T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVŞANLARDA PAKLİTAKSEL'İN SPERMATOLOJİK PARAMETRELER, TESTİS HİSTOLOJİSİ İLE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ VE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Caner ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVŞANLARDA PAKLİTAKSEL'İN SPERMATOLOJİK PARAMETRELER, TESTİS HİSTOLOJİSİ İLE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİLERİ VE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Caner ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **12102013** proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Caner ÖZTÜRK tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: (Danışman)	Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN Selçuk Üniversitesi
Üye:	Prof. Dr. Ayhan ATA Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Üye:	Prof. Dr. Gaffari TÜRK Fırat Üniversitesi
Üye:	Doç. Dr. Mustafa Numan BUCAK Selçuk Üniversitesi
Üye:	Doç. Dr. İbrahim AYDIN Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Antikanser bir ajan olan paklitaksel güçlü antitümoral etkiye sahip olup günümüzde birçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır. Taksel grubu ilaçlar hücre bölünmesi ve mitozun dinamik dengesini bozduğu için apoptoza yol açabilir. Bu tür antitümoral ilaçların başta üreme organları olmak üzere böbrek, karaciğer, kalp ve kulak gibi birçok organda istenmeyen yan etkileri mevcuttur. Hem kanserli hem de sağlıklı deney hayvanlarında üreme organlarında bildirilen kemoterapi kaynaklı yan etkiler oligospermi, azoospermi, oligozoospermi, astenozoospermi, teratozoospermi, testiküler yapılarda ve spermatogenesiste oluşan bozukluklardır.

Kemoterapötiklerin erkeklerdeki gonadotoksik etkilerinin önlenmesi amacıyla antioksidan madde uygulamaları denenmektedir. Antioksidan maddelerin antikanser ilaçların yan etkilerini baskıladığı, tamamen veya kısmen koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) birçok bitki tarafından doğal olarak üretilen ve kırmızı üzümlerin kabuğunda bulunan antioksidan bir maddedir ve geniş spektrumlu etkiye sahip olması nedeniyle birçok patolojik olguya karşı koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında, paklitaksel'in erkek tavşanlarda üreme organları üzerine oluşturabileceği hasarlar, eğer hasar oluşuyor ise bunun fertilite üzerine etkileri ve resveratrol'ün bu hasarlara karşı koruyucu özelliği araştırılmıştır.

Yaptığım tez çalışmasının her aşamasında yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN başta olmak üzere, araştırma süresince sürekli desteklerini aldığım Doç.Dr. Mustafa Numan BUCAK, Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR, Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ, Prof. Dr. Enver YAZAR, Arş. Gör. Şükrü GÜNGÖR'e hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana destek olan aileme ve eşim Hande Gül ÖZTÜRK'e şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR..... vi

