekil 39. Siklofosfamid grubuna ait yüksek derecede hasarlı görünen seminifer tübüllerde germinal seri hücre kayıpları belirgin olarak bulunmaktadır. Tübüller içerisinde güçlü düzeyde immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (Ps) ile interstisyel aralıkta orta düzeyde immünoreaktivite gösteren Leydig hücreleri (Ly) dikkat çekmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400.



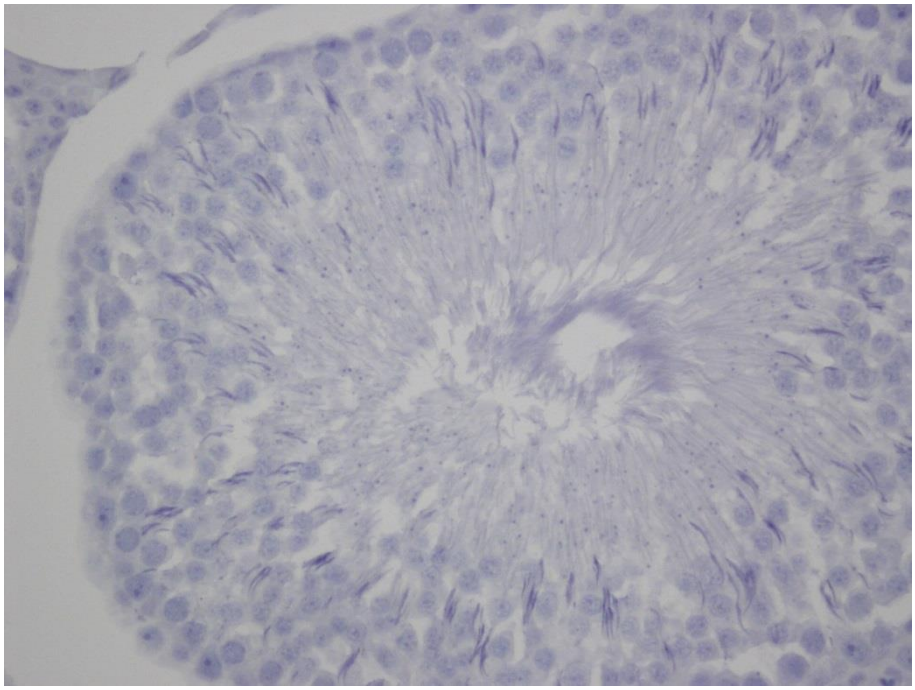
Şekil 40. Siklofosfamid grubuna ait dökülen immatür hücrelerin görüldüğü bir seminifer tübül kesitinde, güçlü immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (Ps) ve orta düzeyde immünoreaktivite gösteren spermatidler (S) yer almaktadır. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400.



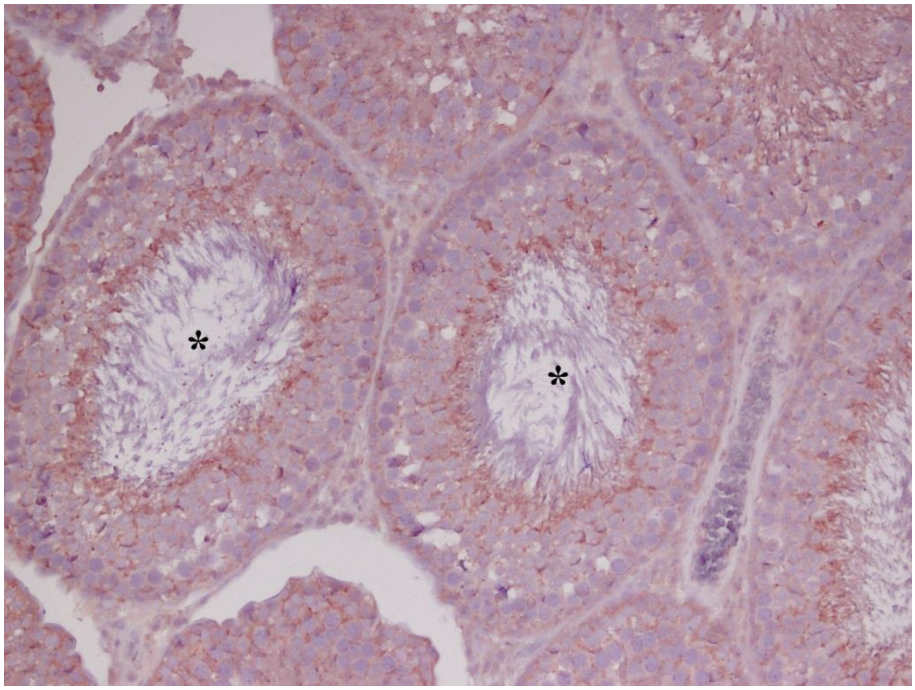
Şekil 41. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde, orta veya zayıf şiddette immünoreaktivite gösteren germinal seri hücreleri normale yakın seminifer tübüllerde (yıldız) görülmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200.



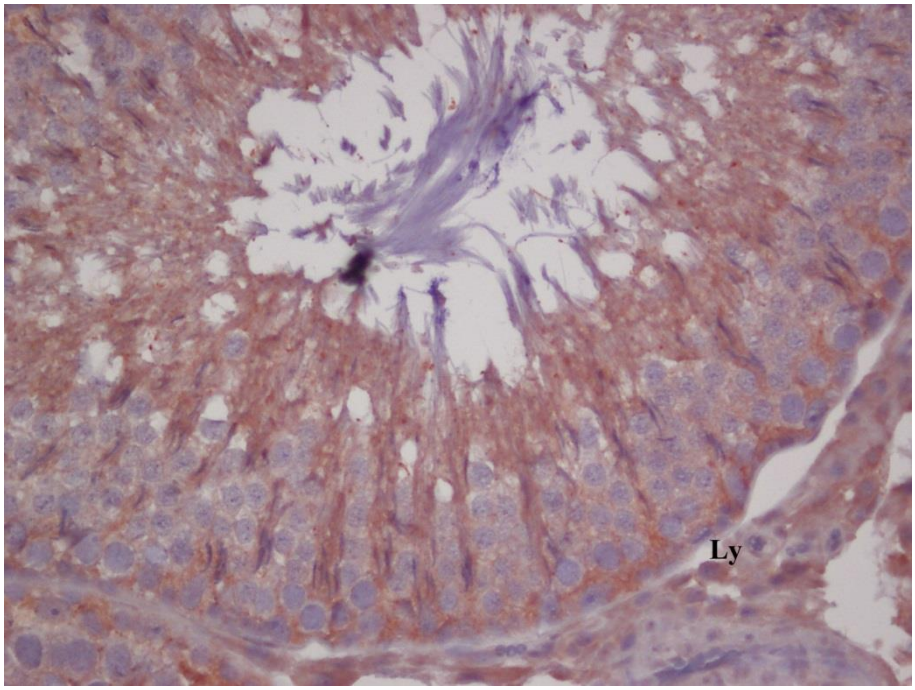
Şekil 42. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait görülen bir seminifer tübül kesitinde orta düzeyde immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (Ps) ve zayıf immünoreaktivite gösteren spermatidler (S) görülmektedir. NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400.



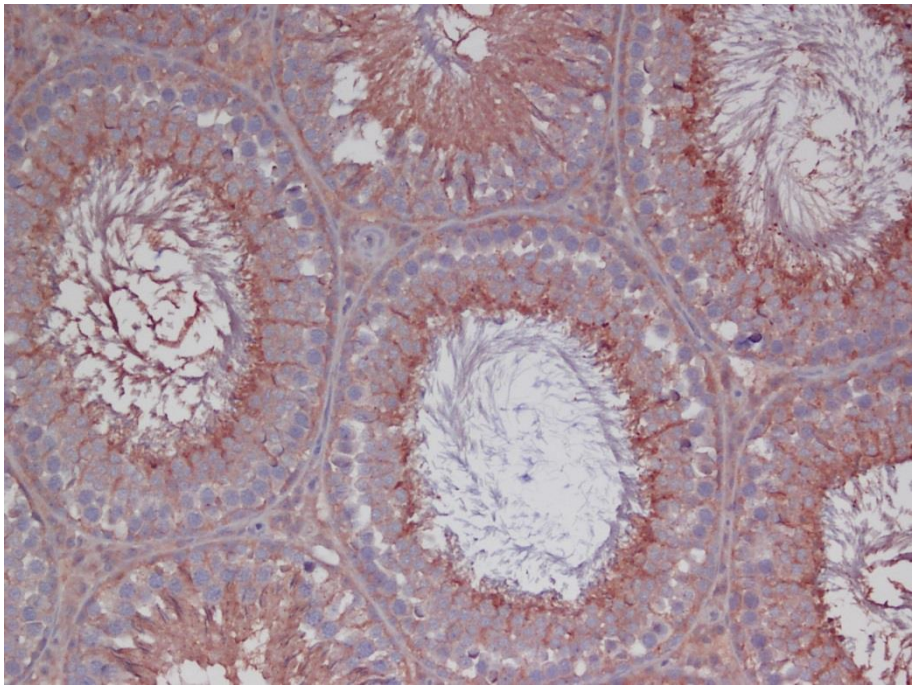
Şekil 43. Testis kesitinde görülen seminifer tübülün NFkB için yapılan negatif boyaması izlenmektedir. Negatif, hematoksilen zıt boyaması, x400.



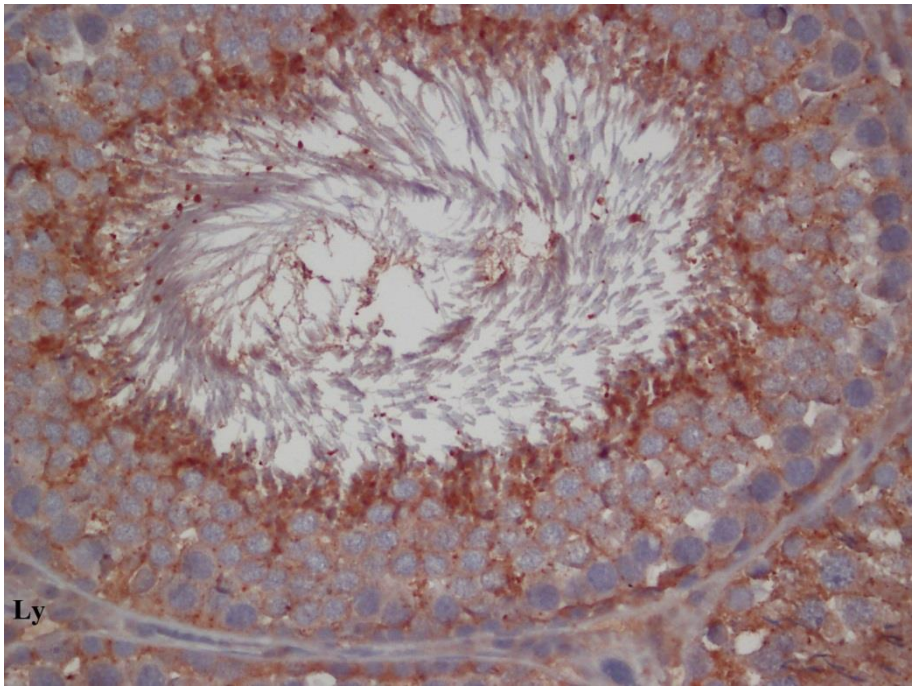
Şekil 44. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, normal yapıdaki seminifer tübül (yıldız) epitel hücrelerinin orta veya güçlü şiddette immünoreaktivite gösterdiği gözlenmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



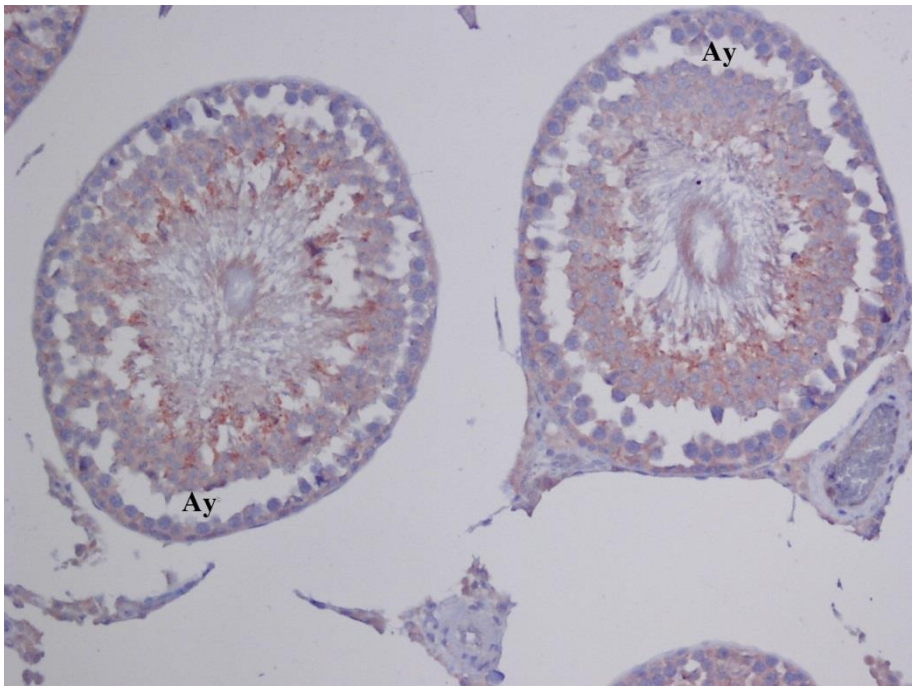
Şekil 45. Kontrol grubuna ait testis kesitindeki büyük büyütmede incelenen bir seminifer tübülün epitel hücrelerinde orta veya güçlü şiddette immünoreaktivite görülmektedir. İnterstisyel aralıkta yer alan Leydig hücreleri (Ly) ise orta şiddette immünoreaktiviteye sahiptir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



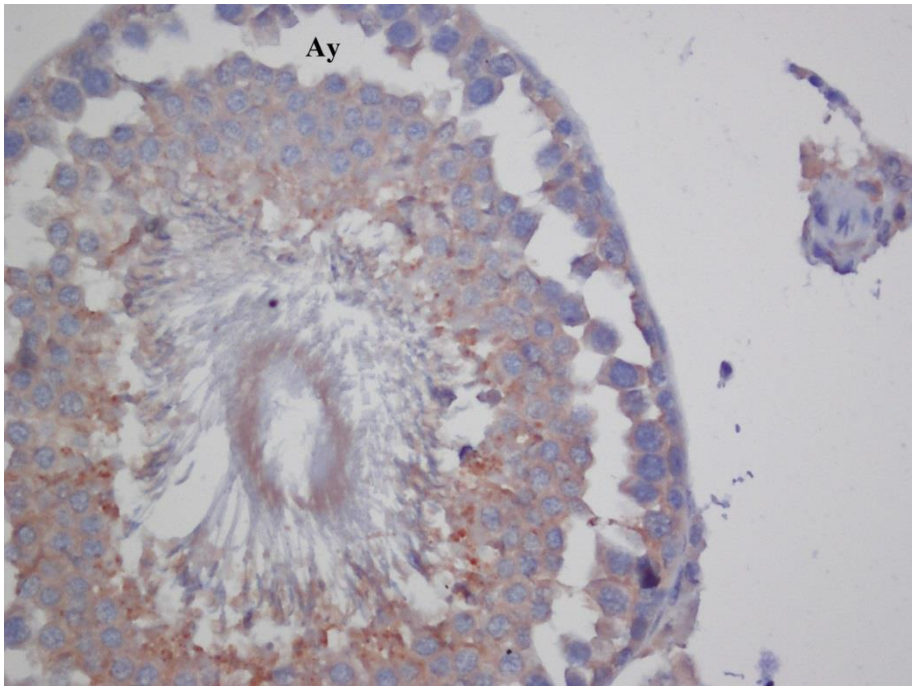
Şekil 46. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, seminifer tübüllerdeki (yıldız) spermatidlerin kontrol gurubuyla benzer olarak orta veya güçlü immünoreaktivite gösterdiği izlenmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



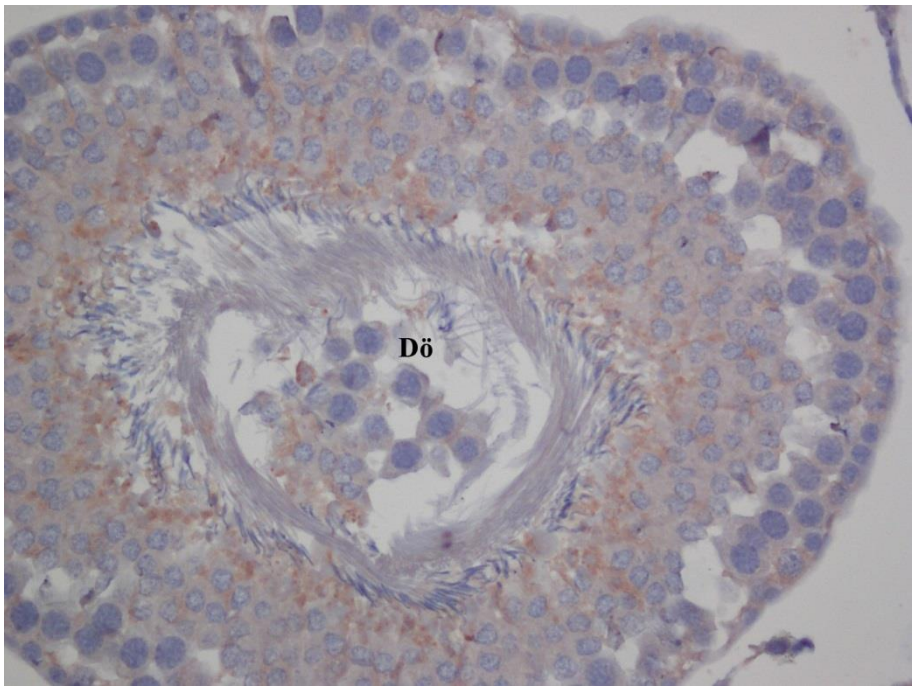
Şekil 47. Quercetin grubuna ait testis kesitindeki bir seminifer tübül epiteli büyük büyütmeden incelendiğinde orta veya güçlü immünoreaktivite gözlenmektedir. Ayrıca, Leydig hücreleri (Ly) ise orta şiddette immünoreaktivite göstermektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



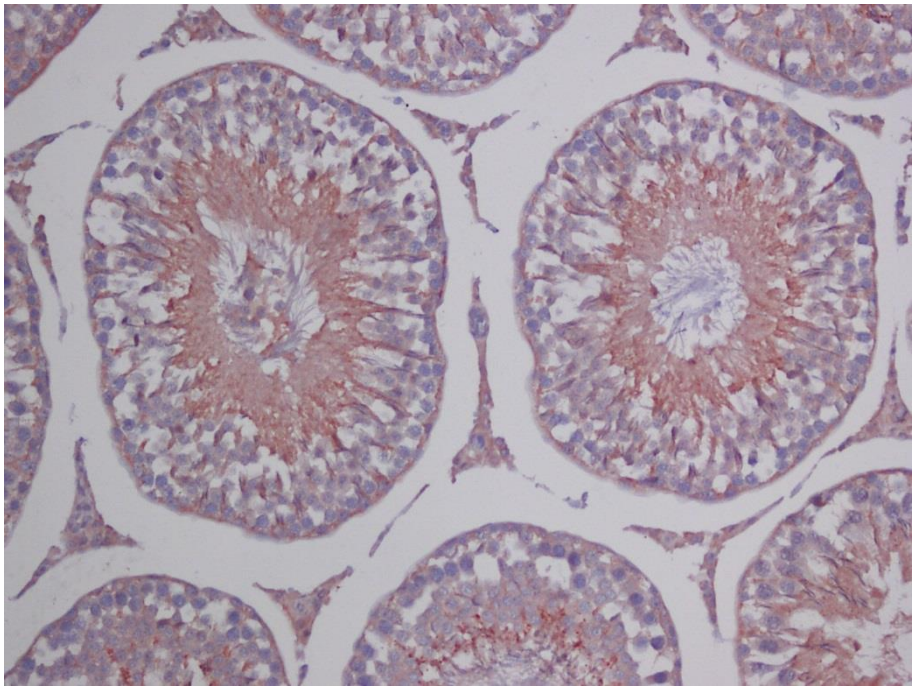
Şekil 48. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, ayrılmanın (Ay) görüldüğü iki seminifer tübül epitelinde zayıf veya çok zayıf immünoreaktivite görülmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



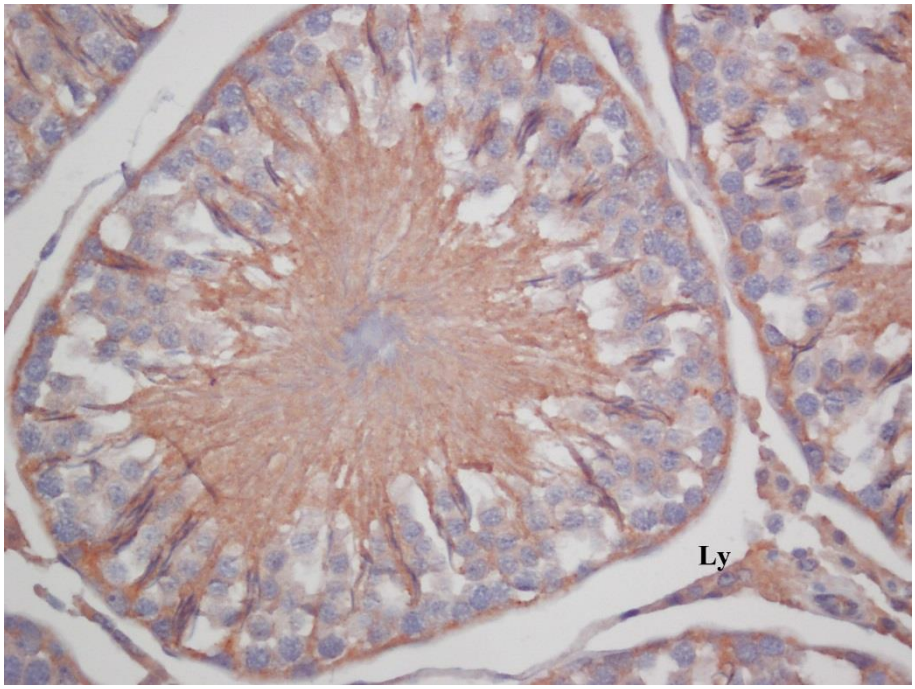
Şekil 49. Siklofosfamid grubuna ait ayrılmanın (Ay) görüldüğü, Şeki 48'de yer alan seminifer tübüllerden biri büyük büyütmede incelendiğinde, bir seminifer tübül epitelinde zayıf şiddette immünoreaktivite görülmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



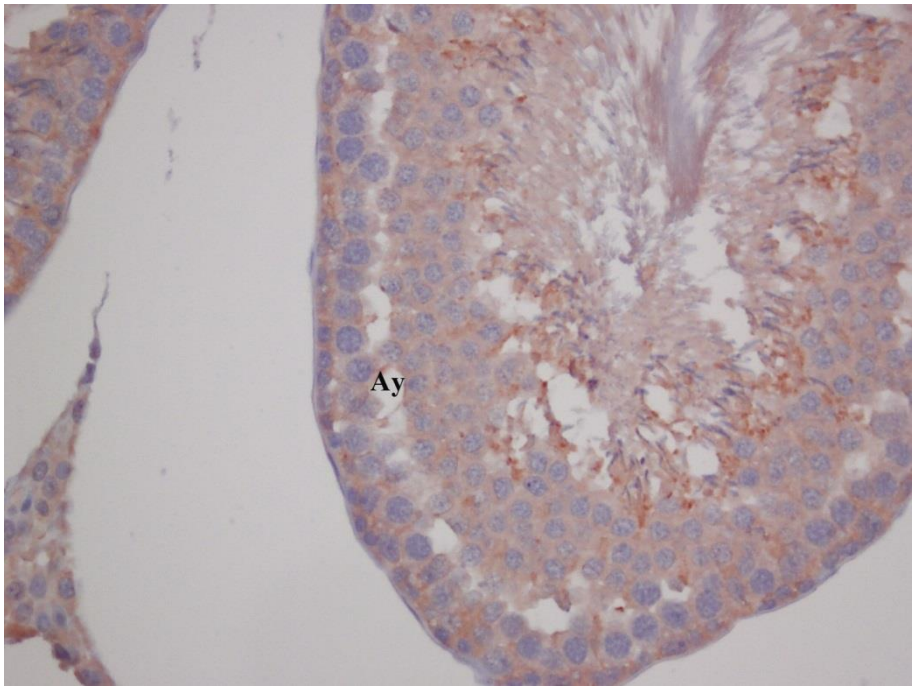
Şekil 50. Siklofosfamid grubuna ait lümeninde immatür hücrelerin görüldüğü dökülen (Dö) bir seminifer tübülde diğer hasarlı tübüllere benzer paternde zayıf şiddette immünoreaktivite izlenmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



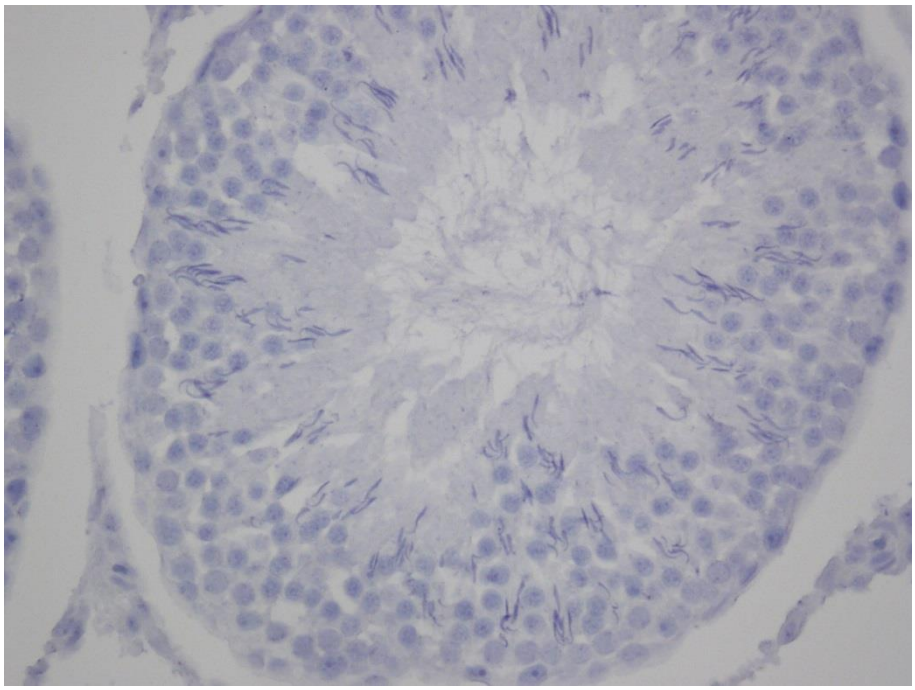
Şekil 51. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde, normale yakın veya az hasarlı seminifer tübüllerin epiteli orta şiddette immünoreaktivite göstermektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



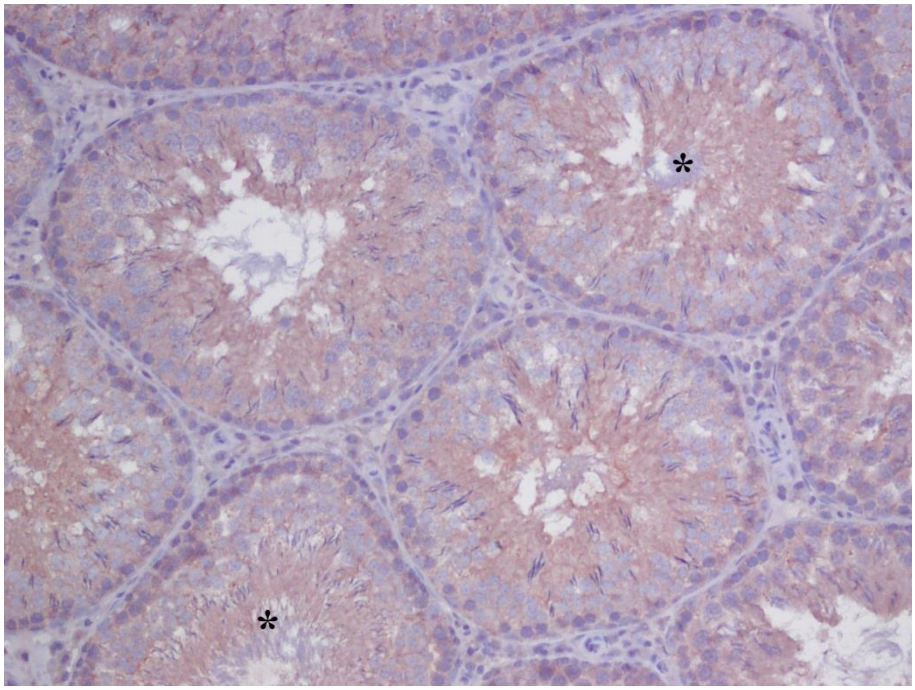
Şekil 52. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait bir seminifer tübül epitelinde orta-zayıf derecede immünoreaktivite görülmektedir. İnterstisyel aralıkta bulunan Leydig hücrelerinin (Ly) zayıf şiddette immünoreaktivitesi dikkat çekmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



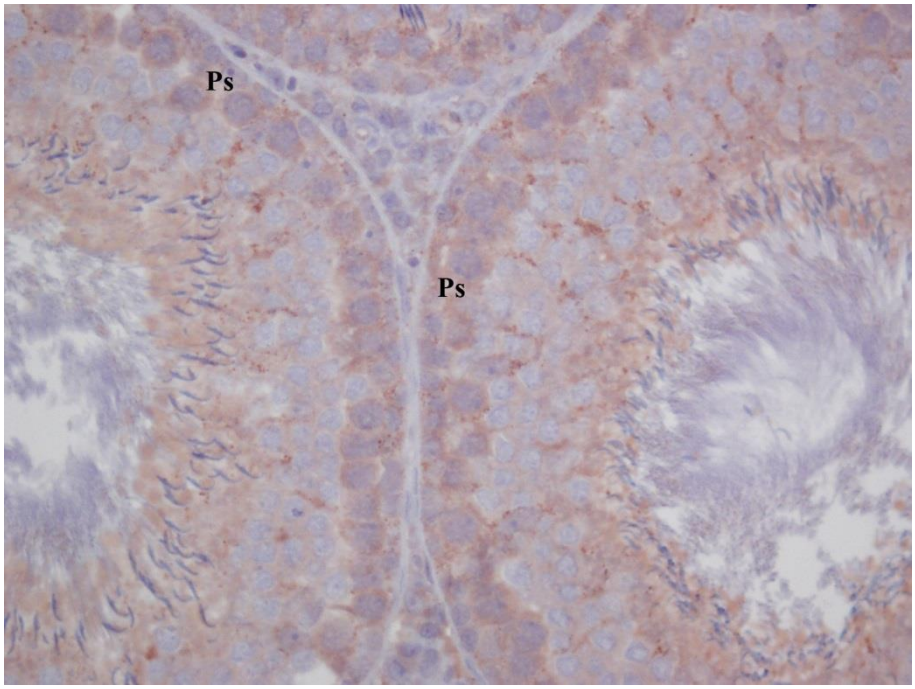
Şekil 53. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait germinal seri hücreleri arasında hafif ayrılma (Ay) görülen bir seminifer tübül kesitinde orta-zayıf düzeyde immünoreaktivite gösteren germinal seri ve Sertoli hücreleri görülmektedir. Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



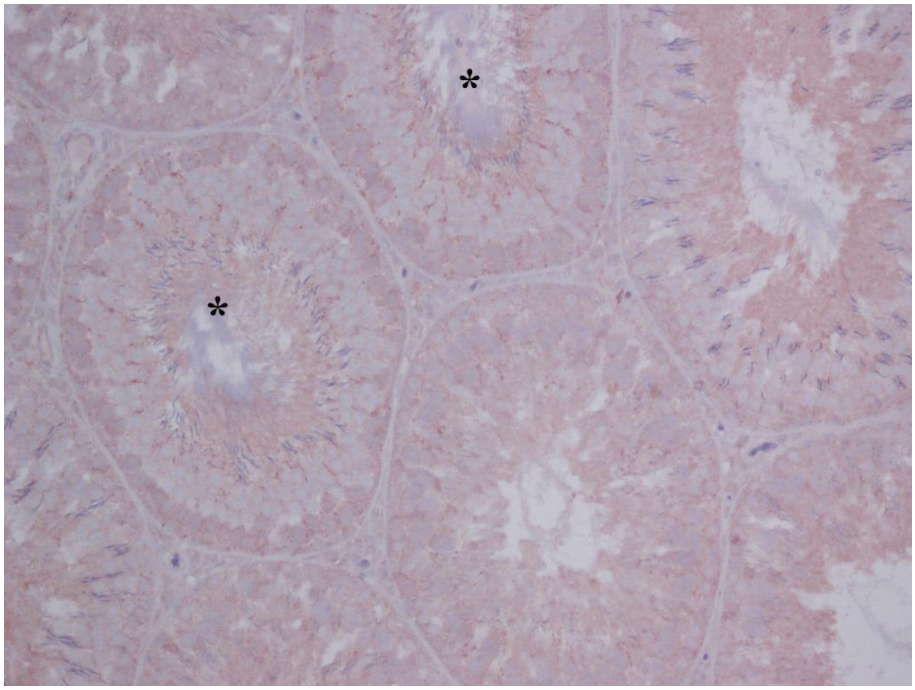
Şekil 54. Testis kesitinde görülen seminifer tübülün Nrf2 için yapılan negatif boyaması izlenmektedir. Negatif, hematoksilen zıt boyaması, x400.



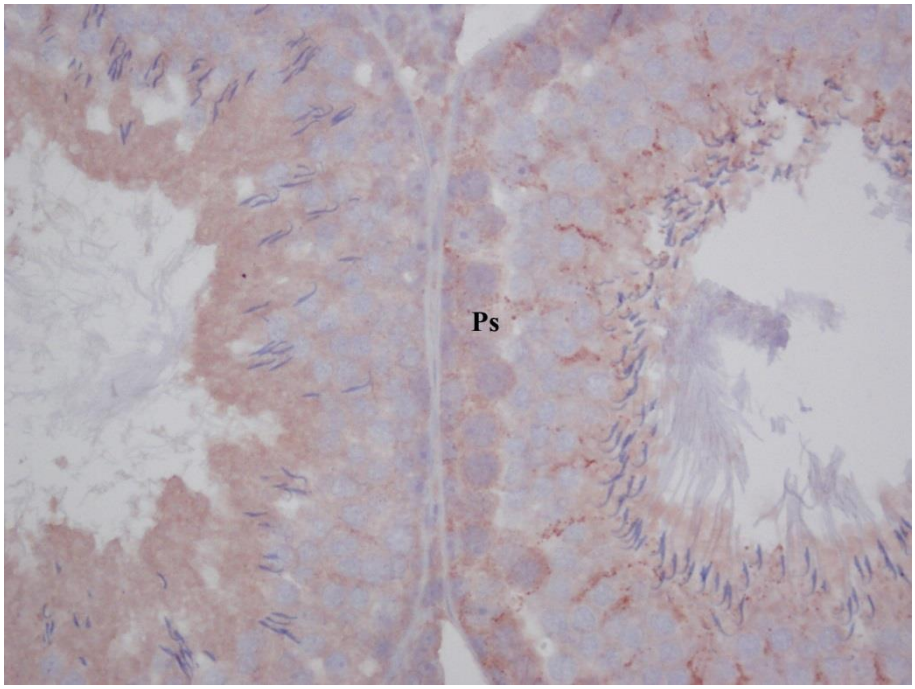
Şekil 55. Kontrol grubuna ait testis kesitindeki seminifer tübüllerde (yıldız) zayıf şiddette immünoreaktivite izlenmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200.



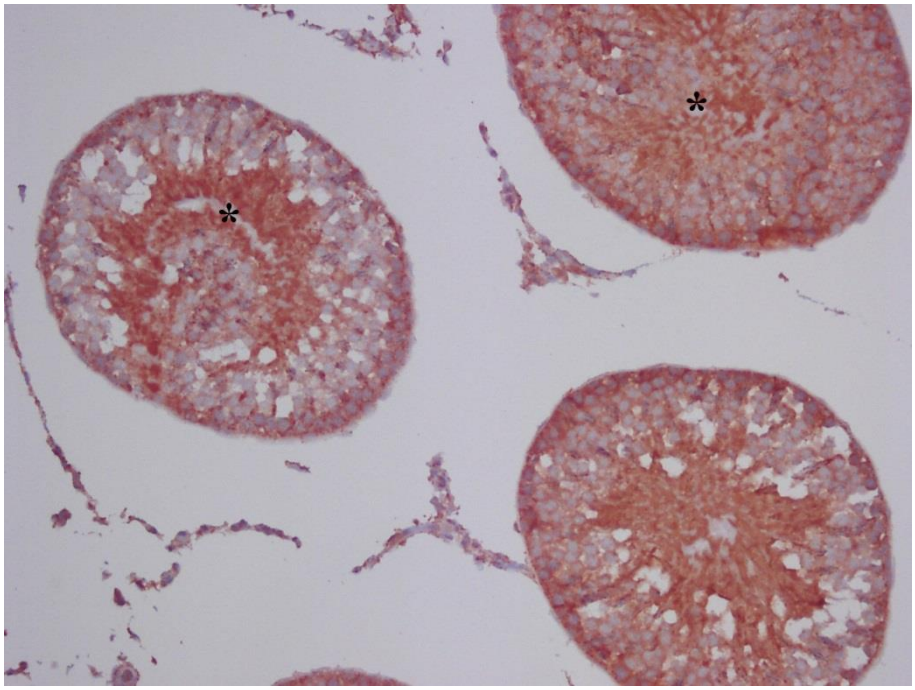
Şekil 56. Kontrol grubuna ait testis kesitindeki iki seminifer tübül büyük büyütmeden incelendiğinde özellikle primer spermatositler (PS) başta olmak üzere germinal seri hücrelerinde zayıf derecede immünoreaktivite görüldüğü dikkat çekmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400.



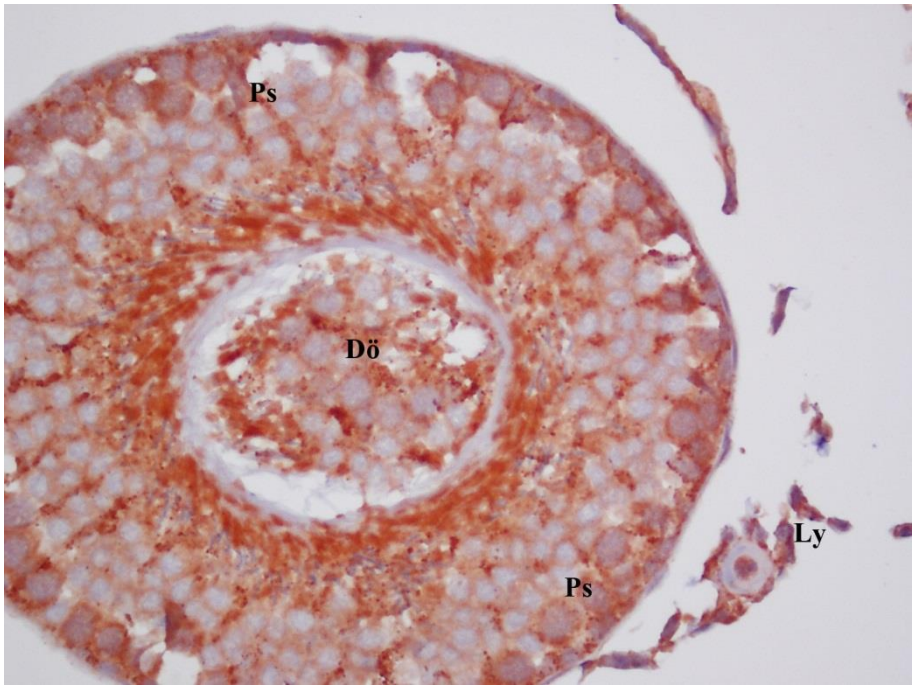
Şekil 57. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, seminifer tübüllerde (yıldız) zayıf düzeyde immünoreaktivite görülmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200.



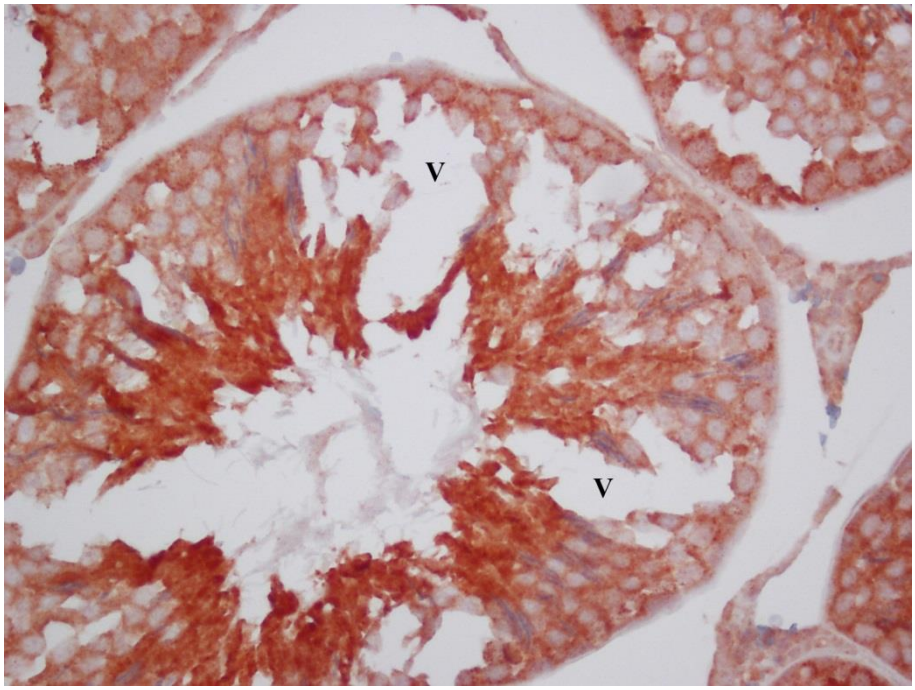
Şekil 58. Quercetin grubuna ait testis kesitindeki iki seminifer tübülde, özellikle primer spermatositler (PS) başta olmak üzere germinal seri hücrelerinde kontrol grubuna benzer olarak zayıf derecede immünoreaktivite gözlenmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400.