ÇİZELGELER ve ŞEKİLLER..... vii

1. GİRİŞ 1

1.1. Tavşanlarda Üreme 3

1.1.1. Tavşanlarda Pubertas 3

1.1.2. Erkek Tavşanlarda Üreme ve Spermatolojik Özellikler 3

1.1.3. Dişi Tavşanlarda Üreme Fizyolojisi 4

1.1.4. Tavşanlarda Östrus Belirtileri 5

1.1.5. Tavşanlarda Çiftleşme 6

1.2. Serbest Radikal Nedir? 6

1.2.1. Serbest Radikal Türleri 6

1.2.2. Spermada Serbest Radikallerin Oluşumu 7

1.2.3. Serbest Radikaller ve Hücreye Zarar Verme Mekanizmaları 7

1.3. Spermada Serbest Radikallerin Kaynağı 8

1.3.1. Lökositler 8

1.3.2. Spermaya Bulaşan Bakteriler 8

1.4. Oksidatif Stres Nedir? 9

1.4.1. Oksidatif Stresin Sperm Parametreleri Üzerine Etkileri 10

1.5. Oksidatif Stres Parametreleri 10

1.5.1. Lipit Peroksitleri ve Malondialdehit 10

1.5.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) 11

1.6. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi 11

1.7. Mikrotubül İnhibitörlerinin Sağlıklı Erkek Deney Hayvanları Üzerine Etkileri 13

1.8. Antioksidan Savunma Mekanizması 13

1.8.1. Antioksidan Maddelerin Koruyucu Özellikleri 14

1.9. Kematerapötik İlaçların Erkek Deney Hayvanlarında Testis Dokusu Üzerine Etkileri 16
1.10. Kemoterapinin Gonodotoksik Etkileri....17
1.10.1. Spermatogenetik Aşama 17
1.10.2. Spermatogenetik Aşamada Antikanser Ajanların Sitotoksik Etkileri 17
1.11. Kemoterapötikler ve Paklitaksel'in Etki Mekanizması 18
1.11.1. Paklitaksel 19
1.12. Resveratrol'ün Biyolojik Etkisi ve Muhtemel Faydaları....20
1.12.1. Resveratrol 20
1.12.2. Biyolojik Etkisi 21
1.12.3. Muhtemel Faydaları....22
2. GEREÇ VE YÖNTEM 23
2.1. Tavşanların Bakım ve Beslenmesi 23
2.2. Tavşanların Sperma Eldesine Alıştırılması....23
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 24
2.4. Tavşanlarda İntravenöz Enjeksiyon....24
2.5. Antikanser İlaç Uygulaması....25
2.6. Antioksidan Madde Uygulanması 25
2.7. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması 25
2.8. Suni Vajenin Hazırlanması 26
2.9. Sperma Eldesi ve Sulandırılması....26
2.10. Motilitenin Belirlenmesi 26
2.11.Yoğunluğun Belirlenmesi 27
2.12. Floresan Mikroskop ile Canlılık (SYBR-PI), Mitokondriyel Aktivite (JC-1) ve Akrozom Bütünlüğünün (FITCH) Belirlenmesi 27
2.12.1. Spermatozoa Canlılığının Belirlenmesi....27
2.12.2. Akrozom Bütünlüğünün Belirlenmesi....28
2.12.3. Mitokondriyel Aktivitenin Belirlenmesi....29

2.13. Biyokimyasal Ölçümler 31
2.13.1. Sperma Numunelerinin Hazırlanması 31
2.13.2. Lipit Peroksidasyonu (LPO) 32
2.13.3. Total Glutasyon (tGSH) Düzeyinin Analizi 32
2.13.4. Total Antioksidan Kapasite Analizi 32
2.14. Testis Dokusunun Biyokimyasal Ölçümler İçin Hazırlanması 33
2.15. Tavşanların Çiftleştirilmesi 34
2.16. Histolojik Yöntemler 34
2.17. İstatistiksel Analiz 35
3. BULGULAR 36
3.1. Motilite ve Yoğunluk Değerleri 36
3.2. Spermatozoa Canlılığı (SYBR-PI), Akrozom Bütünlüğü (FITCH) ve Mitokondriyel Aktivite (JC-1) Değerleri 37
3.3.Spermatozoa Hücrelerinde Lipit Peroksidasyon(LPO), Total Glutasyon(tGSH) ve Total Antioksidan Kapasite Değerleri 39
3.4. Testis Dokusunda Lipit Peroksidasyon(LPO), Total Glutasyon (tGSH) ve Total Antioksidan Kapasite Değerleri 41
3.5. Seminifer Tubul Çapı Değerleri 43
3.6. Gebelik ve Doğan Yavru Sayılarının Karşılaştırılması 44
4. TARTIŞMA 46
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 53
6. KAYNAKLAR 54
7. EKLER 60
EK. A: Etik Kurul Kararı 60
8. ÖZGEÇMİŞ 61

SİMGELER ve KISALTMALAR

CAT: Katalaz

GPx: Glutasyonperoksidaz

H_2O_2: Hidrojen peroksit

LPO: Lipit peroksidasyon

NO•: Nitrik oksit

NO_2•: Nitrik dioksit

$O_2^{\bullet -}$: Süperoksit anyon

OH•: Hidroksit radikal

ONOO-: Peroksinitrit

ROS: Reaktif oksijen türlerinin

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

tGSH: Total glutasyon

ÇİZELGELER ve ŞEKİLLER

Çizelge 1.1. Mikrotubül inhibitorleri, alkilize edici ajanlar, platin analogları.....20

Çizelge 2.1. Hayvanların 0. Hafta Canlı Ağırlıkları ve Gruplara Göre Dağılımı 24

Çizelge 2.2. Hayvanların 0. Hafta Subjektif Motilite Değerleri ve Gruplara Göre Dağılımı.....24

Şekil 1.1. Tavşanlarda Kullanılan Suni Vajen 4

Şekil 1.2. Antikanser ilaçların spermatozoa üzerindeki etkilerinin şematik sunumu.....17

Şekil 1.3. Resveratrol'ün Kimyasal Yapısı 21

Şekil 2.1. Tavşanların bakıldığı kafesler.....23

Şekil 2.2. Kullanılan antikanser ilacın kutuları 25

Şekil 2.3. Tavşanlardan sperma eldesi için kullanılan suni vajen 26

Şekil 2.4. SYBR/PI boyama tekniği ile sperma hücrelerinde ölü-canlı spermatozoa oranının belirlenmesi. 28

Şekil 2.5. Spermatozoonlarda FITCH-PNA/PI boyama tekniği ile akrozom bütünlüğünün belirlenmesi.....29

Şekil 2.6. Spermatozoonlarda JC-1/PI boyama tekniği ile mitokondriyel aktivitenin belirlenmesi 31

Şekil 2.7. Spermatozoonların parçalanmasında kullanılan sonikasyon cihazı.....33

Şekil 2.8. Erkek ve dişi tavşanların kafeslerde çiftleştirilmesi.....34

Şekil 2.9. Testis kesitleri. Üçlü boyama. Kontrol (A), resveratrol (B), paklitaksel (C), paklitaksel+resveratrol (D).....35

Şekil 3.1. Motilite (%) değerlerine ait bulgular.....36

Şekil 3.2. Sperma yoğunluklarının karşılaştırılması(x10^6) 37

Şekil 3.3. Spermatozoa canlılığının karşılaştırılması(%).....38

Şekil 3.4. Akrozom bütünlüğü oranlarının karşılaştırılması (%) 38

Şekil 3.5. Mitokondriyel aktivite oranlarının karşılaştırılması (%).....39

Şekil 3.6. Lipit peroksidasyon değerleri (10^9spz).....40

Şekil 3.7. Total glutasyon seviyeleri (10^9spz).....40

Şekil 3.8. Total antioksidan kapasite değerleri (10^9spz) 41

Şekil 3.9. Lipit peroksidasyon değerleri (mikromol/g doku). 42

Şekil 3.10. Total glutasyon (tGSH) değerleri (mikromol/g doku). 42

Şekil 3.11. Total antioksidan kapasite değerleri (milimol/g doku). 43

Şekil 3.12. Seminifer tubul çapı ölçümleri (μm) 44

Şekil 3.13. Doğan yavru sayılarının karşılaştırılması 44

Şekil 3.14. Çalışma sonunda doğan yavrular 45

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tavşanlarda Paklitaksel'in Spermatolojik Parametreler, Testis Histolojisi ile Fertilite Üzerine Etkileri ve Resveratrol'ün Koruyucu Özelliğinin Belirlenmesi

Caner ÖZTÜRK

Dölerme ve Suni Tohumlama (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2015

Kemoterapötiklerin fertilite üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Bu çalışmada antikanser ilaçların infertilite üzerine oluşturduğu olumsuz etki ve bunun üzerine antioksidan maddenin koruyucu etkinliği olup olmadığı spermatolojik parametreler, oksidatif stres değerleri ve histopatolojik yöntemler ile değerlendirildi.

Sunulan çalışmada antikanser bir ajan olan paklitaksel ve antioksidan resveratrol'ün Yeni Zelanda ırkı tavşan sperması üzerine etkileri araştırıldı. Deney, her grubu 8 Yeni Zelanda tavşanından oluşan 4 grup olacak biçimde dizayn edildi. Kontrol grubuna 40 ml serum fizyolojik uygulaması yapıldı. Paklitaksel grubuna 40 ml serum fizyolojik içerisinde 5mg/kg dozunda paklitaksel, resveratrol grubuna 40 ml serum fizyolojik içerisinde 4 mg/kg dozunda resveratrol, paklitaksel+resveratrol grubunda ise 40ml lik serum fizyolojik içerisinde 5 mg/kg paklitaksel + 4 mg/kg resveratrol uygulaması yapıldı. Tüm uygulamalar 8 hafta boyunca haftada bir defa İ.V. yolla yapıldı. Ejakülatlar 11 hafta boyunca alındı. Sperma motilitesi faz-kontrast mikroskop ile değerlendirildi. Sperma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve mitokondriyel aktivite oranları sırasıyla SYBR 14/PI, FITC-PNA ve JC-1/PI boyama ile değerlendirildi. Sperma ve testis dokusunda LPO, tGSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri sperktrofotometre ile belirlendi. Onbirinci haftada 32 dişi tavşan kullanılarak fertilite denemesi yapıldı. Fertilite denemesi sonrasında erkek tavşanlara ötenazi uygulandı ve tüm tavşanların testisleri alınıp tubul çapları ölçüldü.