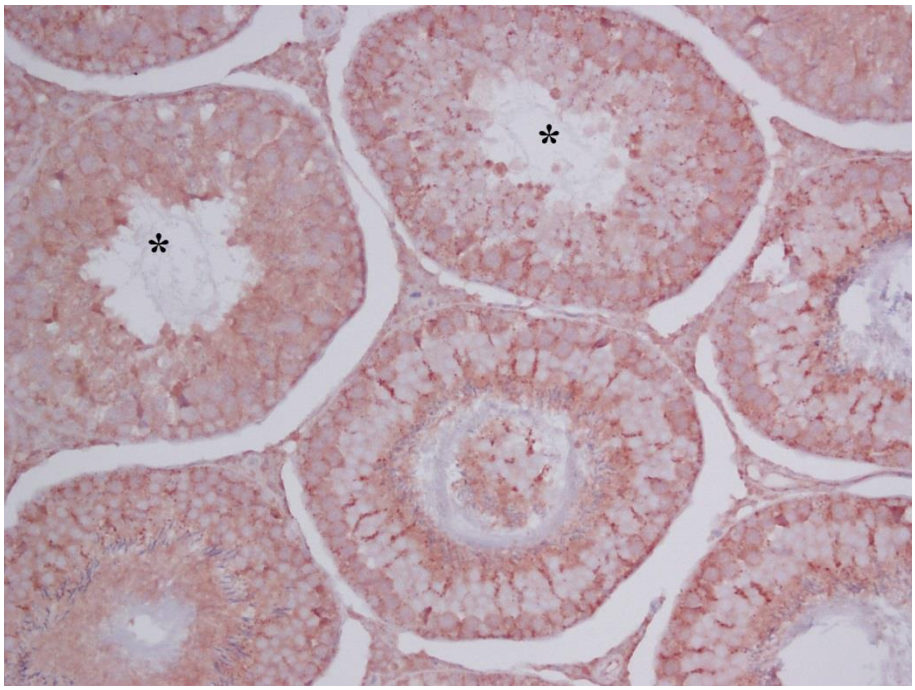
Şekil 59. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, vakuolizasyonların ve lümenlerinde dökülen immatür hücrelerin görüldüğü hasarlı seminifer tübüllerde (yıldız), başta primer spermatositler ve spermatidler olmak üzere tüm seminifer epitelin güçlü şiddette immünoreaktivite gösterdiği izlenmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200.



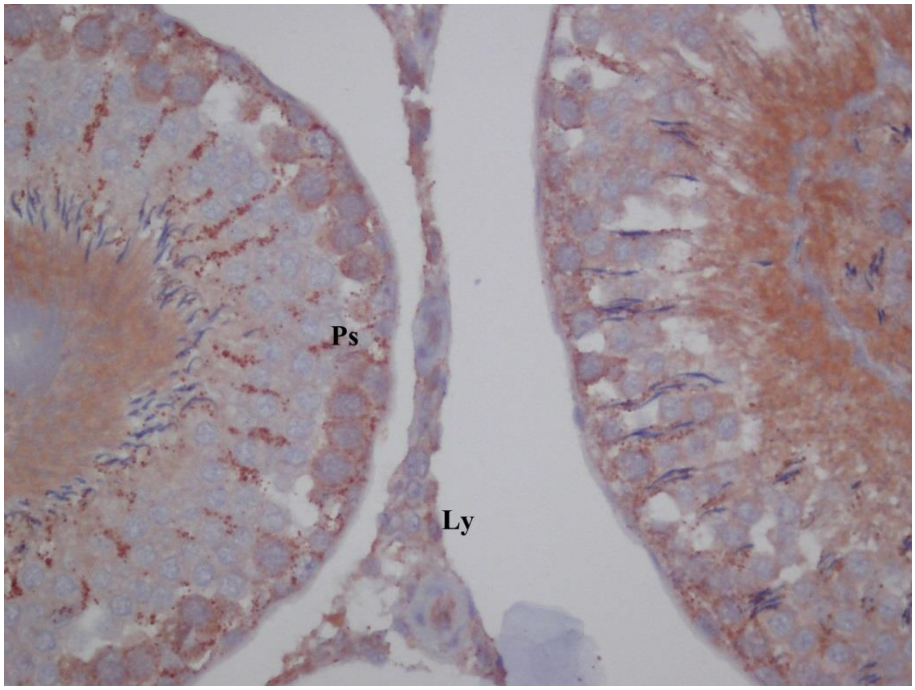
Şekil 60. Siklofosfamid grubuna ait lümene dökülen (Dö) immatür hücrelerin bulunduğu bir seminifer tübülde perinükleer yerleşimli güçlü derecede immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (PS) başta olmak üzere diğer seminifer epitel hücreleri ve interstisyel aralıkta yer alan Leydig hücreleri (Ly) dikkat çekmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400.



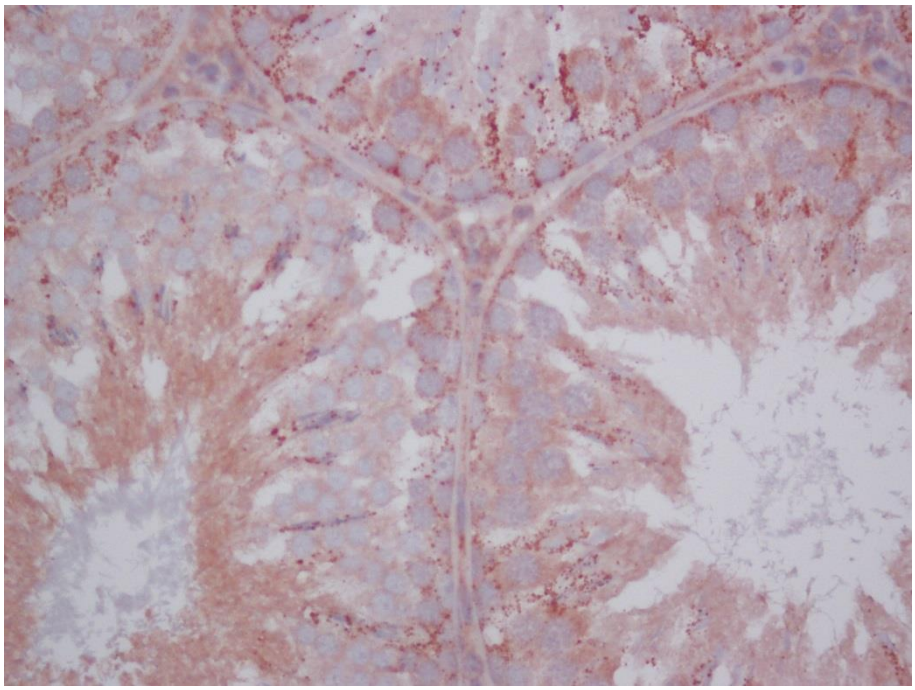
Şekil 61. Siklofosfamid grubuna ait vakuollerin (V) hakim olduğu hasarlı bir seminifer tübül kesitinde lümene yakın kısımlarda daha fazla olmak üzere tüm seminifer epitelde güçlü immünoreaktivitenin perinükleer yerleşim gösterdiği görülmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400.



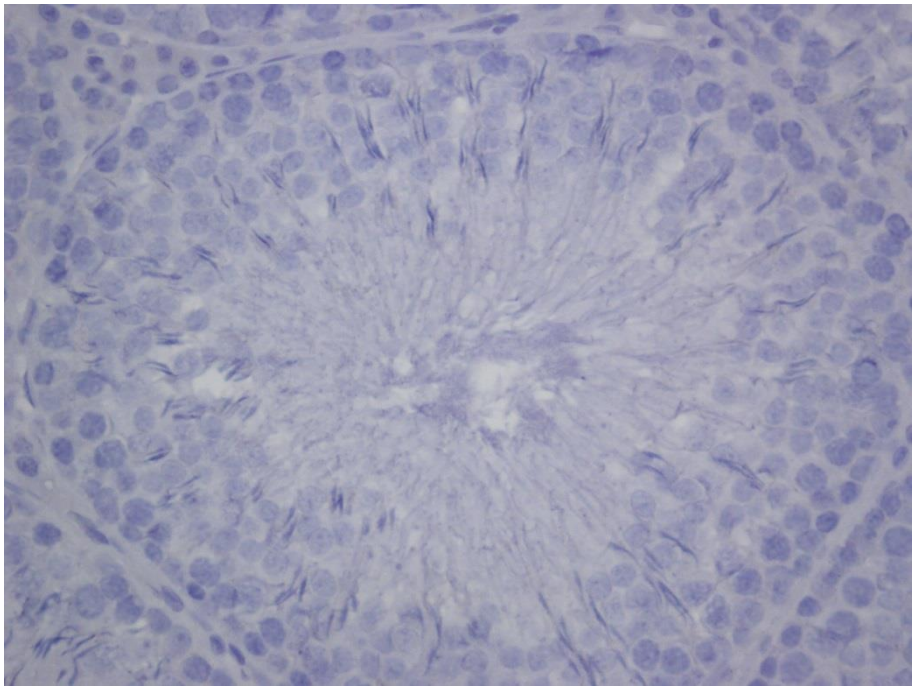
Şekil 62. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde, normale yakın (yıldız) veya hasarlı seminifer tübüllerde zayıf veya orta şiddette immünoreaktivite gösteren seminifer epitel izlenmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200.



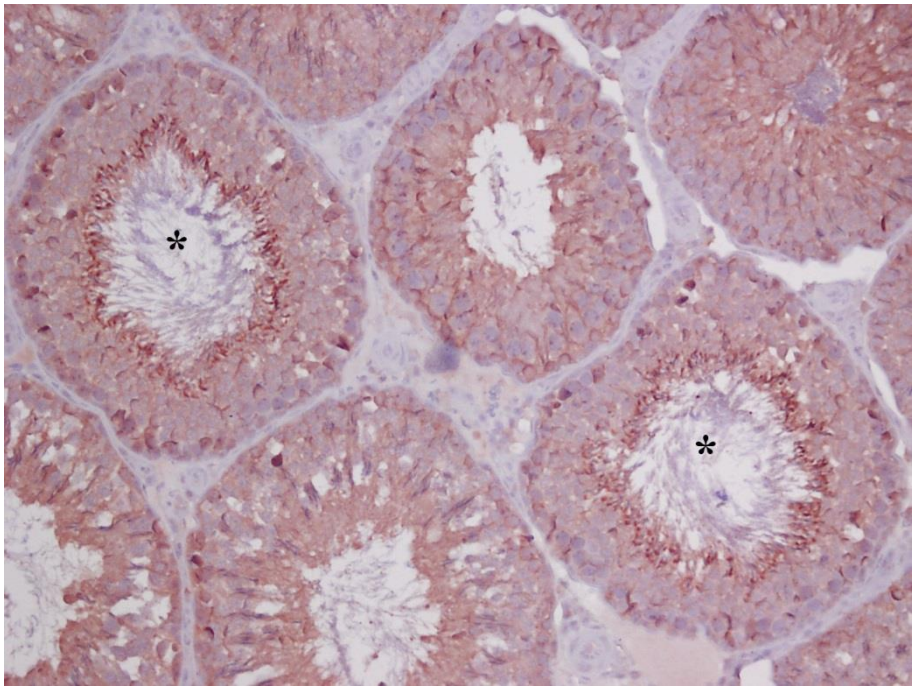
Şekil 63. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesiti büyük büyütmesinde görülen normal (sol) ve dökülen (sağ) iki seminifer tübülde, zayıf veya orta düzeyde immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (PS) ve diğer seminifer epitel hücreleri ile tübüller arasındaki bağ dokuda yerleşen ve zayıf immünoreaktivite gösteren Leydig hücreleri (Ly) görülmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400.



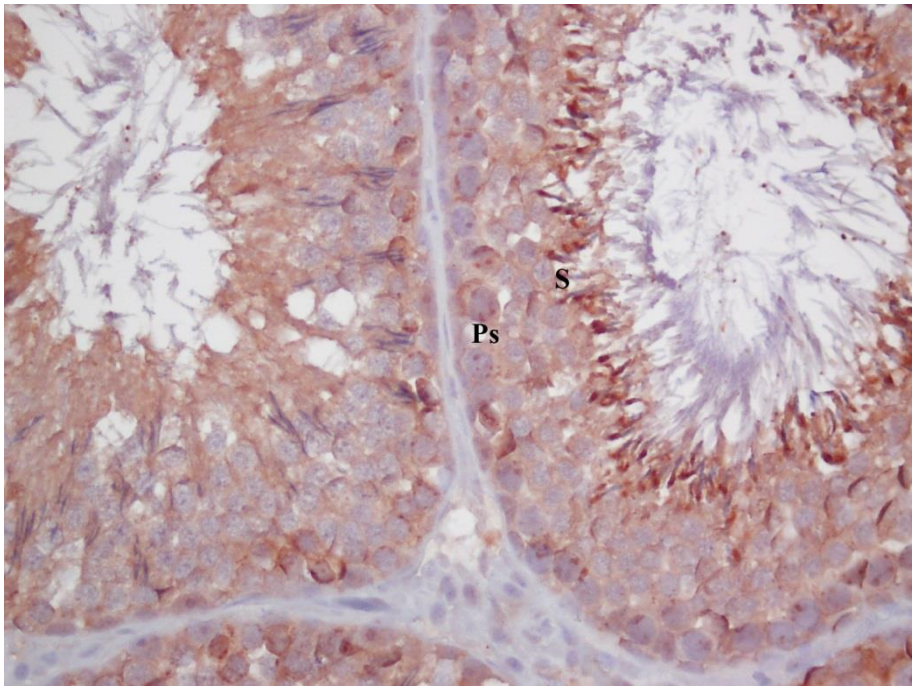
Şekil 64. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait yapısı nispeten korunmuş iki seminifer tübülün göründüğü kesitte, zayıf veya orta derecede immünoreaktivite gösteren seminifer epitel ve interstisyel bağ doku gözlenmektedir. Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400.



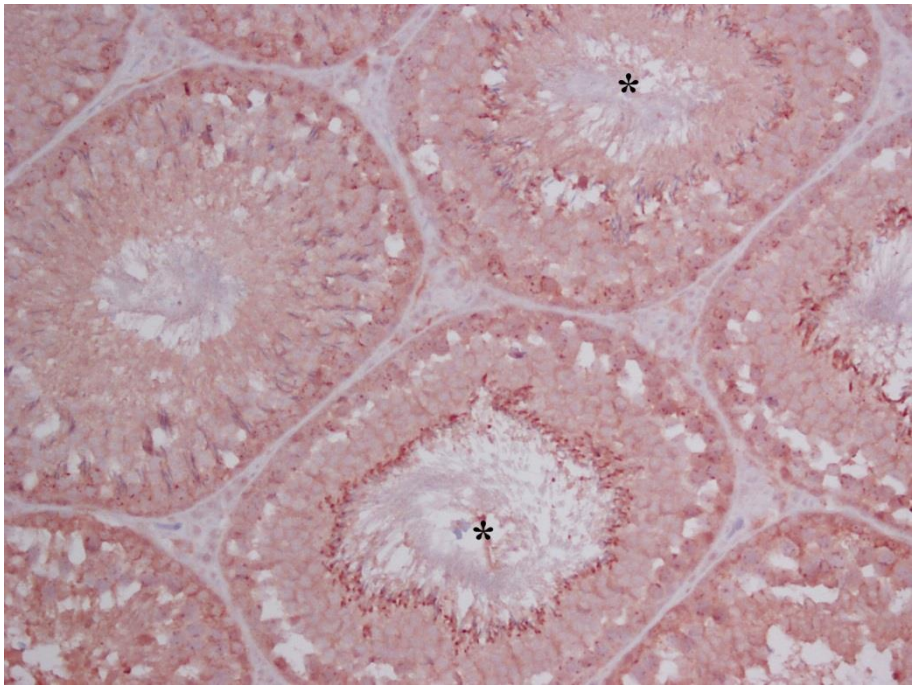
Şekil 65. Testis kesitinde görülen seminifer tübülün Bax için yapılan negatif boyaması izlenmektedir. Negatif, hematoksilen zıt boyaması, x400.



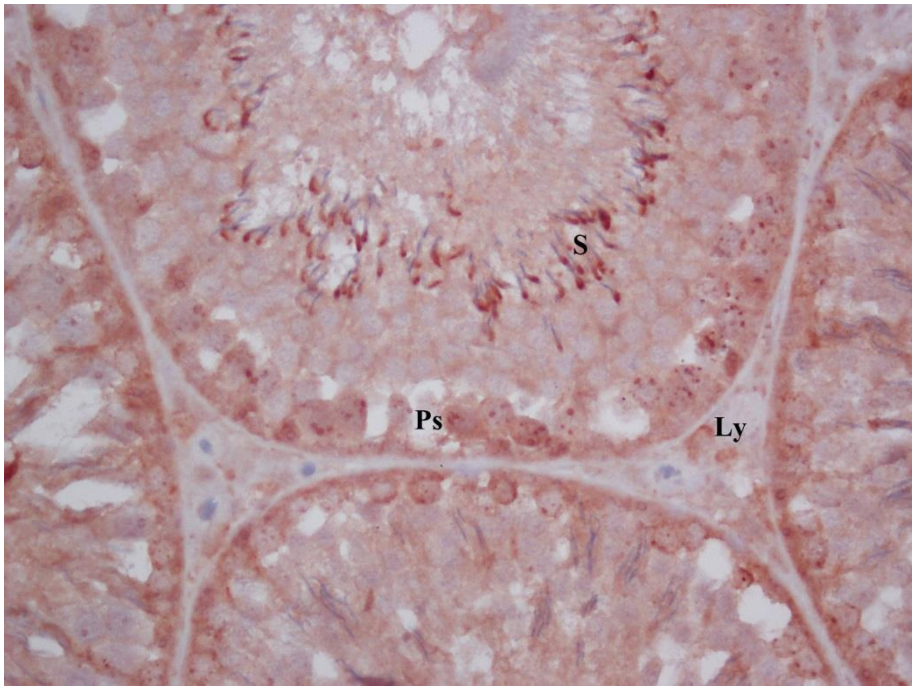
Şekil 66. Kontrol grubuna ait testis kesitinde normal yapıdaki seminifer tübüllerde (yıldız) primer spermatositlerin ve tübül lümenine yakın yerleşimli spermatidlerin orta şiddette sitoplazmik immünoreaktivite gösterdiği gözlenmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



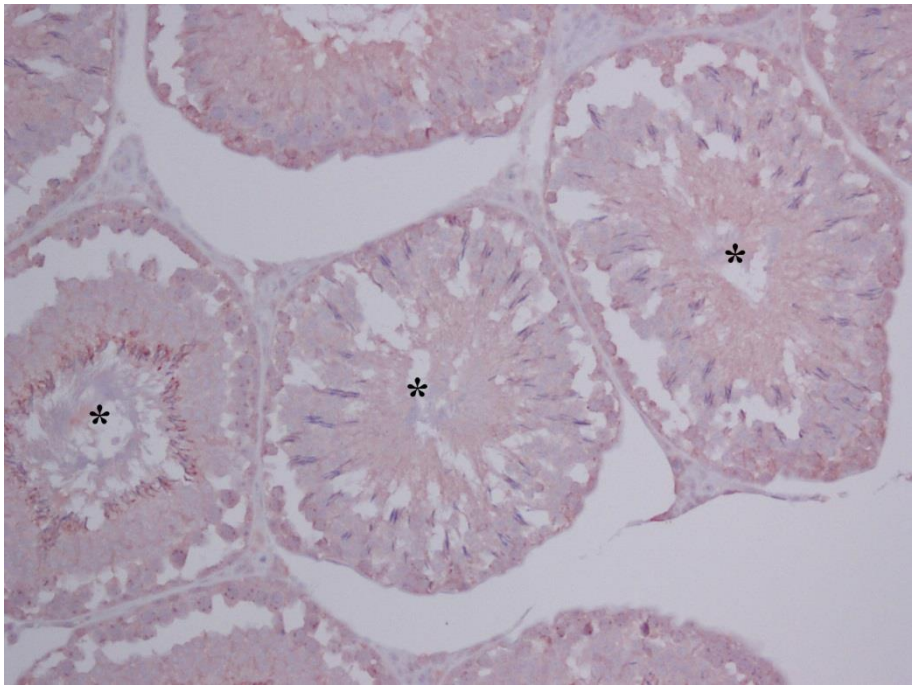
Şekil 67. Kontrol grubuna ait testis kesitinde görülen iki seminifer tübülde, özellikle primer spermatositlerin (PS) ve tübül lümenine yakın yerleşimli spermatidlerin (S) güçlü derecede sitoplazmik immünoreaktivite gösterdiği, seminifer epitelin diğer kısımlarında orta düzeyde immunoreaktivite olduğu dikkat çekmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



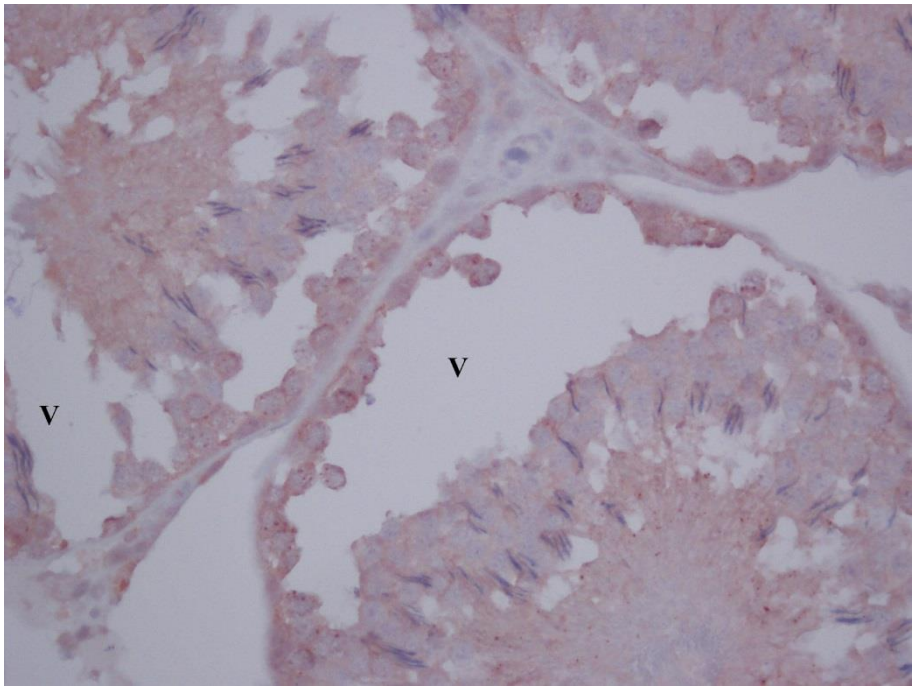
Şekil 68. Quercetin grubuna ait testis kesitindeki seminifer tübüllerde (yıldız) kontrol grubuna benzer paternde orta düzeyde immünoreaktivite görülmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



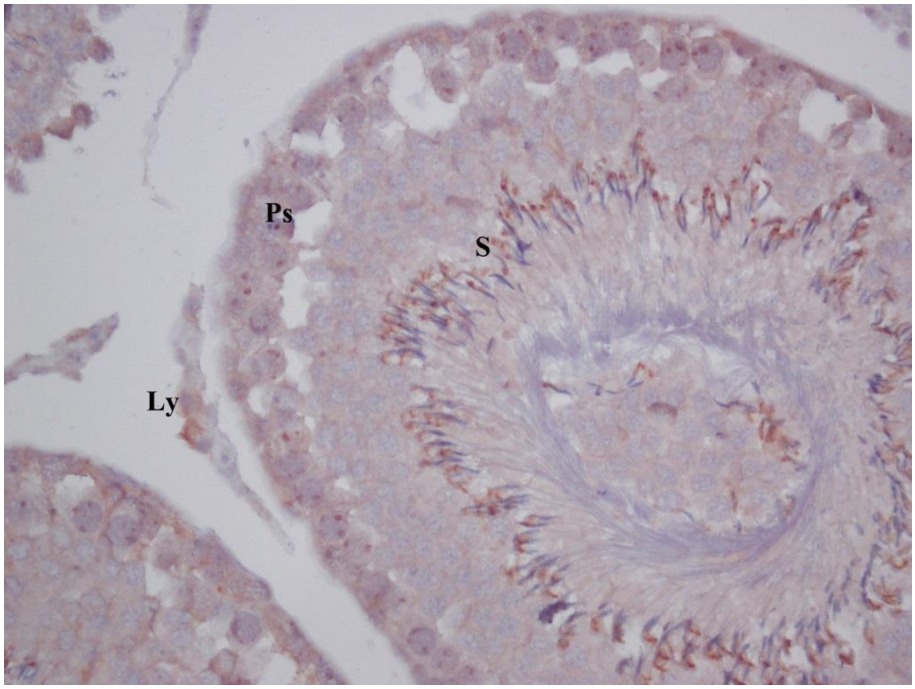
Şekil 69. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, seminifer tübüllerdeki özellikle primer spermatositlerin (PS), lümene yakın yerleşimli spermatidlerin (S) ve interstisyumdaki Leydig hücrelerinin (Ly) orta şiddette sitoplazmik immünoreaktivite gösterdiği dikkat çekmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



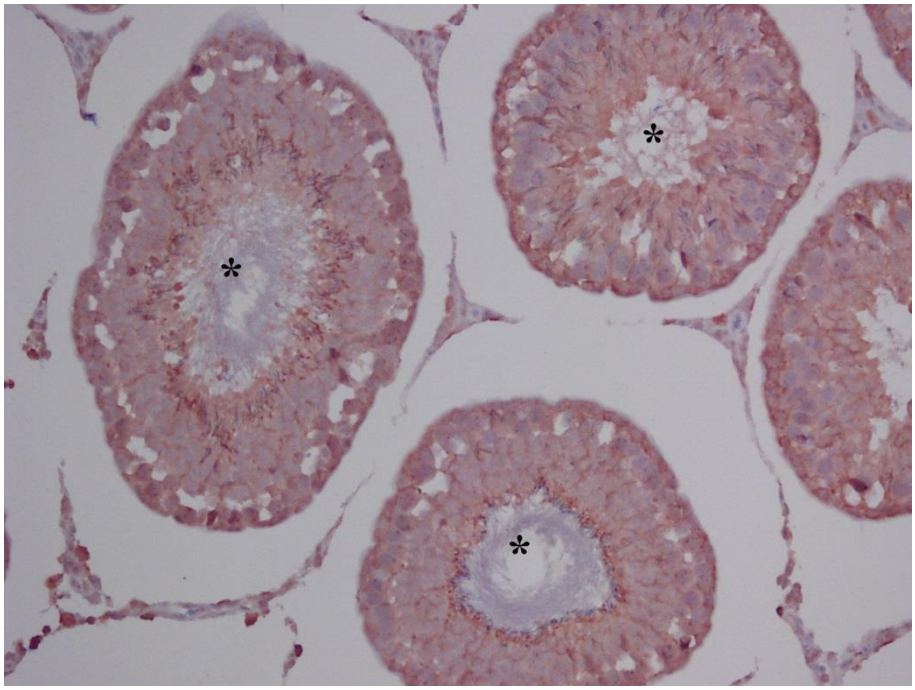
Şekil 70. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, germinal seri hücreleri arasında ayrılma veya vakuolizasyonun görüldüğü hasarlı seminifer tübüllerdeki (yıldız) zayıf şiddette immünoreaktivite izlenmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



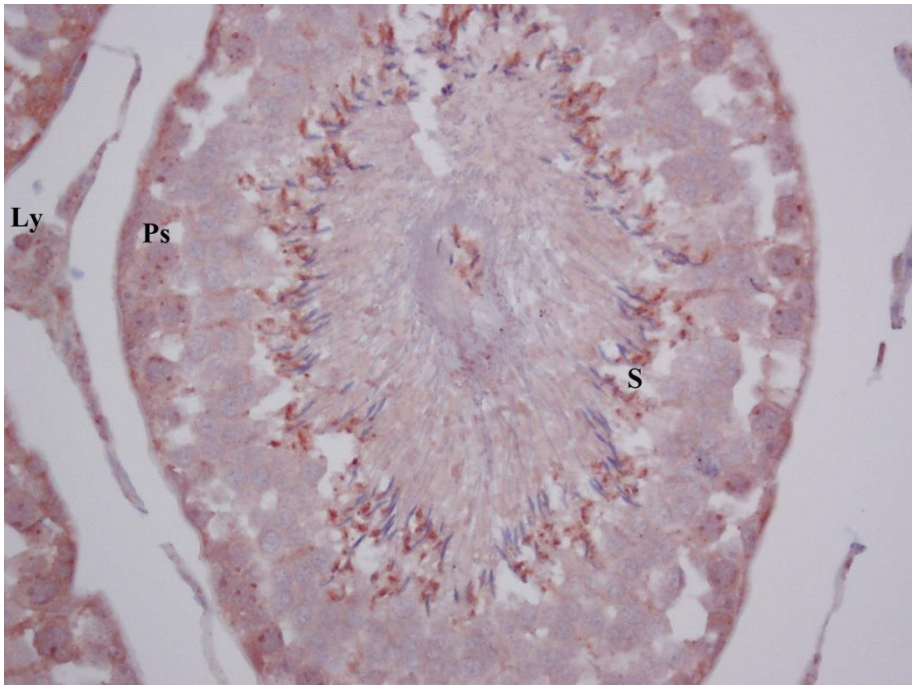
Şekil 71. Siklofosfamid grubuna ait vakuolizasyonun (V) hakim olduğu hasarlı seminifer tübüllerin bir kısmının görüldüğü kesitte, zayıf derecede immünoreaktivite gözlenmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



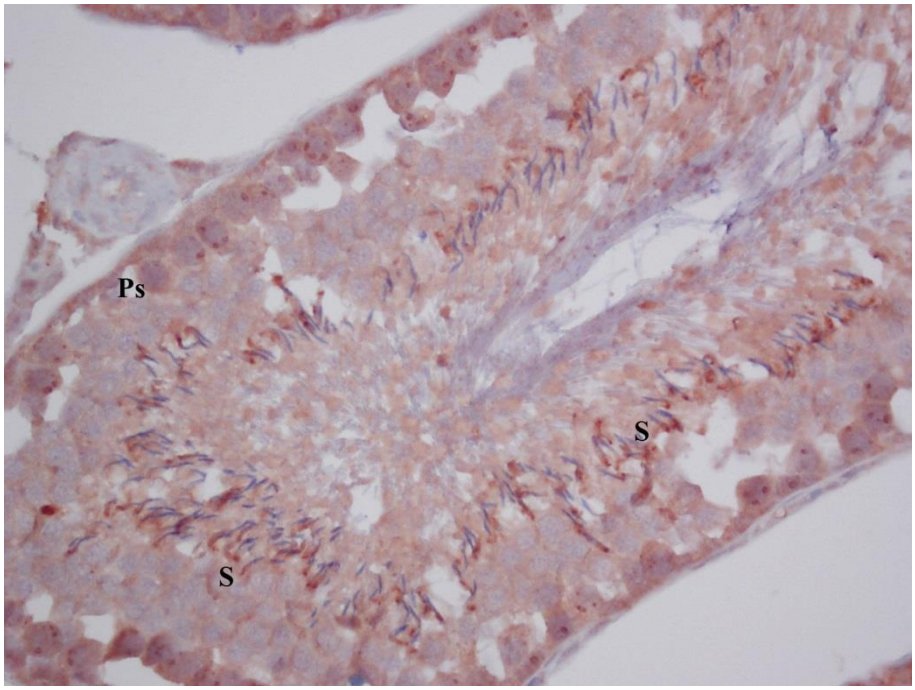
Şekil 72. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitindeki lümenine immatür hücrelerin döküldüğü ve ayrılmanın görüldüğü bir seminifer tübülde, zayıf immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (PS), spermatidler (S) ve çok zayıf immünoreaktivite gösteren diğer tübül epitel hücreleri ile interstisyel bağ dokudaki Leydig hücreleri (Ly) görülmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



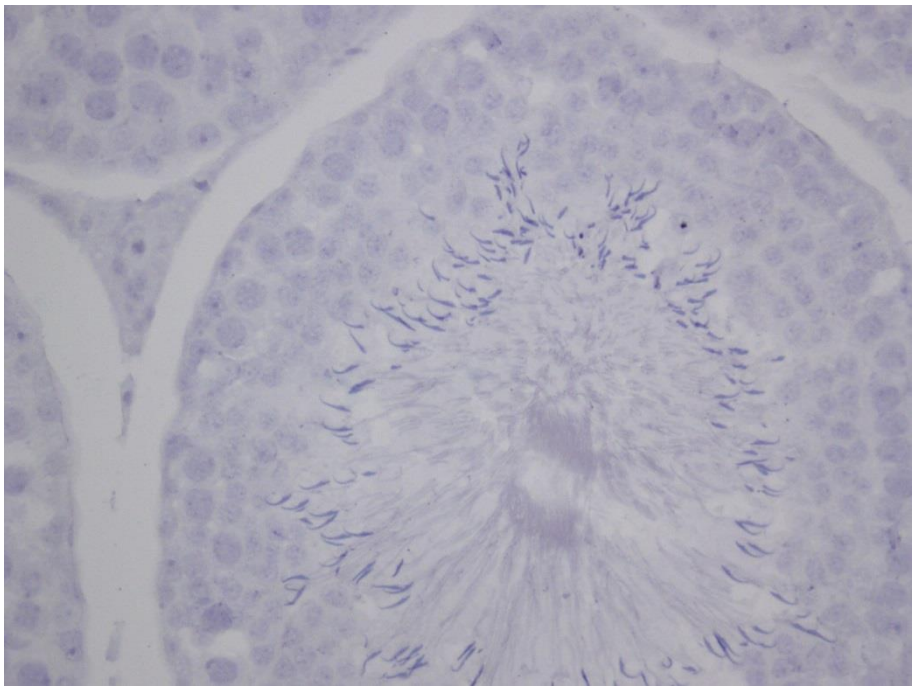
Şekil 73. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde, normale yakın görünümlü seminifer tübüllerde (yıldız) orta şiddette immünoreaktivite izlenmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200.



Şekil 74. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait bir testis kesitinde zayıf veya orta derecede immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (Ps) ve spermatidlerin (S) yer aldığı bir seminifer tübül görülmektedir. Ayrıca interstisyel bağ dokudaki Leydig hücrelerinin (Ly) orta şiddette immunoreaktivite gösterdiği izlenmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



Şekil 75. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait ayrılma ve küçük vakuollerin bulunduğu bir seminifer tübül kesitinde, zayıf veya orta düzeyde immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (PS) ve spermatidler (S) gözlenmektedir. Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400.



Şekil 76. Testis kesitinde görülen seminifer tübülün Bcl-2 için yapılan negatif boyaması izlenmektedir. Negatif, hematoksilen zıt boyaması, x200.

IN SİTU DNA UÇ İŞARETLEME METODU (TUNEL) BOYAMA BULGULARI

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için TUNEL tekniği kullanılarak yapılan boyamanın ışık mikroskobunda yapılan incelemesinde, koyu kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik hücreler olarak kabul edildi. Apoptotik değerlendirme, apoptotik hücre indeksi ve apoptotik tübül indeksi alınarak yapıldı.

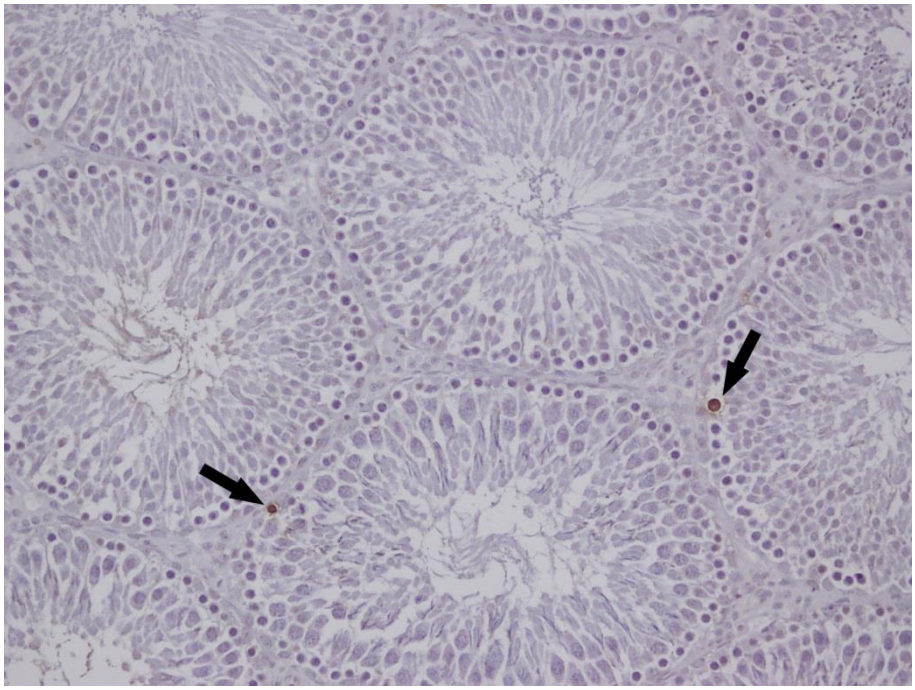
Tüm gruplara ait doku kesitleri üzerinden yapılan apoptotik hücre indeksi sonuçlarına göre, kontrol (Şekil 77,78) ve QRC (Şekil 79,80) gruplarına ait ortalama pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlılık gösterecek düzeyde bir fark görülmezken ($p>0,05$), CP grubu kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edildi (her iki değer için $p<0,001$; Şekil 81,82). CP enjeksiyonuna ek olarak QRC verilen gruba ait indeks sonuçları ise CP enjeksiyonu yapılan grubun indeks sonuçlarıyla kıyaslandığında anlamlı derece azalma gösterdi ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$; Şekil 83,84).

Quercetinin CP maruziyetine kalan sıçanların testis doku hasarı üzerine apoptotik etkisinin değerlendirmek amacı ile yapılan TUNEL analiz sonuçları, tüm gruplara ait apoptotik hücre indeksi ve apoptotik tübül indeksi olarak Tablo 7'de sunulmuştur.

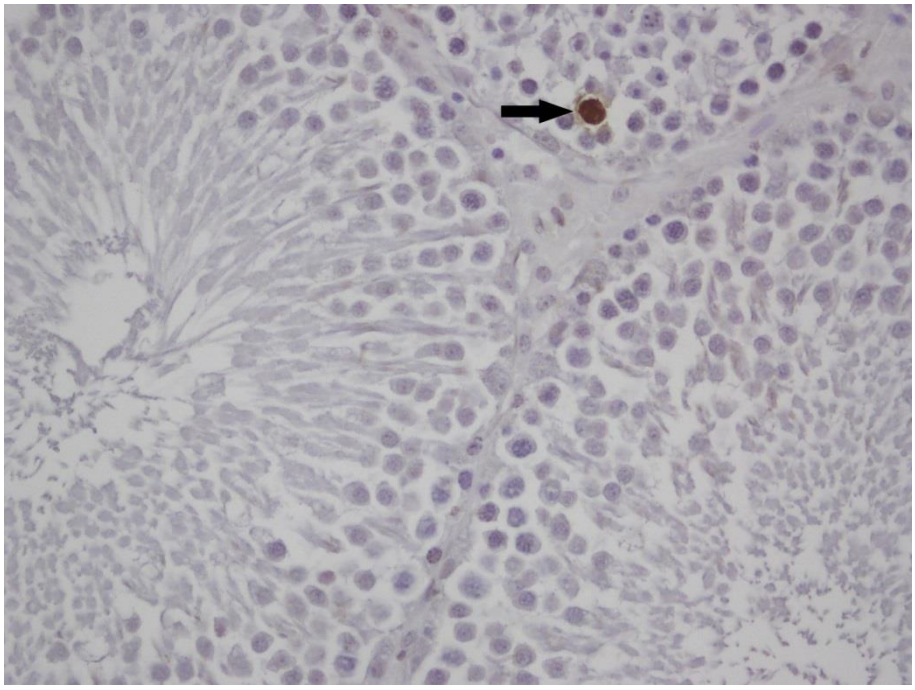
Tablo 7. Kontrol ve deney gruplarına ait apoptotik hücre ve apoptotik tübül indeksi

Parametre	Kontrol (n=10)	QRC (n=10)	CP (n=10)	CP+QRC (n=10)	P değeri
Apoptotik hücre indeksi	0,23±0,88	0,13±0,73	5,43±1,37*†	1,17±0,36$^{**\dagger\dagger\#}$	p<0,001
Apoptotik tübül indeksi	13,32±1,61	10,13±3,94	59,06±6,35*†	34,18±10,41$^{*\dagger\#}$	p<0,001

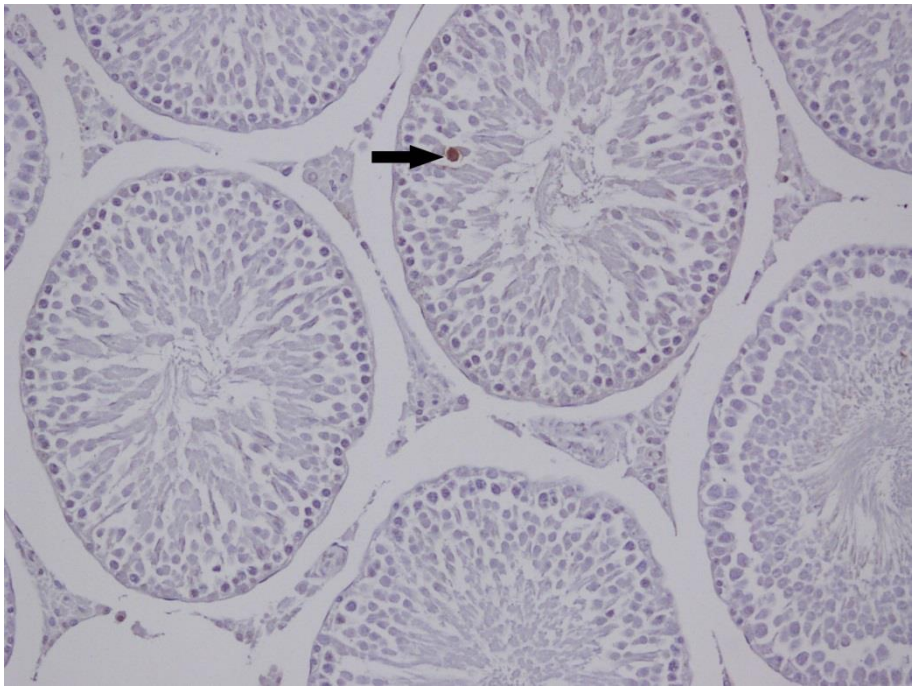
Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir.
* p<0,001 kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p<0,05 kontrol ile karşılaştırıldığında
† p<0,001 QRC ile karşılaştırıldığında; ††p<0,05 QRC ile karşılaştırıldığında
$^{\#}$ p<0,001 CP ile karşılaştırıldığında.