Spermatolojik analizler sonucunda paklitaksel'in sperma üzerine olan hasarlarını resveratrol'ün önlediği görülmüştür. Paklitaksel sperm motilitesini, yoğunluğunu, canlılığını, akrozom bütünlüğünü ve mitokondriyel aktivitesini azaltmış ($P<0.05$), resveratrol ise bu hasarları engellemiştir. Biyokimyasal olarak sperm ve testis dokusu LPO, tGSH ve AOP değerlerinin paklitaksel tarafından olumsuz etkilendiği, resveratrol uygulamasının koruyucu özellik gösterdiği görülmüştür ($P>0.05$). Histopatolojik değerlendirme sonucunda paklitaksel uygulamasının seminifer tubul çapı ölçülerini daralttığı ($P<0.05$) ve resveratrol uygulamasının paklitaksel'in negatif etkilerine karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Fertilite denemesi sonucunda gruplar arasında istatistiksel farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$).

Sonuç olarak paklitaksel'in bazı spermatolojik parametreler, biyokimyasal analizler ve seminifer tubul çapı ölçümü üzerine olumsuz etkisi olduğu belirlendi. Ayrıca resveratrol'ün paklitaksel'in negatif etkisine karşı koruyucu etkinliği olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Paklitaksel; resveratrol; spermatolojik parametreler; tavşan; testis; oksidatif stres parametreleri

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Effects of Paclitaxel on Sperm Parameters, Testes Histology, Fertilility and Protective Impact of Resveratrol in Rabbits

Caner ÖZTÜRK

Department of Reproduction and Artificial Insemination (Vet)

PhD THESIS/KONYA-2015

It is known that chemotherapeutics have adverse effects on the fertility. In this study, the negative effects of the anticancer drugs on infertility and whether antioxidant substances have protective efficacy on this matter were evaluated by sperm parameters, oxidative stress levels and histological methods.

In this study, the effects of anticancer drug paclitaxel and an antioxidant resveratrol on New Zeland Rabbit semen were evaluated. The experimental design consisted of four treatment groups. Each treatment group consisted of 8 New Zeland Rabbits. The control group was administered 40 ml saline, the paclitaxel group was administered 5mg/kg paclitaxel in 40ml saline, the resveratrol group was administered 4mg/kg resveratrol within 40ml saline and the paclitaxel+resveratrol group was administered 5mg/kg paclitaxel+4mg/kg resveratrol within 40 ml saline. All administrations were i.v. and continued once a week for 8 weeks. Ejaculates were collected for 11 weeks. Sperm motility was estimated using phase-contrast microscopy. Sperm viability, sperm acrosome integrity, and sperm mitochondrial activity were performed by staining with SYBR 14/PI, FITC-PNA, and JC-1/PI respectively. LPO, tGSH and antioxidant capasity levels were determined by spectrophotometry in semen and testes tissues. At the 11 th week, fertility trial was made by using 32 female rabbits. After fertility trial, male rabbits were euthanasiad. Additionally, at the end of 11 weeks, all rabbit's testes were removed and diameters of seminiferous tubules were measured.

At the result of spermatological analyses, it was observed that the damages on sperm parameters induced by paclitaxel were normalised by resveratrol. While paclitaxel decreased sperm motility, concentration, viability, acrosome integrity, and mitochondrial activity ($P<0.05$) treatment with resverarol was removed these damages. As biochemically, although sperm and testis tissue LPO, tGSH, and total antioxidant capasity levels increased by paclitaxel, resveratrol treatment showed protective effect ($P>0.05$). Histopathologically it was observed that treatment of paclitaxel decreased diameters of seminiferous tubules ($P<0.05$) and treatment of resveratrol prevented negative effects of paclitaxel. In terms of fertility results, no significant difference was observed among the four groups ($P>0.05$).

As a conclusion, the negative effects of paclitaxel was determined on some spermatological parameters, biochemical assays and diameters of seminiferous tubules. It was also determined that resveratrol prevented these negative effects of pacliaxel.

Key Words: Paclitaxel; rabbits; resveratrol; spermatological parameters; testes; oxidative stress parameters

1. GİRİŞ

Tavşan et ve kürkünden faydalanılıp pet ve deney hayvanı olarak kullanılmak üzere yetiştirilmektedir. Tüm hayvan türlerinde olduğu gibi tavşan yetiştiriciliğinde de hedef, infertilite sorununun ortadan kaldırılmasıdır. Bu problemi çözebilmek için erkek tavşanlarda spermatolojik özelliklerin iyi bilinmesi gereklidir. Birçok farklı tavşan ırkı olmasına karşın günümüzde en çok bilinen ve kullanılan tavşan ırkı Yeni Zelanda tavşanıdır (Öztemel 2003).