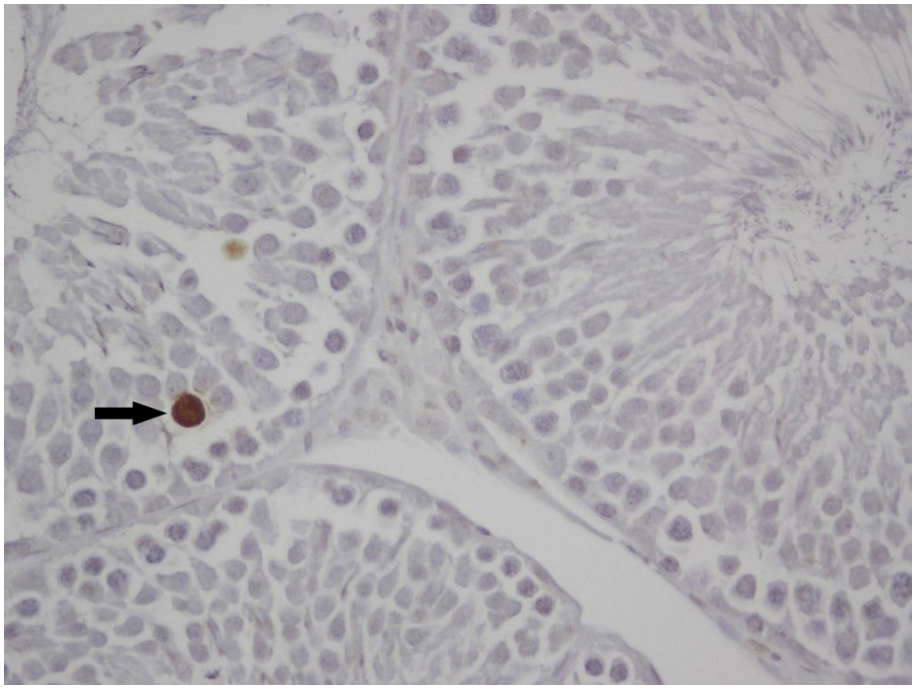
Şekil 77. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, normal görünümlü seminifer tübüllerde koyu kahverengi renkte işaretlenmiş az sayıda TUNEL pozitif hücre (oklar) izlenmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200.



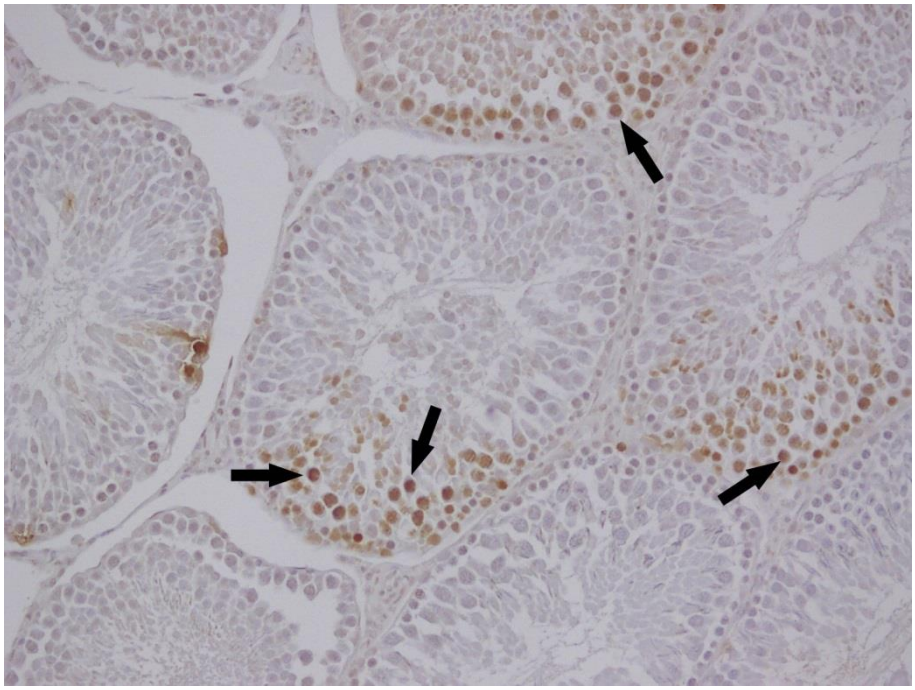
Şekil 78. Kontrol grubuna ait testis kesiti seminifer epitelinde, koyu kahverengi boyanmış TUNEL pozitif bir hücre (ok) görülmektedir. Genellikle TUNEL pozitif hücrelerin primer spermatositler olduğu dikkat çekmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400.



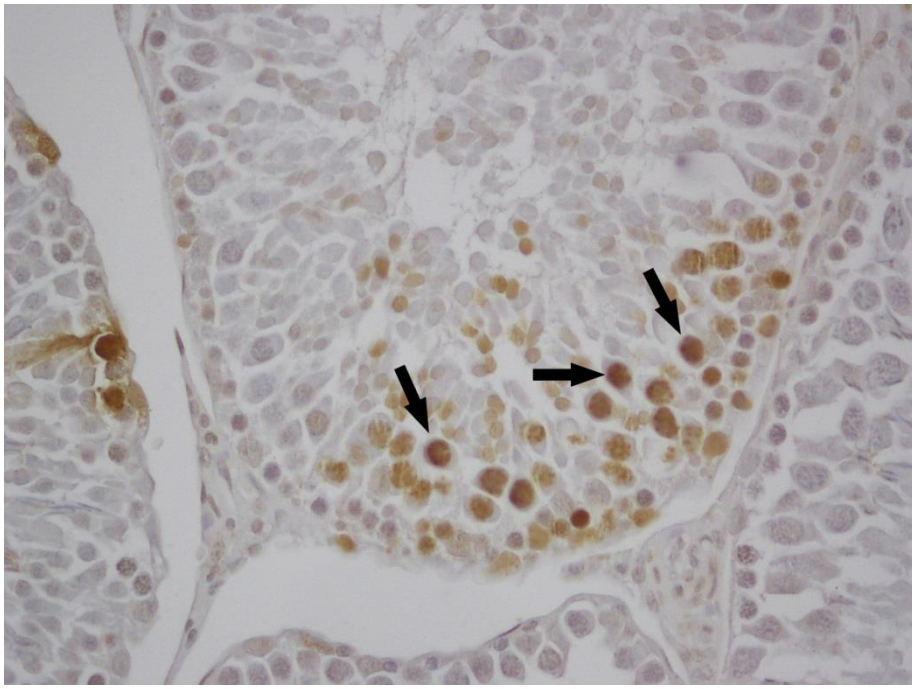
Şekil 79. Quercetin grubuna ait testis kesitinde, normal yapıdaki seminifer tübüllerde nadiren TUNEL pozitif hücre (ok) görülmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200.



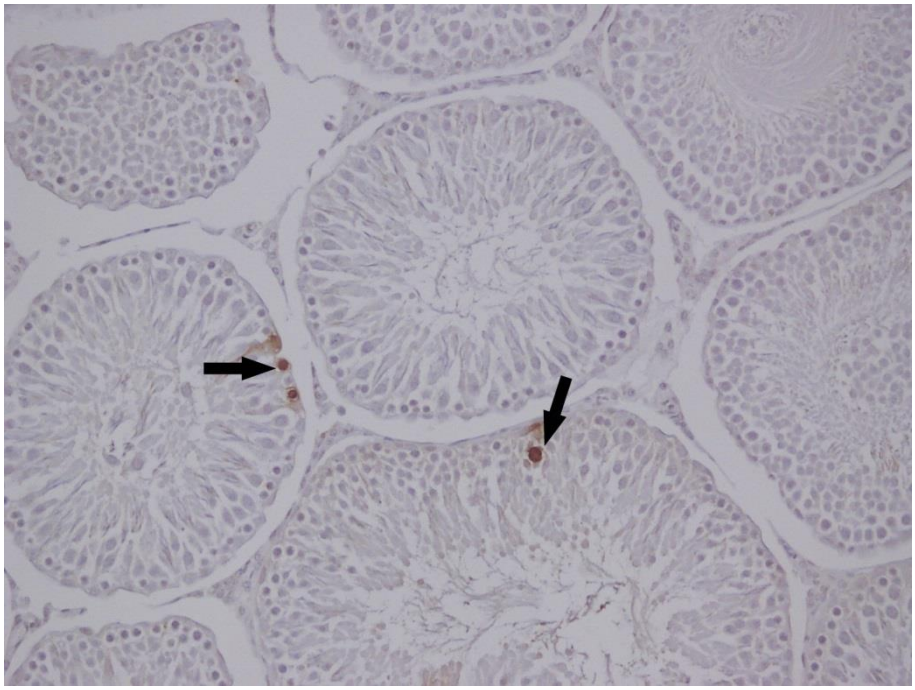
Şekil 80. Quercetin grubuna ait seminifer tübül kesitinde kontrol grubuna benzer şekilde TUNEL pozitif bir hücre (ok) gözlenmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400.



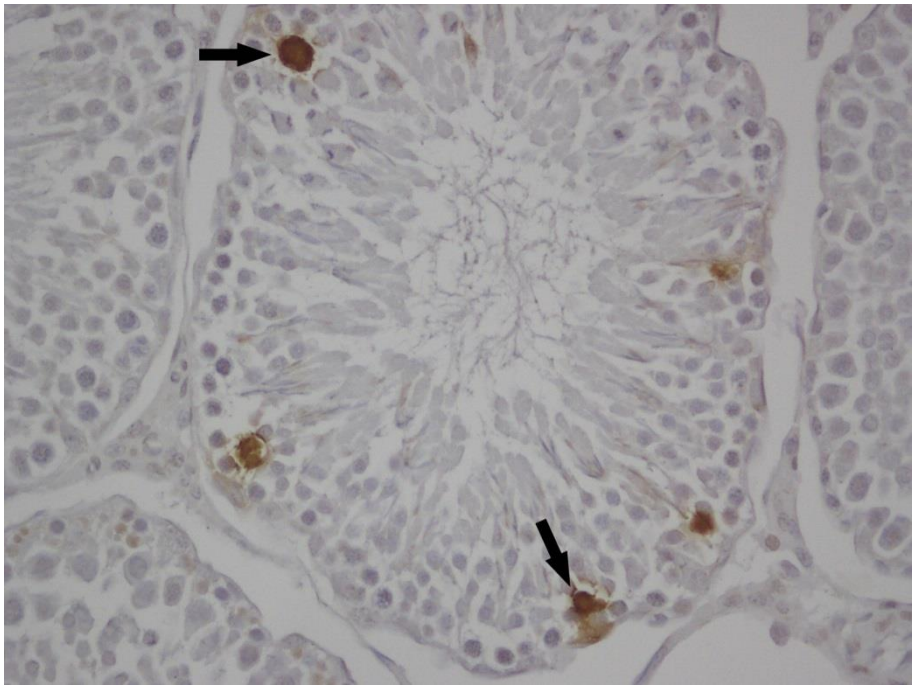
Şekil 81. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, hasarlanmış seminifer tübüllerde koyu kahverengi renkte boyanan çok sayıda apoptotik TUNEL pozitif hücre (oklar) izlenmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200.



Şekil 82. Siklofosfamid grubuna ait testis kesitinde, Şeki 81'de yer alan seminifer tübüllerden lümeninde dökülen immatür hücrelerin görüldüğü hasarlı bir seminifer tübül daha yakından incelendiğinde, çok sayıda TUNEL pozitif hücre (oklar) görülmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400.



Şekil 83. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait testis kesitinde, bazı seminifer tübüllerde koyu kahverengi renkte boyanan apoptotik TUNEL pozitif hücrelerin (oklar) bulunduğu dikkat çekmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200.



Şekil 84. Siklofosfamid+Quercetin grubuna ait normale yakın görünümlü bir seminifer tübül kesiti daha yakından incelendiğinde, koyu kahverengi renkte boyanan apoptotik TUNEL pozitif birkaç hücre (oklar) izlenmektedir. TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400.

TARTIŞMA

Kemoterapi, tek başına veya cerrahi ve radyoterapi gibi diğer kanser tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılabilen kanser tedavi stratejilerinden biridir. Bu tedavide özellikle sitotoksik etkisi olan ilaç grupları öne çıkmaktadır ve alkilleyici bir ajan olan CP, yaygın olarak kullanılan antikanser ve immünsüpresif ilaçlardan biri olarak dikkat çekmektedir (19,124). Çoğunlukla hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, güçlü immünosüpresif özelliği sayesinde organ transplantasyonlarında doku reddini önlemek amacıyla ve romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (1-5,81, 124).

Terapötik etkinliğine rağmen, CP'nin genital sistem dahil olmak üzere pek çok sistem üzerindeki yan etkileri klinik ve deneysel çalışmalarda bildirilmektedir (12-14,119,125). Bu yan etkiler hücre düzeyinde genel olarak; azalmış kan hücresi (lökopeni), kemik iliği baskılanması (miyelosüpresyon) ve immünosüpresyon olarak görülmektedir. Doku ve organ düzeyinde ortaya çıkan yan etkiler arasında ise, nefrotoksisite, nörotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite ve gonadotoksisiteye bağlı olarak gelişen testis disfonksiyonu bulunmaktadır (11,124,126).

Siklofosfamidin tedavi sürecindeki kemoterapötik etkinliği ve sağlıklı dokulardaki toksik etkileri, aktif metabolitleri olan fosforamid hardalı ve akrolein vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Fosforamid hardalı, pozitif yüklü reaktif bir ara bağ sayesinde DNA'ya geri döndürülemez bir şekilde bağlanarak DNA sarmalında çapraz bağlantılara neden olur, bu da DNA kırılmalarına, DNA'nın sentezlenememesine ve sonuç olarak hücre ölümüne yol

açar. Diğer metaboliti olan akrolein ise DNA onarım proteini O6-metilguanin-DNA metiltransferazı inaktive ederek sürece katkıda bulunur (11).

Gonadotoksisitede, ilaç kullanımına bağlı hasar sonucunda ortaya çıkan en önemli klinik bulgu şüphesiz infertilitedir ve dünyadaki tüm çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen bir sağlık sorunudur. Erkek bireylerde görülen infertilite faktörlerinin, tüm vakaların yaklaşık yarısına yakınında etkili olduğu bilinmektedir (127). CP'nin neden olduğu testis hasarına bağlı testiküler disfonksiyona çözüm yolları üretebilmek için yapılan pek çok çalışmada, CP'nin antioksidan savunma sistemini bozarak oksidatif strese yol açması ile testiste oluşan hasara karşı çeşitli antioksidan, antiinflamatuar ve antiapoptotik maddeler kullanılarak bu hasarlar önlenmeye ya da azaltılmaya çalışılmıştır (4,5,15,17,24-26). Güçlü bir antioksidan olan QRC de, hücre içinde ROS şekillenmesini engellemekte, bu sayede hücreyi lipit peroksidasyonuna karşı koruyarak oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozis gibi etkilerin önüne geçmektedir (29,35).

Bu çalışmada, CP'ye bağlı olarak gelişen testis hasarı ve buna bağlı olarak ortaya çıkabilecek infertilitenin önlenmesine/azaltılmasına yönelik katkı sağlaması amacıyla, güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar olan QRC'nin koruyucu etkisinin hormonal, histolojik ve immünohistokimyasal düzeyde araştırılması amaçlandı.

Tüm gruplara ait hayvanların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlık ölçümleri yapıldı. Buna göre, kontrol ve QRC gruplarının deney başlangıcı ve deney sonuna ait vücut ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında, her iki grupta da deney süresince ağırlıklarının artış gösterdiği ve iki grup arasındaki vücut ağırlık değişimlerinde anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bununla birlikte, CP grubu hayvanlarının kontrol ve QRC gruplarına kıyasla vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma olduğu gözlendi. CP+QRC grubundaki hayvanlarda ise, CP grubu ile karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarında anlamlı derecede artış saptandı. Vücut ağırlığı yönünden yapılmış olan daha önceki çalışmalar değerlendirildiğinde; CP enjeksiyonu yapılan hayvanların vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak azaldığını belirten çalışmalar mevcuttur ve bulgularımıza paralellik göstermektedir (4,11,20,24,128-131). Abd El Tawab ve ark. (11) erkek *Wistar albino* sıçanlarla yaptıkları çalışmada, 200 mg/kg tek doz olarak uyguladıkları CP enjeksiyonundan 8 gün sonra sakrifiye ettikleri hayvanların vücut ağırlıklarının ve testis ağırlıklarının anlamlı derecede düştüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca, Kanno ve ark. (132), farelerle yaptıkları in vivo çalışmada, seksüel olgunluğa erişmiş erkek fareler, biri kontrol olmak üzere 5 gruba ayrılarak haftada bir kez sırasıyla 100, 150, 200 ve 250 mg/kg dozda 6 hafta boyunca ip. olarak CP uygulanmış, 5. hafta sonunda 100 ve 150

mg/kg CP verilen grupların dişi farelerle çiftleşmeleri sağlandıktan sonra tüm erkek fareler sakrifiye edilmiştir. Hayvanların vücut ve testis başta olmak üzere çeşitli organ ağırlık değişimlerinin değerlendirildiği çalışmanın devamında dişi farelerde, implantasyon sayısı, fetal canlılık, implantasyon sonrası kayıp oranı, fetal ağırlık ve fetal uzunluk gibi değerlendirmelerinde yapıldığı çalışmada, 100 mg/kg doz CP verilen gruptan itibaren erkek farelerde kilo alımının azaldığı, doz yükseldikçe dereceli olarak kilo kaybının başladığı bildirilmiştir ve çalışmanın verileri bizim çalışmamızdaki vücut ağırlığı değişimini destekler niteliktedir. Buna karşılık, Ekeleme-Egedigwe ve ark. (133)'nın yaptıkları çalışmada ise, 50 mg/kg tek doz olarak *Wistar albino* sıçanlara CP verilmesinin sonucunda, vücut ağırlıkları CP grubunda da pozitif yönde artarak diğer gruplarla korelasyon göstermiştir. Testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, CP grubunda azalma göstermesine rağmen anlamlı bulunmamıştır. Literatürdeki farklı bulgulardan yola çıkarak; vücut ağırlığı değişimindeki negatif yönlü artış, CP'nin doza bağlı olarak gelişen ve yapılan çalışmalarda farklı seviyelerde ortaya çıkan sistemik toksik etkisinin bir sonucu olarak, yetersiz beslenme ve bozulmuş metabolik fonksiyonların göstergesi olabilir. Ayrıca çalışmalarda vücut ağırlığı değişimi konusunda tespit edilen farklı bulgular kullanılan ajanın dozu ve kullanım süresine bağlı olmasının yanı sıra, deney hayvanı türü veya ırkına da bağlı olarak ortaya çıkabilir.

Çalışmamızda ayrıca, deneklerden sağ ve sol testisler diseke edilerek ayrı ayrı tartıldı ve elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Buna göre CP enjeksiyonu yapılan grupta kontrol ve QRC gruplarına kıyasla, hem sağ ve sol testis ağırlıklarında, hem de toplam testis ağırlıklarında anlamlı bir azalma görüldü. CP'ye ek olarak QRC uygulanan gruba ait deneklerin toplam testis ağırlıkları ise, CP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber daha yüksek bulundu. Toplam testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı açısından gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, CP grubu hayvanlarında bu oranın, kontrol ve QRC gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği görüldü. CP+QRC grubunda oran nispeten daha düşük olsa bile bu fark anlamlı değildi. Vücut ağırlığı ve testis ağırlığı değişimlerinin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, CP grubu testis ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığını (4,11,24,128,132) ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarının anlamlı artış gösterdiğini belirten çalışmalar bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir (24,129,134). Bununla birlikte, CP uygulanan grupta testis ağırlıklarında anlamlı bir değişim olmadığını bildiren çalışmalar da mecuttur (20,133). Kim ve ark. (129) tarafından *Sprague dawley* sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 2 gün art arda 150 mg/kg ip. yol ile CP verilmiş ve hayvanların gıda tüketimi değerlendirildiğinde, CP enjeksiyonu yapılan hayvanlarda gıda

tüketimlerinin de anlamlı oranda azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada hayvanların vücut ve testis ağırlıkları da değerlendirilmiş, kontrol grubuyla kıyaslandığında, CP grubunda anlamlı oranda vücut ve testis ağırlık kaybı gözlenmiştir. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak, CP'nin doz bağımlı sitotoksik etkisine bağlı olarak, bozulmuş metabolik fonksiyonlar dışında, gıda tüketiminde de azalma nedeniyle vücut ağırlığının daha belirgin bir düşüş gösterdiği ve bu sebeple testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranının CP grubunda daha yüksek saptandığı düşünülebilir. Ayrıca, CP'nin sitotoksik etkisi, testis dokusunda atrofiye sebep olarak testis ağırlıklarını anlamlı ölçüde düşürmüş olabilir.

Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) hipofizi uyarır ve hipofizden FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını sağlar. Hipofiz bezinden salgılanan LH hormonu, Leydig hücrelerinden Sertoli hücrelerindeki androjen reseptörü aracılığıyla spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi için çok önemli olan testosteron üretimini indüklerken, FSH hormonu ise, seminifer tübüllerde sperm üretiminin regulasyonunda görev almaktadır. Dolayısı ile testiküler hasarla ilişkili bir diğer tablo şüphesiz bu hormonların üretiminde meydana gelebilecek bozukluklardır. CP kullanımına bağlı gelişen testis hasarı ve disfonksiyonunu değerlendirdiğimiz çalışmamızda, sakrifikasyon öncesi hayvanlardan kardiak ponksiyon yoluyla kan örnekleri alınarak serumda total testosteron, FSH ve LH hormon analizleri ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. Buna göre CP grubunda kontrol ve QRC grupları ile kıyaslandığında, testosteron, FSH ve LH hormon seviyelerinde, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu saptandı. Ayrıca, CP ile CP+QRC grupları kıyaslandığında, QRC uygulamasının, serum testosteron, FSH ve LH hormon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi. CP'nin serum testosteron, FSH ve LH seviyelerinde sebep olduğu değişime dair farklı değerlendirmeler bulunmaktadır. CP enjeksiyonun, bu hormon seviyelerinde anlamlı bir değişime sebep olmadığı gösterildiği gibi (6), bizim sonuçlarımıza paralel olarak CP verilmesinin hormon seviyelerinde anlamlı düşüşe sebep olduğunu tespit eden birçok çalışma da mevcuttur (11,16,133,135). CP uygulanan doz ve uygulama şekli yönüyle bizim çalışmamıza benzer olan Oyagbemi ve ark. (16) yaptıkları çalışmada, CP'nin ip. yol ile 200 mg/kg tek doz olarak verildiğinde, serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş gösterdiğini bildirerek, CP'nin bu hormonların salgılanmasında önemli bir rol oynayan hipofiz bezi üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabileceğini ve serum testosteronundaki düşüşün testislerde CP ile indüklenen membran lipid peroksidasyonuna bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. CP verilerek testiküler toksisite değerlendirilen bir başka çalışmada Leydig

hücreleri elektron mikroskobik incelemesinde endoplazmik retikulum ve mitokondriyonlarda dilatasyon saptanmıştır ve testosterondaki azalma ile ilişkilendirilmiştir (136).

Siklofosfamid, yüksek mitotik aktiviteye sahip hücrelere karşı sitotoksiktir, bu da proliferatif gücü yüksek olan testis ve seminifer tübül epitelini bu ilacın zararlı etkileri için bir hedef haline getirir. Erkek hastalarda kanser tedavisi için CP kullanımı, oligospermi ve azospermi insidansını arttırır ve erkeklerde infertilite ile sonuçlanır (24,137). Bu histolojik değişimin arkasında testis dokusu ve seminifer tübül epitelindeki hasar yatmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, CP'nin testis dokusunda sebep olduğu morfometrik değişimleri değerlendirmek amacıyla; seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve interstisyel aralık ölçümleri Görüntüleme Analiz Sistemi yardımıyla gerçekleştirildi. Elde edilen morfometrik verilere göre, CP grubu ile kontrol ve QRC grubu karşılaştırıldığında, CP grubu seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır ve yaptığımız literatür değerlendirmesi sonucunda bulgularımız yapılan diğer çalışmalarla uyumluluk göstermiştir (4,76,131,135,136,138). Ayrıca çalışmamızda, CP grubuna ait interstisyel aralık verilerimiz kontrol ve QRC grupları ile karşılaştırdığımızda, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir ve benzer olarak yapılan çalışmalar CP maruziyeti sonucunda interstisyel aralıkta genişleme olduğunu belirtmektedir (136,139). CP enjeksiyonuna ek olarak QRC verdiğimiz grup CP grubu ile kıyaslandığında, her üç parametrede de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde iyileşme olduğu görüldü. CP ile ilgili literatür değerlendirmemiz ve bulgularımızdan yola çıkarak CP'ye bağlı ROS üretimi ve oksidatif stresteki artışın, DNA, protein ve enzimlere zarar vermek suretiyle Leydig hücre dejenerasyonuna, dolaylı olarak steroidogenez ve spermatogenezde bozulmaya neden olarak seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı üzerine dejeneratif etki göstermiş olabileceğini söyleyebiliriz. Ayrıca, tübül çaplarındaki azalma ve interstisyel dokudaki ödeme bağlı olarak interstisyel aralıkta genişlemeye yol açtığı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda seminifer tübüllerdeki germinal seri hücrerinde görülen histolojik yapı değişimlerine bağlı olarak, seminifer tübüller histolojik skorlama yöntemi ile değerlendirildi. Belirlenen kriterler olarak, normal, ayrılan, dökülen ve vakuolize seminifer tübüllerin sayıları belirlenerek gruplar arasında karşılaştırdığımızda, CP grubunda, normal seminifer tübüllerin kontrol ve QRC gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, buna karşılık; ayrılan, dökülen ve vakuolize hasarlı seminifer tübüllerin ise istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi. Görülen histolojik değişimler, seminifer tübül dejenerasyonuna bağlı organizasyon bozukluğu ve tübüler küçülme/atrofi, germinal seri hücrelerinde primer

spermatositlerden itibaren ayrılma, vakuolizasyon, immatür hücre dökülmesi, interstisyel aralıkta yer yer izlenen ödeme eşlik eden konjesyon veya hemoraji şeklinde idi. CP maruziyetinde seminifer tübüllerde görülen yukarıda ifade edilen dejeneratif değişiklikler literatür ile uyumludur (18,19,24,136).

Siklofosfamide ek olarak QRC verilen tedavi grubunda, CP grubu ile karşılaştırıldığında vücut ağırlığındaki azalmayı anlamlı derecede iyileştirdiği tespit edildi. Yine CP+QRC grubunda testis ağırlıkları, CP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber daha yüksek saptandı Testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı ise, CP grubuna kıyasla daha düşük olmasına rağmen aradaki fark anlamlı bulunmadı. Bundan başka, serum FSH, LH ve testosteron düzeylerinin CP grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yükseldiği, seminifer tübül çapları ve epitel kalınlığının anlamlı düzeyde artışı ile birlikte interstisyel aralıklardaki genişlemelerin anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi. Ayrıca, seminifer tübül histolojik değerlendirmesinde QRC etkisiyle, ayrılan, dökülen ve vakuolize seminifer tübül sayılarının CP grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu saptandı.

Flavonoidler, bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerdir ve antioksidan etkinlikleri dolayısı ile gündemde yerlerini korumaktadırlar. Son yıllarda, farklı şifalı bitkilerden elde edilen flavonoid içerikli bitki özlerinin tedavi edici özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda, çeşitli doku hasarı modellerinde oldukça etkili koruma sağladığı ifade edilmektedir (4,19,140,141). Bir flavonoid olan QRC, bitki kökenli bir antioksidandır ve meyve ve sebzelerde bol miktarlarda bulunur. Esas olarak glikozidik formda oluşan geniş bir polifenolik flavonoid bileşik sınıfına aittir. Araştırmalarda, QRC'nin hücre içinde elektron veya H^+ iyonu eksiğini karşılayarak hidroksil grupları, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonları gibi serbest radikalleri temizleme ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlama yeteneği nedeniyle güçlü bir antioksidan etkinlik göstermesinin yanı sıra, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (29,118,142-144).

Tedavi grubundaki bulgularımızı diğer çalışmalar ile birlikte değerlendirdiğimizde, bizim çalışmamızdaki bulgularımıza paralel olarak hayvanların vücut ağırlığı azalmasındaki QRC'nin koruyucu etkisi Wang ve ark. (39) tarafından da kadmiyum maruziyetine karşı gösterilmiştir. Yine bizim bulgularımıza benzer şekilde, QRC'nin serum testosteron, FSH ve LH seviyelerindeki koruyucu etkisi Al-Omair ve ark. (142) tarafından belirtilerek çalışmada oluşturulan kurşun maruziyetinde antioksidan etkinliği yanında metal şelatör özelliği vurgulanan QRC'nin bu değerleri anlamlı düzeyde arttırdığı ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada, CP'ye benzer olarak ROS üretiminin artışı ve buna bağlı olarak hücrelerde

oksidatif stresin indüklenmesi ile testis hasarına neden olan arsenik uygulamasına ek olarak hayvanlara günlük 50 mg/kg QRC verildiğinde, seminifer tübül çaplarının ve germinal epitel kalınlıklarının anlamlı ölçüde arttığı, interstisyel aralıktaki genişlemenin ise anlamlı ölçüde azaldığı vurgulanmıştır (118). Aynı araştırmacılar, bisfenol hasarına karşı aynı dozda QRC'nin koruyucu etkisini değerlendirmeye yönelik yaptıkları çalışmada her üç parametrenin de QRC verilmesiyle iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir (144). QRC, antioksidan etkinliği yoluyla dokudaki ROS üretimi azaltarak germinal seri hücrelerinin mitogenik aktivitelerinin devamını ve Leydig hücrelerinde gerçekleşen testosteron üretiminin devamlılığını sağlayarak spermatogenezin devamına katkı sağladığı ve bu sayede seminifer tübüllerin histolojik özelliklerinin korunmuş olabileceği kanısındayız.

Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarına ait testis dokularındaki NFkB, Nrf2, Bax ve Bcl-2 immünoreaktiviteleri değerlendirilerek CP'ye bağlı olarak ortaya çıkan gonadotoksisitede QRC'nin bu proteinler üzerinden testis dokusundaki muhtemel koruyucu etkisi incelendi.

Nükleer faktör kappa B'nin, DNA'ya doğrudan bağlanarak çeşitli gen ekspresyonlarını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir. Oluşan oksidatif stresin IKB kinazları tarafından IKB'nin fosforilasyonu yoluyla NFkB'yi aktive ettiği gösterilmiştir (145). NFkB; sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri dahil olmak üzere pek çok proinflamatuvar gen ekspresyonunda ve oluşan inflamatuvar yolağın indüksiyonunda etkili olmaktadır (97). NFkB immünoreaktivitesini değerlendirdiğimiz çalışmada, CP grubunda kontrol ve QRC gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, CP'ye ek olarak QRC'nin tedaviye eklenmesiyle CP grubuna göre, NFkB immünoreaktivitesi anlamlı derecede azalma gösterdi. Rezaei ve ark. (125) farelere tek doz 200 mg/kg CP vererek meydana getirdikleri testiküler toksisitede immünohistokimyasal düzeyde NFkB aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Yine yapılan bir çalışmada, haftalık 150 mg/kg CP'nin sıçanlara 3 hafta verildikten sonra NFkB aktivasyonunun immünohistokimyasal düzeyde arttığı ifade edilmiştir (23). Ham petrol maruziyeti ile ROS üretimi artışına bağlı olarak oksidatif stres oluşturulan testis dokusunda artan NFkB ekspresyonunun, QRC'nin tedaviye eklenmesiyle azalma gösterdiğini belirten Ebokaiwe ve ark (146) ayrıca, QRC'nin lipid membran stabilizasyonu sağlayarak hücrelerde lipit peroksidasyonunu engellediğini ve bu sayede serbest radikal temizleyici bir ajan olarak görev aldığını da yaptıkları çalışmada rapor etmişlerdir. Ek olarak, QRC'nin kardiyak miyopati oluşturulmuş hayvanlarda NFkB mRNA düzeyini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği gösterilmiştir (141). Yapılan bir in vitro çalışmada Leydig

hücrelerinde atreziye bağlı ortaya çıkan oksidatif strese karşı QRC verilmesi sonucunda NFkB mRNA ve protein ekpresyonlarının anlamlı düzeyde düştüğü bildirilmiştir (147). Bizim çalışmamızda NFkB immünorektivitesinin QRC'nin tedaviye eklenmesi ile anlamlı düzeyde azalmasının, germinal seri hücreleri üzerinde antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstermesinin yanı sıra, Leydig hücrelerindeki steroidogenezin daha sağlıklı ilerlemesine bağlı olarak seminifer tübüllerdeki spermatogenez sürecine olumlu katkı sağladığı ve seminifer tübül hasarının da bu şekilde önüne geçmiş olabileceği düşüncesindeyiz.

Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2, inflamatuvar hücrelerin toplanmasını düzenleyen ve antioksidan cevap elemanı ARE yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyerek antiinflamatuvar sürece katkıda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (85). Yaptığımız çalışmada, Nrf2'yi tüm gruplardaki testis doku kesitlerinde immünohistokimyasal boyama ile değerlendirdik. Nrf2 immünoreaktivitesi CP grubunda kontrol ve QRC gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma gösterirken, CP+QRC grubunda CP grubuna kıyasla anlamlı derecede artış sergiledi. CP'ye bağlı olarak testis dokusunda Nrf2 düzeylerinin azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur ve bizim bulgularımızla uyumludur (23,148,149). Le ve ark. (149)'na göre, CP sebebiyle Nrf2 fosforilasyonundaki aksamaya bağlı olarak Nrf2'nin nükleusa transloke olamaması ve bunun sonucunda antioksidan enzimlerin üretilememesi ile hücrelerde ROS artışı ve doku hasarı meydana gelmektedir. Bir diğer yandan çalışmamıza benzer olarak gonadotoksik etkileri nedeniyle kullanımı sınırlandırılmış terapötik bir ajan olan triptolidin neden olduğu Leydig hücre hasarında, QRC'nin Nrf2 protein ekspresyonunu anlamlı düzeyde yükselttiği belirtilerek, Nrf2'nin antioksidan bir transkripsiyon faktörü olarak hücrede görev aldığı vurgulanmaktadır (28). Sherif ve ark. (40) ise, CP hepatotoksisitesinde olauropein ve QRC'nin koruyucu etkinliğini değerlendirerek azalan Nrf2 ekspresyonunun QRC ile anlamlı olarak arttığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda QRC'nin Nrf2 immünoreaktivitesini arttırması daha önceki çalışmalarda elde edilen bulguları destekler niteliktedir.

Nükleer faktör kappa B, Nrf2 aktivitesini antagonize eden bir transkripsiyon faktörüdür (85). Maremanda ve ark. (23) yaptıkları çalışmada CP'ye bağlı olarak gelişen testiküler hasarda dokudaki NFkB protein ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını, buna karşın Nrf2 ekspresyonunun ise anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Buna göre, aralarındaki antagonist ilişkinin, Nrf2 ve NFkB yolakları hücre içi redoks dengesi ile hücrelerin stres ve inflamasyona tepkilerini düzenlediğini göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bu fikri desteklemektedir.

Apoptoz, iyonlaştırıcı radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar gibi DNA'ya zarar veren maddeler tarafından indüklenebilen aktif bir süreçtir ve Bcl-2 protein ailesi, hücrelerde apoptozu kontrol eden önemli hücre ölümü düzenleyicisidirler (109,110). Bax ve Bcl-2 proteinleri apoptozisle ilişkili olan Bcl-2 protein ailesine dahil proteinlerdir. Bax hücrede proapoptotik etkinliğe sahip iken, Bcl-2 antiapoptotik bir göreve sahiptir (111). Hücre içi Bcl-2 ve Bax proteinleri arasındaki ilişki, apoptotik bir uyaranın ardından hücrelerin hayatta kalmasını veya ölüme gidişini belirleyen bir denge olarak karşımıza çıkmaktadır (112). Biz de çalışmamızda Bax ve Bcl-2 proteinlerinin testis dokusundaki immünoreaktivitelerini araştırdık. Bax immünoreaktivitesinde, CP grubunda anlamlı bir artış görülürken, Bcl-2 proteini aynı grupta belirgin düzeyde azalma gösterdi. CP+QRC grubunda ise CP grubuna kıyasla, Bax proteini anlamlı olarak azalırken, Bcl-2 immünoreaktivitesi anlamlı düzeyde artış gösterdi. Bax ve Bcl-2 proteinlerinin testisteki gen ve protein ekspresyonları ile immünohistokimyasal değerlendirmelerinin yapıldığı pek çok çalışmada bizim bulgularımızla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (11,28,143,150-152). Yamamoto ve ark. (153), testiküler hipertermi çalışmalarında kontrol grubunda Bax immünoreaktivitesini diffüz sitoplazmik boyanma ile izlerken, hipertermi grubunda perinükleer boyanma olduğunu belirtmişlerdir. Biz de kontrol ve QRC gruplarında zayıf düzeyde diffüz sitoplazmik boyanma, CP grbunda ise güçlü ve yer yer perinükleer yerleşim de gösterebilen immünoreaktivite gözlemledik. Sitozolik Bax'ın maruz kalınan zararlı ajana bağlı olarak hücre içindeki yer değişimi ve bu proapoptotik proteinin apoptoz indüksiyonunda görev aldığının göstergesi kabul edilebilir.

B hücreli lenfoma-2 protein ailesi, mitokondriyal apoptotik yolda önemli bir rol oynar. Bcl-2, mitokondriyondan sitozole sitokrom c salınımını geciktiren Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyesidir, Bax ise Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesidir ve mitokondriondan sitozole sitokrom c salımını teşvik ederek Bcl-2'nin sitoprotektif etkisine karşı koyar (154). CP grubundaki perinükleer Bax artışının mitokondriyal translokasyonla birlikte sitokrom c salınımına öncülük etmesi ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Buna karşın, Bcl-2'nin kontrol ve QRC gruplarında güçlü perinükleer boyanma gösterirken CP grubunda zayıf ve nispeten diffüz immünoreaktiviteye sahip olmasının CP etkisi ile Bax'ın mitokondriyal etkinliği sonucu oluştuğu kanaatindeyiz.

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, hücrelerin kontrollü olarak ölüme gitmesine neden olan, hücrelerde morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilen fizyolojik bir olaydır (155). Seminifer tübüllerdeki spermatogenez sürecinde hücrelerde görülen proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengenin bozulması

spermatogenezde aksamaya neden olarak bu aktif sürecinin bozulması ile sonuçlacaktır. Bu süreçte aksamaya neden olabilecek diyabet, radyasyon, kimyasal madde ve ilaç kullanımı, beslenme ve termal stres gibi germinal seri hücrelerine etki ederek oksidatif stres oluşumunu tetikleyen pek çok dış kaynaklı etken mevcuttur. CP kullanımına bağlı olarak germinal seri hücrelerindeki apoptotik indeksin anlamlı düzeyde arttığı ve erkek subfertilitesine neden olduğu bildirilmektedir (116,129). Biz de çalışmamızda apoptotik hücre ve tübül indekslerini TUNEL metodu yolu ile değerlendirdik. Sonuçlar incelendiğinde, CP grubuna ait apoptotik hücre ve apoptotik tübül indekslerinin kontrol ve QRC grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığını, CP ile birlikte QRC uyguladığımız tedavi grubumuzda ise bu değerlerin CP grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığını tespit ettik. Oksidatif stresin indüklendiği ve apoptozun artış gösterdiği farklı deneysel çalışmalarda, QRC'nin artan bu apoptozu önemli düzeyde azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (155-157). Bulgularımız ve incelenen mevcut çalışmalar ışığında, QRC'nin germinal seri hücrelerinde ROS'un zararlı etkilerini engelleyerek DNA fragmantasyonunu engellediği veya azalttığı ifade edilebilir.

Siklofosfamid kullanımına bağlı infertilite üzerine hücre içi sinyal yolaklarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Hücre içi dinamiklerin belirleyiciliği hakkında proapoptotik ve antiapoptotik yolaklar, bu yolaklarda görevli olan transkripsiyon faktörleri ve proteinler, CP kullanımına bağlı infertilitenin altında yatan apoptozis mekanizmasının aydınlatılması ve dokularda meydana gelen hasarların önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Yaptığımız literatür değerlendirmesine göre, CP kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan testis doku hasarı ve erkek infertilitesinde QRC'nin koruyucu etkinliğini değerlendirmeye yönelik yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu noktadan yola çıkarak planladığımız çalışmamızda, QRC'nin CP kullanımı esnasında ve öncesinde tedaviye eklenmesi ile NFkB ve Bax ekspresyonlarında belirgin düzeyde azalma, Nrf2 ve Bcl-2 ekspresyonlarında ise önemli oranda artış olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak, QRC'nin dokuda inflamatuvar ve apoptotik yolak inhibisyonu sağlayarak ve DNA hasarını engelleyerek doku hasarı ve infertilitenin azaltılmasına etki edebileceği ileri sürülmektedir.

Özetle, bu çalışmada güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar olan QRC, klinikte yaygın kullanıma sahip bir antitümoral ajan olan CP'nin neden olduğu testis hasarına karşı kısmen koruyucu etki göstermiştir ve bu etkiyi hücre içi inflamatuvar ve apoptotik yolakların inhibisyonunu sağlayarak gerçekleştirmektedir. Klinikte CP kullanımı sırasında ortaya

çıkabilecek infertiliteye karşı yeni tedavi protokolleri geliştirilerek QRC'nin tedaviye eklenmesi ile erkek infertilitesi riskinin azaltılabileceği kanısındayız.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, CP maruziyetinin neden olduğu oksidatif stresin tetiklemesiyle ortaya çıkan testis hasarına karşı, güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar olan QRC'nin koruyucu etkisi, histolojik, immunohistokimyasal, hormonal parametreler ile değerlendirilerek ilaç kullanımına bağlı ortaya çıkan erkek infertilitesinde muhtemel önleyici etkinliği araştırılmıştır.

Tüm incelemeler sonucunda,

1. Çalışmanın 7. gününde intraperitoneal yol ile tek doz olarak 200 mg/kg CP verilen deneklerin vücut ağırlığı değişimlerinde ve testis ağırlıklarında anlamlı azalma görülürken, testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarında anlamlı düzeyde artış saptandı. Bununla birlikte, 14 gün boyunca intragastrik yol ile 100/mg/kg/gün uygulanan QRC tedavisinin, CP'nin neden olduğu vücut ağırlıklarındaki düşüşü anlamlı düzeyde önlediği, testis ağırlıklarını bir miktar arttırdığı ancak bu artışın anlamlı olmadığı tespit edildi. Ayrıca, testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarında ise bir miktar azalma sağlamasına rağmen bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

2. CP'nin serumda total testosteron, FSH ve LH düzeylerinde anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edildi. QRC uygulamasının, serumdaki total testosteron, FSH ve LH düzeylerindeki düşüşü anlamlı derecede önlediği saptandı.

3. Ayrıca H&E boyalı kesitlerde yapılan morfometrik analizler değerlendirildiğinde, oluşan testis hasarına bağlı olarak, CP'nin seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlıklarında anlamlı düzeyde azalmaya sebep olduğu görülürken, interstisyel aralıkta genişlemeye neden olduğu tespit edildi. QRC uygulamasının, seminifer tübül çapları ve

germinal epitel kalınlıklarındaki azalmayı önlediği ve interstisyel aralıklarda görülen genişlemeyi anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.