Hücreler proliferatif döneminde iken antikanser ilaçlar daha fazla etkinlik göstermektedir. Kanserli (neoplastik) hücrelerin normal hücrelere göre hızlı bölünmesi ve çoğalması sebebiyle çoğu antikanser ilaç bu tür özellik taşıyan hücrelerin tahrip edilmesi için üretilmiştir. Ancak bazı normal hücrelerde de benzer özellikler bulunmakta ve bu hücreler de antikanser ilaçlardan doğrudan etkilenmektedir. Bu etkilenmeler sonucunda bazı yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkiler daha çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl follikülleri ve sperma hücreleri gibi hızlı bölünebilen hücreler üzerinde gözlenmektedir (Türk 2013).

Spermatogenezis, saniyede yaklaşık 1000 sperm oluşumu ile sonuçlanan bir olaydır (Aitken ve Roman 2007). Testis germinal epitel hücreleri yüksek mitotik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle kemoterapi ilaçları üreme organlarının işlevlerini etkileyip sperm sayısını azaltarak geçici veya kalıcı kısırlığa neden olabilmektedir (Dilek 2010, TTOD 2014). Kemoterapötikler lipit, kolesterol ve protein peroksidasyonu ile oksidatif strese yol açarak özellikle spermatogenik hücrelerde DNA hasarı, apoptosis, sperm kalitesinin azalması, infertilite ve sterilite gibi yan etkilerin erkek genital sisteminde meydana gelmesine sebep oluşturmaktadır (Türk 2013). Bu etkiye daha çok sitotoksik kemoterapötikler neden olmaktadır. Sitotoksik ilaçlar genel olarak, alkilleyici ajanlar (siklofosfamit, ifosfamit, sisplatin), antimetabolitler (5-florourosil, metotreksat), tubulin aktif ajanlar (vinkristin, paklitaksel) ve antibiyotikler (doksorubisin, bleomisin) şeklinde gruplandırılmaktadır (Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011).

Germinal epitel hücreleri hızlı bölünebilme yeteneğine sahip olduğu için fazla miktarda oksijen tüketimine ihtiyaç duymaktadırlar. Ancak, testislerin damar yapısınca fakir olması sonucu bu dokuda oksijen döngüsü azdır ve testislerde oksijen için hücreler arasında rekabet olduğu kesindir. Spermatogenezis ile Leydig hücre steroidogenezi oksidatif stresin ve düşük oksijen geriliminin hedefi durumundadır (Aitken ve Roman 2007). Çeşitli kategorideki antikanser (sitostatik) ajanların in vivo ve in vitro olarak serbest radikal üretimine neden oldukları belirtilmiştir. Kanser hastalarında kemoterapiye bağlı olarak lipit peroksidasyon (LPO) ürünlerinin miktarının arttığı, tedavi sonrasında ise plazma E vitamini düzeyinin azaldığı belirtilmiştir. Kemoterapi alan hastalarda, plazma lipit hidroperoksitleri ve tiyobarbitürik asit (TBA)-reaktif bileşiklerin artması, kemoterapinin oksidatif strese yol açtığını göstermektedir. Kemoterapi aracılıklı oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS); DNA, RNA, protein ve lipit gibi makromoleküllerde hücre ölümüne kadar giden hasara sebep olabileceği belirtilmektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011). Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünüdür, reaktif maddelerdir ve zarar verme potansiyelleri yüksektir. Serbest radikaller hücrelerde DNA, protein ve lipitler üzerine etki göstererek zarar vermektedir (Dursun 2010). Biyomembranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı sebebiyle oksidanların saldırılarına karşı hassastırlar. Lipit peroksidasyonun önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara sebep olmaktadır (Eken 2012).

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar meydana getirmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge olması gereklidir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmaktadır. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, üretimden daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikallerin miktarı yükselir. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etki (oksidatif hasar) 'oksidatif stres' olarak adlandırılır (Tekcan 2009). Oksidatif stres, sperm hücrelerine zarar verir ve infertiliteye sebep olabilir. Serbest radikal oluşumunun artması, çekirdek ve mitokondri seviyesindeki peroksizomların DNA

parçalarına ve hücre zarına hasar vermesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres, spermatozoonlarda DNA hasarına yol açan asıl etiyolojik faktör olarak değerlendirilmektedir (Demirtaş ve Üntan 2011). Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına giderebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini kullanırlar. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi hücresel makromoleküller hasar görmektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011).

Antioksidan maddelerin kemoterapi ve radyoterapinin etkilerini oksidatif hasarı azaltarak düşürdüğü kabul edilmiştir (Drisko ve ark 2003). Demirtaş ve Üntan (2011) antioksidanların spermatozoayı SOR (serbest oksijen radikalleri) üreten anormal spermatozoalardan koruduğunu, lökositlerin oluşturduğu SOR'u temizlediğini, DNA kırılmalarını ve erken sperm olgunlaşmasını engellediğini, soğuğun spermatozoaya olan etkisini azalttığını ve spermatozoayı destekleyerek üreme tekniklerinin başarısını yükselttiğini belirtmişlerdir.

1.1. Tavşanlarda Üreme

1.1.1. Tavşanlarda Pubertas

Yeni Zelanda ırkı erkek tavşanlar pubertasa (seksüel olgunluğa) 20 haftada ulaşmaktadır (Foote ve Carney 2000, Boiti ve ark 2005). Yeni Zelanda gibi orta büyüklükteki ırklarda vücut ağırlıkları 1,8–7,3 kg arasında değişmektedir (Sarıözkan 2005). Pubertasa ulaştıkları 20. haftada ise (4-5 aylık) ortalama ağırlıkları 2-2,5 kg arasında değişmektedir (Tao ve ark 2013).

1.1.2. Erkek Tavşanlarda Üreme ve Spermatolojik Özellikler

Erkek tavşanlarda üreme organları testis, testisleri saran tunica testis, epididimis, ductus deferens, funiculus spermaticus, eklenti bezleri ve penisten oluşmaktadır. Tavşanlarda testisler diğer memelilerden farklı olarak iki ayrı skrotum içerisinde bulunur (Aydın 1998). Testislerin doğumdan sonra scrotuma inişi (descensus testis), 6. haftada tamamlanmaktadır (Tsunenari ve ark 1992).

Tavşanlarda sperma üretimi üzerine tavşanın genetiği, yaşı, beslenmesi, mevsim şartları, çevre şartları ve tavşandan sperma alma sıklığı etkilidir (Castellini 2008). Tavşanlarda haftada iki kere ejekülat toplanması spermatolojik muayene

sonuçlarının daha sağlıklı olarak yapılabilmesine olanak sağlar. Işığa maruz kalma süresi hormon salınımını ve spermatozoa üretimini etkiler. Günlük 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ortam sperma kalitesini artırmaktadır. Tavşanların beslenmesinde kullanılan diyetlerin %15'ten fazla protein içermesi ve antioksidan madde alımının, sperma üretimini yeterli seviyede sağladığı ayrıca lipit peroksidasyonu önlediği belirtilmektedir (Boiti ve ark 2005). Tavşanlarda bir ejekülasyondaki sperma miktarı 0,4 – 0,5 ml, yoğunluk ise ml'de 150 ile 500 milyon arasında değişmektedir (Moce ve Vicente 2009). Sarıözkan (2005)'a göre ise tavşanlarda sperma miktarı 0,5-1 ml, jel miktarı 1,7 g/ejekulat, yoğunluğu ortalama 700 x 10^6 spz/ml, viabilite süresi 24-36 saat arasında değişmektedir. Spermatogenetik siklusun 7-8 hafta sürdüğü tavşanlarda, eksojen faktörlerin spermatogenezis üzerine olan etkileri 10 haftada gözlemlenebilmektedir (Boiti ve ark 2005).

Tavşanlarda sperma 45°C'deki suni vajen yardımı ile toplanabilir. Sperma toplanmasından önce erkek tavşanların bir dişi vasıtası ile uyarılması sperma yoğunluğunu artırmaktadır. Sperma 5 dakika içerisinde 1/2 veya 1/5 oranında aynı sıcaklıktaki sulandırıcı ile sulandırılmalıdır. Sperma sulandırıldıktan sonra 15-18°C aralığında 48 saate kadar saklanabilmektedir (Boiti ve ark 2005).



Şekil 1.1. Tavşanlarda kullanılan suni vajen.

1.1.3. Dişi Tavşanlarda Üreme Fizyolojisi

Diğer kemiricilerin aksine tavşanlarda düzenli bir östrus siklusu gözlenmez (Sarıözkan 2005). Tavşanlar için ilkbahar ve yaz mevsiminin ilk dönemleri üreme mevsimidir. Özellikle ilkbahar döneminde seksüel aktivite belirgin ve yoğundur (Akar 2005). Tavşanlarda atreziye uğramış foliküllerin yerini alan yeni bir foliküller gelişim dalgası esnasında, kısa bir inaktif periyodu (1-2 günlük) takip eden 11-12 gün erkeği kabul dönemi bulunmaktadır (Sarıözkan 2005).