4. CP'nin testis dokusunda, hücresel düzeyde hasar meydana getirdiği gözlendi. Bu hasar, seminifer tübüllerde ayrılma, immatür hücrelerin lümene dökülmesi, germinal seri hücreleri arasında vakuolizasyon şeklinde izlenirken, interstisyel aralıkta yer alan kan damarlarında konjesyon veya hemoraji ile bu sahada genişleme olarak belirlendi. Yapılan histolojik skor değerlendirmesinde QRC'nin bu hasarı anlamlı olarak önlediği belirlendi.

5. İmmünohistokimyasal olarak yapılan değerlendirmeye göre CP enjeksiyonu ile, NFkB ve Bax immünoreaktiviteleri anlamlı ölçüde artarken, Nrf2 ve Bcl-2 immünoreaktiviteleri anlamlı düzeyde azalmış olarak saptandı. Diğer yandan QRC verilmesiyle, NFkB ve Bax immünoreaktivitelerinde azalma görülürken, Nrf2 ve Bcl-2 immünoreaktivitelerinde ise anlamlı düzeyde artış olduğu belirlendi.

6. CP enjeksiyonun, seminifer tübüllerde ortalama tübül başına düşen apoptotik hücre sayısı (apoptotik hücre indeksi) ve en az bir apoptotik hücre içeren tübül sayısında (apoptotik tübül indeksi) artışa neden olduğu tespit edilirken, QRC'nin tedaviye eklenmesi ile apoptotik hücre ve tübül indeksinde istatisitiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

Elde ettiğimiz veriler sonucunda, pek çok neoplastik ve otoimmün hastalığın tedavisinde ve organ transplantasyonunda immünsüpresif olarak yaygın bir şekilde kullanılan CP, erkek bireylerde tedaviye bağlı toksik etki göstererek testis dokusunda serbest oksijen radikallerinin artışı ile oksidatif strese ve buna bağlı olarak infertiliteye sebep olabilmektedir. Güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar olan QRC'nin ise, hücre içi inflamatuvar ve apoptotik yolakların inhibisyonunu sağlayarak oksidatif strese karşı hücresel düzeyde koruma sağladığı bilinmektedir. Klinikte CP kullanımı sırasında erkek bireylerde ortaya çıkabilecek infertiliteye karşı QRC'nin yeni tedavi protokolleri vasıtasıyla tedaviye eklenmesi ile erkek infertilitesinin riskinin azaltılabileceği kanısındayız.

ÖZET

Siklofosfamid, antitümoral ve immünosupresif etkileri ile klinikte yaygın kullanıma sahip olan, sitotoksik alkilleyici bir ajandır. Özellikle bölünme evresindeki hücrelere karşı etkinliği sebebiyle en önemli yan etkilerinden biri testislerde doku hasarına neden olmasıdır. Quercetin fenolik bir bileşen olup, yapılan çalışmalarda çeşitli ajanların sebep olduğu testis hasarının önüne geçebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, siklofosfamidin neden olduğu testis hasarına karşı quercetinin koruyucu etkisinin histolojik, immunohistokimyasal ve hormonal parametreler ile değerlendirilmesi planlandı.

Kırk adet *Wistar albino* erkek sıçan her grupta 10 adet olacak şekilde dört eşit gruba ayrıldı: Birinci grup 14 gün mısır yağı verilen kontrol grubu olarak belirlendi. İkinci (Quercetin) ve dördüncü (Siklofosfamid+Quercetin) gruba mısır yağı içinde çözünerek quercetin (100 mg/kg) intragastrik yol ile 14 gün boyunca verildi. Üçüncü (Siklofosfamid) ve dördüncü (Siklofosfamid+Quercetin) gruba siklofosfamid (200 mg/kg) çalışmanın 7. gününde tek doz olarak intraperitoneal yolla enjekte edildi. Son quercetin uygulamasından 24 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek testis dokuları histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için çıkarıldı. İntrakardiyak ponksiyonla alınan kan örneklerinde serum testosteron, FSH ve LH seviyeleri belirlendi. Hayvanların vücut ağırlık değişimleri ve testis ağırlıkları kaydedildi. Histolojik ve morfometrik analizler hematoksilen ve eozin boyalı kesitler ile gerçekleştirildi. Ayrıca, NFkB, Nrf2, Bax ve Bcl-2 immunoreaktiviteleri immünohistokimyasal olarak, hücre apoptozu ise TUNEL metodu ile değerlendirildi.

Siklofosfamid, vücut ve testis ağırlıkları ile serum testosteron, FSH ve LH düzeylerini anlamlı olarak azalttı, testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranını ise arttırdı. Ek olarak, siklofosfamid

enjeksiyonu ile seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı azalırken, interstisyel aralıkta ve histolojik hasarda anlamlı artış görüldü. Bundan başka, siklofosfamid grubunda NFkB ve Bax immünoreaktivitesi ile apoptotik hücre ve tübül indeksinde artış, Nrf2 ve Bcl-2 immünoreaktivitesinde ise anlamlı azalma görüldü. Quercetin, testis ağırlığı ve oranı haricindeki tüm bulgularda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde iyileşme sağladı.

Sonuç olarak bu çalışma, quercetinin siklofosfamidin neden olduğu testis hasarını NFkB, Nrf2 ve apoptotik yolakları etkilemesi aracılığıyla azaltabileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, NFkB, Nrf2, quercetin, siklofosfamid, testis

PROTECTIVE EFFECTS OF QUERCETIN AGAINST CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED TESTICULAR DAMAGE

SUMMARY

Cyclophosphamide is a cytotoxic alkylating agent that is widely used in the clinic with its antitumoral and immunosuppressive effects. One of the most important side effects is that it causes tissue damage in the testicles, especially due to its effectiveness against cells in the division phase. Quercetin is a phenolic component and has been shown to prevent testicular damage caused by various agents. In this study, it was planned to evaluate the protective effect of quercetin against testicular damage caused by cyclophosphamide with histological, immunohistochemical and hormonal parameters.

Forty Wistar albino male rats were divided into four equal groups, 10 in each group; The first group was determined as the control group, which was given corn oil for 14 days. In the second (Quercetin) and fourth (Cyclophosphamide+Quercetin) groups, quercetin (100 mg/kg) dissolved in corn oil and was administered intragastrically for 14 days. Third (Cyclophosphamide) and fourth (Cyclophosphamide+Quercetin) groups were injected intraperitoneally as a single dose of cyclophosphamide (200 mg/kg) on the 7th day of the study. Animals were sacrificed 24 hours after the last quercetin administration, and testis tissues were removed for histological and immunohistochemical evaluations. Serum testosterone, FSH and LH levels were determined in blood samples taken by intracardiac puncture. Body weight changes and testis weights of the animals were recorded. Histological and morphometric analyzes were performed with hematoxylin and eosin stained sections. In

addition, NFkB, Nrf2, Bax and Bcl-2 immunoreactivities were evaluated immunohistochemically and cell apoptosis was evaluated by TUNEL method.

Cyclophosphamide significantly decreased body and testicular weights, and serum testosterone, FSH and LH levels, while increasing the testicular weight/body weight ratio. In addition, seminiferous tubule diameter and germinal epithelial thickness decreased with cyclophosphamide injection, while a significant increase was observed in interstitial space and histological damage. Furthermore, NFkB and Bax immunoreactivity, and apoptotic cell and tubule index were increased in the cyclophosphamide group, whereas significant decrease was observed in Nrf2 and Bcl-2 immunoreactivity. Quercetin provided a statistically significant improvement in all findings except testicular weight and ratio.

In conclusion, this study suggests that quercetin may attenuate cyclophosphamide-induced testicular damage by affecting NFkB, Nrf2 and apoptotic pathways.

Key words: Apoptosis, cyclophosphamide, NFkB, Nrf2, quercetin, testis

KAYNAKLAR

1. Türker A ve Kayaalp SO. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastikler. Kayaalp SO (Editör). Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2002. s.380-415.

2. Fereidan-Esfahani M, Tobin WO.Cyclophosphamide in treatment of tumefactive multiple sclerosis. Mult Scler Relat Disord. 2021;47:102627.

3. Abraham P, Isaac B. The effects of oral glutamine on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in rats. Hum Exp Toxicol. 2011;30(7):616-23.

4. Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. Crataegus monogyna Aqueous Extract Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Toxicity in Rat Testis: Stereological Evidences. Acta Medica Iranica. 2012;50:1-8.

5. Lu WP, Mei XT, Wang Y, Zheng YP, Xue YF, Xu DH. Zn(II) curcumin protects against oxidative stress, deleterious changes in sperm parameters and histological alterations in a male mouse model of cyclophosphamide-induced reproductive damage. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2015;39:515-24.

6. Kaya C, Barbaros Baseskioglu A, Yigitaslan S, Yasemin Ozatik F, Ozatik O, Uslu S. The therapeutic potential of amifostine on cyclophosphamide-induced testicular dysfunction in rats: An experimental study. Int J Reprod Biomed. 2019;17(4):245-52.

7. Alanazi F, Kwa FAA, Burchall G, Jackson DE. New generation drugs for treatment of multiple myeloma. Drug Discov Today. 2020;25(2):367-379.

8. Yoo M, Tanaka T, Konishi H, Tanabe A, Taniguchi K, Komura K et al. The Protective Effect of Testosterone on the Ovarian Reserve During Cyclophosphamide Treatment. Onco Targets Ther. 2020;13:2987-2995.

9. Linschoten M, Kamphuis JAM, van Rhenen A, Bosman LP, Cramer MJ, Doevendans PA et al. Cardiovascular adverse events in patients with non-Hodgkin lymphoma treated with first-line cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) or CHOP with rituximab (R-CHOP): a systematic review and meta-analysis. Lancet Haematol. 2020;7(4):e295-e308.

10. Şekeroğlu V, Aydın B, Şekeroğlu ZA. Viscum album L. Extract and Quercetin Reduce Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity, Urotoxicity and Genotoxicity in Mice. Asian Pacific J Cancer Prev. 2011;12:2925-31.

11. Abd El Tawab AM, Shahin NN, Abdel Mohsen MM. Protective effect of Satureja montana extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. Chemico-Biological Interactions 2014;224:196--205.

12. Kurauchi K, Nishikawa T, Miyahara E, Okamoto Y, Kawano Y. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. BMC Res Notes. 2017;10(1):406.

13. Smart E, Lopes F, Rice S, Nagy B, Anderson RA, Mitchell RT et al. Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. Sci Rep. 2018;8(1):1773.

14. Stojiljković N, Ilić S, Stojanović N, Janković-Veličković L, Stojnev S, Kocić G et al. Nanoliposome-encapsulated ellagic acid prevents cyclophosphamide-induced rat liver damage. Mol Cell Biochem. 2019;458(12):185-195.

15. Cao Y, Wang X, Li S, Wang H, Yu L, Wang P. The Effects ofL-Carnitine Against Cyclophosphamide-Induced Injuries in Mouse Testis. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2017;120:152-158.

16. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Saba AB, Adedara IA, Olowu ER, Akinrinde AS et al. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. Andrologia. 2016;48(4):393-401.

17. Zhu B, Zheng YF, Zhang YY, Cao YS, Zhang L, Li XG et al. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. Biomed & Biotechnol. 2015;16(9):780-787.

18. Sakr SA, Mahran HA, Abo-El-Yazid SM. Effect of fenugreek seeds extract on cyclophosphamide-induced histomorphometrical, ultrastructural and biochemical changes in testes of albino mice. Toxicology and Industrial Health. 2012; 28(3):276--288.

19. Mohammadi F, Nikzad H, Taghizadeh M, Taherian A, Azami-Tameh A, Hosseini SM et al. Protective effect of Zingiber officinale extract on rat testis after cyclophosphamide treatment. Andrologia.2014;46:680--686.

20. Xie R, Chen L, Wu H, Chen T, Wang F, Chen X et al. GnRH Antagonist Improves Pubertal Cyclophosphamide-Induced Long-Term Testicular Injury in Adult Rats. Int J Endocrinol. 2018;2018:4272575.

21. Liu F, Li XL, Lin T, He DW, Wei GH, Liu JH et al. The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeletal changes and oxidative stress in Sertoli cells. Mol Biol Rep. 2012;39:493-500.

22. Zhao H, Jin B, Zhang X, Cui Y, Sun D, Gao C et al. Yangjing Capsule Ameliorates Spermatogenesis in Male Mice Exposed to Cyclophosphamide. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;980583: 1-8.

23. Maremanda KP, Khan S, Jena G. Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: Involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2014;445: 591--596.

24. Motawi TM, Sadik NA, Refaat A. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. Food Chem Toxicol. 2010;48(8-9):2326-36.

25. Arena AC, Jorge BC, Silva MC, de Barros AL, Fernandes AAH, Nóbrega RH et al. Acrocomia aculeata oil: Beneficial effects on cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. Andrologia. 2018;50(6):e13028.

26. Iqubal A, Syed MA, Najmi AK, Ali J, Haque SE. Ameliorative effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced gonadal toxicity in Swiss Albino mice: Biochemical-, histological- and immunohistochemical-based evidences. Andrologia. 2020;52(4):e13535.

27. Badr GM, Elsawy H, Sedky A, Eid R, Ali A, Abdallah BM et al. Protective effects of quercetin supplementation against short-term toxicity of cadmium-induced hematological impairment, hypothyroidism, and testicular disturbances in albino rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2019;26(8):8202-8211.

28. Hu J, Yu Q, Zhao F, Ji J, Jiang Z, Chen X et al. Protection of Quercetin against Triptolide-induced apoptosis by suppressing oxidative stress in rat Leydig cells. Chemi Biol. Interact 2015;240:38-46.

29. Baltaci BB, Uygur R, Caglar V, Aktas C, Aydin M, Ozen OA. Protective effects of quercetin against arsenic-induced testicular damage in rats. Andrologia. 2016 ;48(10):1202-1213.

30. Al-Rasheed MN, Fadda ML, Attia HA, Ali MH, Al-Rasheed NM. Quercetin inhibits sodium nitrite-induced inflammation and apoptosis in different rats organs by suppressing Bax, HIF1-α,TGF-β, Smad-2, and AKT pathways. J Biochem Mol Toxicol. 2016;00:1-7.

31. Ferrer EG, Salinas MV, Correa MJ, Naso L, Barrio DA, Etcheverry SB et al. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes. J Biol Inorg Chem. 2006;11:791-801.

32. Derosa G, Maffioli P, D'Angelo A, Di Pierro F. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). Phytother Res. 2021;35(3):1230-1236.

33. Zhang LL, Zhang HT, Cai YQ, Han YJ, Yao F, Yuan ZH et al. Anti-inflammatory Effect of Mesenchymal Stromal Cell Transplantation and Quercetin Treatment in a Rat Model of Experimental Cerebral Ischemia. Cell Mol Neurobiol. 2016;36:1023-1034.

34. Kashiwabara M, Asano K, Mizuyoshi T, Kobayashi H. Suppression of neuropeptide production by quercetin in allergic rhinitis model rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2016;16:132.

35. Oliveira MR, Nabavi SM, Braidy N, Setzer WN, Ahmed T, Nabavi SF. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. Biotechnol Adv. 2016;34(5):532-49.

36. Khorsandi L, Orazizadeh M, Moradi Gharibvand N, Hemadi M, Mansouri E. Beneficial effects of quercetin on titanium dioxide nanoparticles induced spermatogenesis defects in mice. Environ Sci Pollut Res. 2017;24(6):5595-5606.

37. Abarikwu SO, Simple G, Onuoha CS. Morphometric Evaluation of the Seminiferous Tubules and the Antioxidant Protective Effects of Gallic Acid and Quercetin in the Testis and Liver of Butyl Phthalate Treated Rats. Indian J Clin Biochem. 2020 ;35(1):20-31.

38. Naqvi S, Sharma H, Flora SJ. Lactobionic Acid Conjugated Quercetin Loaded Organically Modified Silica Nanoparticles Mitigates Cyclophosphamide Induced Hepatocytotoxicity. Int J Nanomedicine. 2019;14:8943-8959.

39. Wang J, Zhu H, Wang K, Yang Z, Liu Z. Protective effect of quercetin on rat testes against cadmium toxicity by alleviating oxidative stress and autophagy. Environ Sci Pollut Res Int. 2020;27:25278–25286.

40. Sherif IO. Uroprotective mechanism of quercetin against cyclophosphamide-induced urotoxicity: Effect on oxidative stress and inflammatory markers. J Cell Biochem. 2018;119(9):7441-7448.

41. Ahmed ZA, Abtar AN, Othman HH, Aziz TA. Effects of quercetin, sitagliptin alone or in combination in testicular toxicity induced by doxorubicin in rats. Drug Des Devel Ther. 2019;13:3321-3329.

42. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Ürogenital sistem (Çeviri: S. Polat-Leman Sencar). Dalçık H (Editör). Klinik Yönleriyle İnsan embriyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2016:260.

43. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology. Sixth Edition. Missouri: Elsevier; 2019:358-90.

44. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embriyology. 5th.Ed. Philadelphia: Elsiever Churchill Livingstone, 2015:394-428.

45. Sadler TW (Çeviri:AC. Başaklar). Langman Medikal Embriyoloji. 13. Baskıdan Çeviri. Ankara:Palme Yayıncılık;2017:250-277.

46. Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. Reprod Med Biol. 2019;18(3):247-255.

47. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Ankara: Feryal Matbaası, 1998:346-50.

48. Ross MH, Pawlina W (Çeviri: N. Demir). Erkek üreme sistemi. Baykal B (Ed.). Histoloji konu anlatımı ve atlas, ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile. Ankara: Palme Yayınları; 2014:787-8.

49. Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocrine Reviews.* 2019;40(4):857–905.

50. Sekido R, Lovell-Badge R. Genetic control of testis development. Sex Dev. 2013;7(1-3):21-32.

51. Josso N, Belville C, di Clemente N, Picard JY. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. Hum Reprod Update. 2005;11(4):351-6.

52. Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. Genes Dev. 2013;27(22):2409-26.

53. Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2016:430.

54. Harrison SM, Bush NC, Wang Y, Mucher ZR, Lorenzo AJ, Grimsby GM et al. Insulin-Like Peptide 3 (INSL3) Serum Concentration During Human Male Fetal Life. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:596.

55. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Abdomen (Çeviri: Tania Marur, Derya Ertem, Çağatay Barut). Kayıhan Şahinoğlu (Editör). Kliniğe Yönelik Anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2014:205-10.

56. Nassau DE, Chu KY, Blachman-Braun R, Castellan M, Ramasamy R. The pediatric patient and future fertility: optimizing long-term male reproductive health outcomes. Fertil Steril. 2020;113(3):489-499.

57. Rodprasert W, Virtanen HE, Mäkelä JA, Toppari J. Hypogonadism and Cryptorchidism. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;10:906.

58. Janquiera LC, Carneiro J. Temel histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çev. Ed.). İstanbul: Nobel tıp kitabevleri; 2006:431-42.

59. Mescher AL. Junqueira's Temel histoloji konu ve atlas. Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS (Editörler). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2019:439-59.

60. Gartner LP. Textbook of histology, 4th ed. İntenational ed. Phiadelphia: Elsevier; 2017:559-71.

61. Yıldırım M. Resimli insan anatomisi 2. Baskı. Ankara: Nobel tıp kitabevleri, 2012:119-120.

62. Yıldırım M. Resimli sistematik anatomi. İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2013:582-3.

63. Ovalle WK, Nahirney PC. Üriner Sistem (Çeviri: İ. Seçkin_E. Güzel Oğuz). Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P(Editörler). Netter Temel histoloji. Ankara: Güneş Tıp Evleri; 2009:354-72.

64. Kiersenbaum AL. (Çeviri: Ramazan Demir). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006:531-50.

65. Ellis H, Mahadevan V. Scrotum, testis and epididiymis. Surgery (Oxford). 2014;32(1):9-16.

66. Eşrefoğlu M. Özel histoloji 2.baskı. İstanbul: İstanbul tıp kitabevi, 2016:335-347.

67. Eroschenko VP. DiFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Demir R (Çev. Ed.). Ankara: Palme yayıncılık; 2016:477-83.

68. Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Adv Exp Med Biol. 2008;636:1-15.

69. Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365(1546):1593-605.

70. La HM, Hobbs RM. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. Cell Mol Life Sci. 2019;76(20):4071-4102.

71. Nishimura H, L'Hernault SW. Spermatogenesis. Curr Biol. 2017;27(18):R988-R994.

72. Khawar MB, Gao H, Li W.Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. Front Cell Dev Biol. 2019;7:195.

73. Migrenne S, Moreau E, Pakarinen P, Dierich A, Merlet J, Habert R et al. Mouse testis development and function are differently regulated by follicle stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life. PLoS One. 2012;7(12):e53257.

74. Kerr JB, Knell CM. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. Development. 1988;103(3):535-44.

75. Dökmeci İ, Dökmeci G. Türkiye İlaç Rehberi. İstanbul:Nobel Kitabevi, 1993:40,125.

76. Hosseini A, Zare S, Borzouei Z, Ghaderi Pakdel F. Cyclophosphamide-induced testicular toxicity ameliorate by *American ginseng* treatment: An experimental study. Int J Reprod Biomed (Yazd). 2018;16(11):711-718.

77. Qiu C, Cheng Y. Effect of Astragalus membranaceus polysaccharide on the serum cytokine levels and spermatogenesis of mice. Int J Biol Macromol. 2019;140:771-774.

78. Ponticelli C, Escoli R, Moroni G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? Autoimmun Rev. 2018;17(10):1022-1027.