Dişi tavşanlarda fertilizasyon oviduktun ampulla bölgesinde şekillenir ve gebelik süresi ortalama 31 gündür (Foote ve Carney 2000). Yavru sayısı 1-22 (ortalama 8) arasında değişiklik gösterir. Bazı dişiler yavru yeme (kanibalistik infantisit) eğilimine sahiptir. Bu durum kalıtsal faktörlere, aşırı heyecan, plasentofaji, uygun olmayan çevre koşulları, düşük enerjili diyet, ilk kez doğurma veya dişinin rahatsız edilmesine bağlı olarak meydana gelmektedir (Sarıözkan 2005).

Dişi tavşanlar provake ovulasyon gösterir (Foote ve Carney 2000). Uterus tamamen duplikedir, iki adet uzun kornu uteri ve tamamen ayrı iki servikal kanalı olup, her birinin bir eksternal ve bir de internal ağzı bulunmaktadır (Sarıözkan 2005). Ovulasyon çiftleşmeden 9-12 saat sonra gerçekleşir. LH hormonu çiftleşme sonrasında yaklaşık 90-120 dakika içerisinde pik seviyesine ulaşır ve pike ulaşmasından sonraki 6 saat içerisinde de normal seviyesine döner (Easson 2001).

1.1.4. Tavşanlarda Östrus Belirtileri

Dişi tavşanda çiftleştirmenin yapılabilmesi için östrusun tam olarak tespit edilmesi gerekir. Fakat yapılan testler ve muayenelerden kesin ve güvenilir bir sonuç alınamamaktadır. Vaginal smear tavşanlarda östrusun belirlenmesinde etkili bir yöntem olarak kullanılamamaktadır. Östrusun belirlenmesinde vulvanın inspeksiyonu en çok kullanılan yöntemdir. Vulvada morluk ve hafif şişme belirtileri hayvanın % 80-90 östrusta olduğunu göstermektedir (Akar 2005). Vulvanın rengi östrojen varlığının dış belirtisi olması ve suni tohumlama zamanının tahmininde önemlidir (Tsiligiannia ve ark 2004).

Diğer östrus belirtileri; dişi kafesinde arka ayaklarını uzatarak yatar, iştahı azalmıştır, huzursuz, saldırgan ve çok hareketlidir. Verilen otu dudaklarıyla dağıtır, dişleriyle tahtaları kemirir. Dişi tavşan erkeğin bulunduğu ortamda, sırtını aşağıda tutup, arka tarafını kaldırarak lordosis duruşu almaktadır. Bu östrusun karakteristik duruşudur. Dişi tavşan östrusta iken çoğunlukla çiftleşmeyi kabul etse de bazen erkeği kabul etmeyebilir. Buna rağmen dişinin erkeği kabul ettiği dönem östrus, reddettigi dönem ise diöstrus olarak kabul edilmektedir (Akar 2005).

1.1.5. Tavşanlarda Çiftleşme

Dişi tavşanın kafesinde başka bir tavşan istememesi ve erkek tavşanın da yabancı bir kafeste çiftleşmemesinden dolayı için dişi tavşan erkeğin kafesine götürülmektedir. Dişi tavşan kafese konar konmaz çiftleşme gerçekleşmektedir. Birkaç dakika içerisinde çiftleşme olmuyorsa dişi alınmalıdır ve sonra tekrar denenmelidir. Çiftleşme sürecinde erkek dişinin üstüne çıkar ve 8-12 adet çiftleşme hareketi (friksiyon) yapar. Ejekülasyon anında erkek tavşan karakteristik bir ses çıkartarak yana veya geriye doğru kendini atar. Çoğunlukla erkek tarafından çıkartılan bu karakteristik ses bazen dişide de gözlenebilir (Akar 2005).

1.2. Serbest Radikal Nedir?

Elektron alıcı moleküller serbest radikaller olarak isimlendirilir ve yüksek reaktif kimyasal moleküllerdir. Her birinin bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu bulunabilmektedir. Genellikle serbest radikaller en yakın kararlı molekül ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonrasında kararlı molekül eletronunu kaybederek serbest radikal halini alır, bu reaksiyon zincirleme bir şekilde devam eder. Reaksiyon başladıktan sonra ise tüm canlı hücrelere zarar verecek şekilde devam eder. Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine de oksidanlar denir. Oksidanlar moleküllerden elektron alma yeteneklerinden dolayı hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarına sebep olduğu bilinmektedir (Agarwal ve ark 2008a, Eken 2012).

Bu oksidanlar canlı organizmada sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler biçimleri bulunan glutasyonperoksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemler ve bazı antioksidanlar tarafından yıkımlanmaktadır (Eken 2012).