79. Kantemir İ. Farmakoloji. Ankara: Ayyıldız Matbaası, 1975:343-4.

80. Pavan KV, Arthanareeswarı M, Ravıkıran A,Kamaraj P. Sorption-Desorption Behavior and Characterization of Cyclophosphamide. Chem Sci Trans. 2013;2(S1),135-140.

81. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nat Rev Clin Oncol. 2009;6(11):638-47.

82. Kayaalp SO. Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2018: 343-44, 370.

83. Dökmeci İ. Farmakıoloji Temel Kavramlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2000: 997.

84. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? Br J Cancer. 1991;64(1):192-6.

85. Tu W, Wang H, Li S, Liu Q, Sha H. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. Aging Dis. 2019;10(3):637-651.

86. Kerr J F, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics Br. J. Cancer. 1972;26:239–57.

87. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. Phys Biol. 2016;13(3):031001.

88. Cooper GM, Hausman RE. (Çeviri: Neşe Atabey, Ersan Kalay, Meral Sakızlı). Hücre Moleküler Yaklaşım. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi;2016:692.

89. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

90. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. Curr Mol Med. 2008;8(3):207-20.

91. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017;1863(2):585-597.

92. Coman C, Socacıu C. Molecular Modeling of Quercetin Binding to the Peroxisome Proliferator- Activated Receptor-Gamma. Bulletin UASVM Agriculture, 2011;68(2):2014-11.

93. Williams RA, Timmis J, Qwarnstrom EE. Computational Models of the NFkB Signalling Pathway. Computation 2014;2:131-158.

94. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell. 1986;46(5):705-16.

95. Şen M. Melis, Ay U, Akbayır E, Şenyer S, Tüzün E, Küçükali Cİ. Nfkb, Sumo ve Ubikitanasyon İlişkisi. Deneysel Tıp Dergisi. 2017;7(13):36-46.

96. Wang Y, Wang R, Wang Y, Peng R, Wu Y, Yuan Y. Ginkgo biloba extract mitigates liver fibrosis and apoptosis by regulating p38 MAPK, NF-κB/IκBα, and Bcl-2/Bax signaling. Drug Des Devel Ther. 2015;9:6303-17.

97. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(6):a001651.

98. Hayden MS. Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. Genes Dev. 2012;26(3):203-34.

99. Sohur US, Dixit MN, Chen CL, Byrom MW, Kerr LA. Rel/NF-kappaB represses bcl-2 transcription in pro-B lymphocytes. Gene Expr. 1999;8(4):219-29.

100. Soyocak A, Kurt H, Özgen M, Coşan DT, Değirmenci İ, Çolak E ve ark. Diz Osteoartrit Hastalarının Evrelerine Göre Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB) Aktivitesi. Osmangazi Tıp Dergisi 2016;38(1):1-7.

101. Cuadrado A, Martín-Moldes Z, Ye J, Lastres-Becker I. Transcription factors NRF2 and NF-κB are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. J Biol Chem. 2014;289(22):15244-58.

102. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017;1863(2):585-597.

103. Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR et al. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. Ann N Y Acad Sci. 2008;1147:61-9.

104. Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S et al.Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. Biochem Pharmacol. 2008;76(11):1485-9.

105. Li Y, Huang Y, Piao Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K et al. C.Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis. Reprod Biol Endocrinol. 2013;11:23.

106. Sznarkowska A, Kostecka A, Meller K, Bielawski KP. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. Oncotarget. 2017;8(9):15996-16016.

107. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Mitic M, Lukic I, Radojcic MB. Alterations in the Nrf2-Keap1 signaling pathway and its downstream target genes in rat brain under stress. Brain Res. 2015;1602:20-31.

108. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medical Application. Molecules. 2019;24(06):1-15.

109. Findley HW, Gu L, Yeager AM, Zhou M. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1997;89(8):2986-93.

110. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. Cell Death Differ. 2018;25(1):65-80.

111. Mehrbod P, Ande SR, Alizadeh J, Rahimizadeh S, Shariati A, Malek H et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. Virulence. 2019;10(1):376-413.

112. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene. 2007;26(9):1324-37.

113. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res. 2009;15(4):1126-32.

114. Tunç İ, Sema Zergeroğlu, Daylan BH, Aydoğdu T, Mollamahmutoğlu L. Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonları ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi. Aral.k 2004;7(4):140-148.

115. Lebedeva OP, Zhukova IO, Ivashova ON,Pakhomov SP ,Churnosov MI. Proteins P53 and BCL-2 in pathogenesis of missed and spontaneous abortions. Drug Invention Today. 2017;9(3): 65-8.

116. Yuan D, Wang H, He H, Jia L, He Y, Wang T et al. Protective Effects of Total Flavonoids from Epimedium on the Male Mouse Reproductive System Against Cyclophosphamide-Induced Oxidative Injury by Up-Regulating the Expressions of SOD3 and GPX1. Phytother Res. 2014;28(1):88-97.

117. Nagi MN, Al-Shabanah OA, Hafez MM, Sayed-Ahmed MM. Thymoquinone supplementation attenuates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. J Biochem Mol Toxicol. 2011;25(3):135-42.

118. Jahan S, Ain QU, Ullah H. Therapeutic effects of quercetin against bisphenol A induced testicular damage in male Sprague Dawley rats. Syst Biol Reprod Med. 2016;62(2):114-24.

119. Şengül E, Gelen V, Gedikli S, Özkanlar S, Gür C, Çelebi F et al. The protective effect of quercetin on cyclophosphamide-Induced lung toxicity in rats. Biomed Pharmacother. 2017;92:303-307.

120. Kumar A, Nagar M. Histomorphometric study of testis in deltamethrin treated albino rats. Toxicol Rep. 2014;1:401-410.

121. Orazizadeh M, Khorsandi L, Absalan F, Hashemitabar M, Daneshi E. Effect of beta-carotene on titanium oxide nanoparticles-induced testicular toxicity in mice. J Assist Reprod Genet. 2014;31(5): 561–568.

122. Uz YH, Murk W, Bozkurt I, Kizilay G, Arici A, Kayisli UA. Increased c-Jun Nterminal kinase activation in human endometriotic endothelial cells. Histochem Cell Biol. 2011;135(1):83-91.

123. Yazdani I, Majdani R, Ghasemnejad-Berenji M, Dehpour AR. Comparison of multiple doses of cyclosporine A on germ cell apoptosis and epididymal sperm parameters after testicular ischemia/reperfusion in rats. Exp Mol Pathol. 2019 ;110:104271.

124. Abdallah HMI, Abdel-Rahman RF, El Awdan SA, Allam RM, El-Mosallamy AEMK, Selim MS et al. Protective effect of some natural products against chemotherapy-induced toxicity in rats. Heliyon. 2019;5(5):e01590.

125. Rezaei S, Hosseinimehr SJ, Zargari M, Karimpour Malekshah A, Mirzaei M, Talebpour Amiri F. Protective effects of sinapic acid against cyclophosphamide-induced testicular toxicity via inhibiting oxidative stress, caspase-3 and NF-kB activity in BALB/c mice. Andrologia. 2021:e14196.

126. Zhai J, Zhang F, Gao S, Chen L, Feng G, Yin J et al. Schisandra chinensis extract decreases chloroacetaldehyde production in rats and attenuates cyclophosphamide toxicity in liver, kidney and brain. J Ethnopharmacol. 2018;210:223-231.

127. Jo J, Kang MJ, Lee JM, Kim H, Jerng UM. Effects of traditional Korean medicine on anti-Müllerian hormone in patients with diminished ovarian reserve: A retrospective study. Complement Ther Med. 2016;24:118-22.

128. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. Toxicology. 2008 Jun 27;248(2-3):96-103.

129. Kim SH, Lee IC, Ko JW, Shin IS, Moon C, Kim SH et al. Mechanism of protection by diallyl disulfide against cyclophosphamide-induced spermatotoxicity and oxidative stress in rats. Mol Cell Toxicol. 2016;12:301-312.

130. Salimnejad R, Soleimani Rad J, Mohammad Nejad D, Roshangar L. Effect of ghrelin on total antioxidant capacity, lipid peroxidation, sperm parameters and fertility in mice against oxidative damage caused by cyclophosphamide. Andrologia. 2018;50(2).1-7.

131. Onaolapo AY, Oladipo BP, Onaolapo OJ. Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. Andrologia. 2018;50(3).1-10.

132. Kanno TYN, Sensiate LA, Paula NA, Salles MJS. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice . Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;45(2).313-9.

133. Ekeleme-Egedigwe CA, Famurewa AC, David EE, Eleazu CO, Egedigwe UO. Antioxidant potential of garlic oil supplementation prevents cyclophosphamide-induced oxidative testicular damage and endocrine depletion in rats. Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism.2019;18(100109).1-6.

134. Kim SH, Lee IC, Baek HS, Moon C, Kim SH, Kim JC. Protective effect of diallyl disulfide on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats. Lab Anim Res. 2013;29(4):204-11.

135. Hamzeh M, Hosseinimehr SJ, Karimpour A, Mohammadi HR, Khalatbary AR, Talebpour Amiri F. Cerium Oxide Nanoparticles Protect Cyclophosphamide-induced Testicular Toxicity in Mice. Int J Prev Med. 2019;10(5):1-9.

136. Anan HH, Zidan RA, Abd El-Baset SA, Ali MM. Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on cyclophosphamide induced testicular injury in adult rat. Tissue Cell. 2018;54:80-93.

137. Howell, S, Shalet, S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 1998;27(4):927-43.

138. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanalinejad F. Ethyl Pyruvate Ameliorates The Damage Induced by Cyclophosphamide on Adult Mice Testes. Int J Fertil Steril. 2016;10(1):79-86.

139. Shittu SA, Shittu ST, Akindele OO, Kunle-Alabi OT, Raji Y. Protective action of N-acetylcysteine on sperm quality in cyclophosphamide-induced testicular toxicity in male Wistar rats. JBRA Assist Reprod. 2019;23(2):83-90.

140. Yang J, Yuan L, Wen Y, Zhou H, Jiang W, Xu D, Wang M. Protective Effects of Naringin in Cerebral Infarction and Its Molecular Mechanism. Med Sci Monit. 2020;26:e918772.

141. Fadda LM, Attia HA, Al-Rasheed NM, Ali HM, Al-Rasheed NM. Roles of some antioxidants in modulation of cardiac myopathy induced by sodium nitrite via down-regulation of mRNA expression of NF-κB, Bax, and flt-1 and suppressing DNA damage. Saudi Pharm J. 2018;26(2):217-223.

142. Al-Omair MA, Sedky A, Ali A, Elsawy H. Ameliorative potentials of quercetin against lead-induced hematological and testicular alterations in Albino rats. Chin J Physiol. 2017;60(1):54-61.

143. Nna VU, Ujah GA, Mohamed M, Etim KB, Igba BO, Augustine ER et al. Cadmium chloride-induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. Biomed Pharmacother. 2017;94:109-123.

144. Jahan S, Iftikhar N, Ullah H, Rukh G, Hussain I. Alleviative effect of quercetin on rat testis against arsenic: a histological and biochemical study. Syst Biol Reprod Med. 2015;61(2):89-95.

145. Koohsari M, Ahangar N, Mohammadi E, Talebpour Amiri F, Shaki F. Effects of tramadol administration on male reproductive toxicity in Wistar rats The role of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis-related gene expression, and nuclear factor kappa B signalling. Bratisl Lek Listy. 2020;121(6):400-410.

146. Ebokaiwe AP, Mathur PP, Farombi EO. Quercetin and vitamin E attenuate Bonny Light crude oil-induced alterations in testicular apoptosis, stress proteins and steroidogenic acute regulatory protein in Wistar rats. Drug Chem Toxicol. 2016;39(4):424-31.

147. Abarikwu SO, Pant AB, Farombi EO. Quercetin decreases steroidogenic enzyme activity, NF-κB expression, and oxidative stress in cultured Leydig cells exposed to atrazine. Mol Cell Biochem. 2013;373(1-2):19-28.

148. Li S, Song Z, Liu T, Liang J, Yuan J, Xu Z et al. Polysaccharide from Ostrea rivularis attenuates reproductive oxidative stress damage via activating Keap1-Nrf2/ARE pathway. Carbohydr Polym. 2018;186:321-331.

149. Le X, Luo P, Gu Y, Tao Y, Liu H. Squid ink polysaccharide reduces cyclophosphamide-induced testicular damage via Nrf2/ARE activation pathway in mice. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(8):827-31.

150. Türk G, Ceribaşi AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. Reprod Fertil Dev. 2010;22(4):587-96.

151. Gu YP, Yang XM, Duan ZH, Luo P, Shang JH, Xiao W et al. Inhibition of chemotherapy-induced apoptosis of testicular cells by squid ink polysaccharide. Exp Ther Med. 2017;14(6):5889-5895.

152. Cengiz M, Sahinturk V, Yildiz SC, Şahin İK, Bilici N, Yaman SO et al. Cyclophosphamide induced oxidative stress, lipid per oxidation, apoptosis and

histopathological changes in rats: Protective role of boron. J Trace Elem Med Biol. 2020;62:126574. 1-6.

153. Yamamoto CM, Sinha Hikim AP, Huynh PN, Shapiro B, Lue Y, Salameh WA et al. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. Biol Reprod. 2000;63(6):1683-90.

154. Wang Q, Zhao XF, Ji YL, Wang H, Liu P, Zhang C et al. Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. Toxicol Lett. 2010;199(2):129-35.

155. Uygur R, Yagmurca M, Alkoc OA, Genc A, Songur A, Ucok K et al. Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. Andrologia. 2014;46(4):356-69.

156. Khodabandeh Z, Dolati P, Zamiri MJ, Mehrabani D, Bordbar H, Alaee S et al. Protective Effect of Quercetin on Testis Structure and Apoptosis Against Lead Acetate Toxicity: an Stereological Study. Biol Trace Elem Res. 2021;199(9):3371-3381.

157. Habas K, Brinkworth MH, Anderson D. Diethylstilbestrol induces oxidative DNA damage, resulting in apoptosis of spermatogonial stem cells in vitro. Toxicology. 2017;382:117-121.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER **SAYFA NO**

Şekil 1. Primordiyal germ hücrelerinin göçü ve gonadal kabartılara yerleşimi 6
Şekil 2. Testis organogenezisi ve fetal testis organizasyonu 8
Şekil 3. Testisin anatomik yapısı 10
Şekil 4. Seminifer epitelin şematik diyagramı 13
Şekil 5. Spermatogenik seri hücrelerinin şematik gösterimi 15
Şekil 6. Spermiyogenezin şematik diyagramı 17
Şekil 7. Siklofosfamidin kimyasal yapısı 20
Şekil 8. Quercetinin kimyasal yapısı 26
Şekil 9. NFkB ilişkili sinyal yolakları 29
Şekil 10. Nrf2'nin moleküler yapısı 30
Şekil 11. Nrf2/Keap1/ARE sinyal yolu 32
Şekil 12. Bax /Bcl-2 sinyal yolu 34
Şekil 13. Kontrol grubu, H&E, x100 50
Şekil 14. Kontrol grubu, H&E, x200 50
Şekil 15. Kontrol grubu, H&E, x400 51
Şekil 16. Kontrol grubu, H&E, x400 51
Şekil 17. Quercetin grubu, H&E, x100 52
Şekil 18. Quercetin grubu, H&E, x200 52
Şekil 19. Quercetin grubu, H&E, x400 53
Şekil 20. Siklofosfamid grubu, H&E, x100 53
Şekil 21. Siklofosfamid grubu, H&E, x100 54

Şekil 22. Siklofosfamid grubu, H&E, x200 54
Şekil 23. Siklofosfamid grubu, H&E, x200 55
Şekil 24. Siklofosfamid grubu, H&E, x400 55
Şekil 25. Siklofosfamid grubu, H&E, x400 56
Şekil 26. Siklofosfamid grubu, H&E, x400 56
Şekil 27. Siklofosfamid+Quercetin grubu, H&E, x100 57
Şekil 28. Siklofosfamid+Quercetin grubu, H&E, x100 57
Şekil 29. Siklofosfamid+Quercetin grubu, H&E, x200 58
Şekil 30. Siklofosfamid+Quercetin grubu, H&E, x200 58
Şekil 31. Siklofosfamid+Quercetin grubu, H&E, x400 59
Şekil 32. Siklofosfamid+Quercetin grubu, H&E, x400 59
Şekil 33. Kontrol grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200 64
Şekil 34. Kontrol grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400 64
Şekil 35. Quercetin grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200 65
Şekil 36. Quercetin grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400 65
Şekil 37. Siklofosfamid grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200 66
Şekil 38. Siklofosfamid grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200 66
Şekil 39. Siklofosfamid grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400 67
Şekil 40. Siklofosfamid grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400 67
Şekil 41. Siklofosfamid+Quercetin grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x200 68
Şekil 42. Siklofosfamid+Quercetin grubu, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400 68
Şekil 43. Negatif, NFkB, hematoksilen zıt boyaması, x400 69
Şekil 44. Kontrol grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200..... 69
Şekil 45. Kontrol grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400..... 70
Şekil 46. Quercetin grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200 70
Şekil 47. Quercetin grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400 71
Şekil 48. Siklofosfamid grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200..... 71
Şekil 49. Siklofosfamid grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400..... 72
Şekil 50. Siklofosfamid grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400..... 72
Şekil 51. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x200..... 73
Şekil 52. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400..... 73
Şekil 53. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400..... 74
Şekil 54. Negatif, Nrf2, hematoksilen zıt boyaması, x400 74

Şekil 55. Kontrol grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200 75
Şekil 56. Kontrol grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 75
Şekil 57. Quercetin grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200 76
Şekil 58. Quercetin grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 76
Şekil 59. Siklofosfamid grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200 77
Şekil 60. Siklofosfamid grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 77
Şekil 61. Siklofosfamid grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 78
Şekil 62. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x200 78
Şekil 63. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 79
Şekil 64. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 79
Şekil 65. Negatif, Bax, hematoksilen zıt boyaması, x400 80
Şekil 66. Kontrol grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200 80
Şekil 67. Kontrol grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 81
Şekil 68. Quercetin grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200 81
Şekil 69. Quercetin grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 82
Şekil 70. Siklofosfamid grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200 82
Şekil 71. Siklofosfamid grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 83
Şekil 72. Siklofosfamid grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 83
Şekil 73. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x200 84
Şekil 74. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 84
Şekil 75. Siklofosfamid+Quercetin grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 85
Şekil 76. Negatif, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, x400 85
Şekil 77. Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200 87
Şekil 78. Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400 87
Şekil 79. Quercetin grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200 88
Şekil 80. Quercetin grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400 88
Şekil 81. Siklofosfamid grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200 89
Şekil 82. Siklofosfamid grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400 89
Şekil 83. Siklofosfamid+Quercetin grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x200 90
Şekil 84. Siklofosfamid+Quercetin grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, x400 90

Tablolar

Tablo 1. Deney planı 37

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlıkları (VA) değişimi, testis ağırlıkları (sağ-sol), testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarının (TAİ=TA/VAx100) karşılaştırılması 44

Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarının serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması 45

Tablo 4. Kontrol ve deney gruplarının seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve interstisyel aralıklarının karşılaştırılması 46

Tablo 5. Kontrol ve deney gruplarındaki seminifer tübüllerin histolojik yapı değişikliklerinin karşılaştırılması 49

Tablo 6. Kontrol ve deney gruplarındaki NFkB, Nrf2, Bax ve Bcl-2 immünoreaktivitelerinin karşılaştırılması 63

Tablo 7. Kontrol ve deney gruplarına ait apoptotik hücre ve apoptotik tübül indeksi 86

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul'da doğdum. Orta öğrenimimi Çemberlitaş Kız Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 2003 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2007 yılında biyolog ünvanı alarak mezun oldum. 2008-2011 yılları arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi tamamlayıp, 2014 yılında Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na araştırma görevlisi olarak atandım. Aynı yıl doktora öğrenimim için Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görevlendirildim ve halen doktora öğrencisi olarak öğrenimime, araştırma görevlisi olarak görevime devam etmekteyim.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2017/02 **Karar Tarihi: 01.03.2017**

KARAR NO: 2017.02.06

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'un yaptığı, Arş. Gör. Duygu UZUN GÖREN'in doktora tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2017/07 protokol nolu **"Siklofosfamidin Neden Olduğu Testis Hasarına Karşı Quercetinin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi"** başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

-KATILMADI-
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-MAZERETLİ-
Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-MAZERETLİ-
Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

Sayı : 59803669-604.99 -E.62877 28/04/2017
Konu : Sözleşme

Sayın Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve Arş. Gör. Duygu Uzun GÖREN'in "Siklofosfamidin Neden Olduğu Testis Hasarına Karşı Quercetinin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi " başlıklı doktora projesinin 24 (yirmi dört) ay süre ve 29.945,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 25.04.2017 tarih ve 2017/05 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 7. maddesinin c bendi uyarınca düzenlenen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Mümin ŞAHİN
Rektör Yardımcısı

Ek:Protokol sözleşmesi (2 sayfa)

28/04/2017 Bilgisayar İşletmeni Sevgi BAYAR
28/04/2017 Şef Remziye KILIÇ
28/04/2017 Daire Başkanı Ayşegül KUŞLAR

Evrakı Doğrulamak İçin : https://ebys.trakya.edu.tr/enVision/Validate_Doc.aspx?V=BEBE38BAA

Adres:Trakya Üniversitesi Rektörlüğü İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı Balkan Yerleşkesi Edirne 22030
Telefon:2842234210 Faks2842235507
E-Posta:idamali@trakya.edu.tr Elektronik Ağ:http://imdb.trakya.edu.tr/
Bilgi için: Sevgi BAYAR
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.