1.2.1. Serbest Radikal Türleri

ROS, radikal ve radikal olmayan oksijen türlerinin oluşturduğu geniş gruplu reaktif oksijen türlerini [süperoksit anyon ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksit radikal (OH•)] kapsamaktadır (Agarwal ve ark 2008a). Elektron alıcı

moleküller olarak tanımlansalar da serbest radikallerin aktif oksijen türevleri oksidanlar olarak isimlendirilir (Eken 2012).

Radikal ve radikal olmayan oksijen türlerinin dışında ROS'a dâhil olan diğer bir sınıfta serbest nitrojenlerin oluşturduğu reaktif nitrojen türleridir. Bu reaktif türler nitrik oksit (NO•), nitrik dioksit (NO_2•), peroksinitrit (ONOO-) kolaylıkla reaktif olmayan türlere dönüşebilmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar bu yeni radikallerin oluşumuna neden olabilmektedir (Agarwal ve ark 2008a).

1.2.2. Spermada Serbest Radikallerin Oluşumu

Semen içerisinde farklı türlerde hücreler barındırır. Bunlar olgun ve olgunlaşmamış sperma hücreleri ve spermatogenetik siklusun diğer hücreleri olan lökosit ve epitelyal hücrelerdir. Lökositler (nötrofil ve makrofaj) ve olgunlaşmamış sperma hücreleri ROS'un önemli iki etkenidir. Peroksidaz pozitif lökositlerin semende bulunan ROS'un ana kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Spermatogenezis sırasında meydana gelebilecek herhangi bir olumsuz durum sonucunda sitoplazmik damlacıklar oluşmaktadır. Bu sitoplazmik damlacıkların fazla miktarda ortamda tutulması düşük sperma kalitesine ve ROS oluşumuna neden olmaktadır. Sitoplazmik damlacık taşıyan spermatozoon hücreleri olgunlaşmamış ve fonksiyonel olmayan hücrelerdir (Agarwal ve ark 2008a). Ejekülattaki olgunlaşmamış spermatozoon konsantrasyonundaki artışa paralel olarak olgun sperma hücrelerindeki hasarlı DNA miktarı da artış göstermektedir (Gil-Guzman ve ark 2001). ROS tarafından oluşturulan hasar hücrede doğal haline kıyasla fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Agarwal ve Saleh 2002).

1.2.3. Serbest Radikaller ve Hücreye Zarar Verme Mekanizmaları

Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu: Reaktif oksijen türleri oluşumu ve membran lipit peroksidasyonu; sperm canlılığı ve fertilitesi için önemli bir problemdir (Guthrie ve Welch 2012). Lipitlerin peroksidasyonu, serbest radikaller hücre membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının dengesini ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku hasarına sebep olurlar. Lipit peroksidasyon spermanın motilitesini düşürücü etki göstermektedir (Agarwal ve ark 2008a, Tekcan 2009).

Disülfit Bağı Oluşumu: Glutasyon, bütün memeli hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda mevcuttur. Glutasyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olur. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik füzyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfit bağını meydana getirir. Bu da proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerine engel olmaktadır (Tekcan 2009).

DNA Hasarı: DNA molekülü tekrar sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları, mutasyonlara ve genetik bozukluklara sebep olmaktadır. Bu yüzden DNA hasarının ROS ile uyarılan hücresel modifikasyonların en önemlisi olduğu düşünülmektedir (Tekcan 2009). Serbest radikallerin pürin ve primidin bağlarına zarar vermesi sonucu oluşan DNA hasarı düşük blastosit oluşumuna neden olmaktadır (Agarwal ve ark 2014).

1.3. Spermada Serbest Radikallerin Kaynağı

1.3.1. Lökositler

Lökositler fertil veya infertil tüm erkeklerin spermasında herhangi bir rahatsızlık görülmesine gerek olmadan bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1992 yılında 1 ml sperma içerisinde 1 x 10^6 dan daha yüksek miktarda lökosit bulunmasının anormal olduğunu belirtmiştir (Sandoval ve ark 2013). Lökositler oksijen radikallerinin güçlü üreticileridir. Nötrofil lökositlerin bakterileri fagosite ettikten sonra onları öldürmek için reaktif oksijen türleri ürettiği bilinmektedir (Kulaksız 2009). Enfeksiyon, aktive edilmiş lökositlerin erkek üreme sistemi içerisine geçişine ve ROS üretimine neden olur. Lökositler tarafından üretilen serbest radikaller spermlerin fonksiyonlarına ve DNA bütünlüğüne zarar vermektedir (Aitken ve Baker 2013). Lökositlerce oluşturulan oksijen radikalleri spermatozoonun fonksiyonel yeterlilik ve bütünlüğüne zarar vermektedir (Aitken ve ark 1994).

1.3.2. Spermaya Bulaşan Bakteriler

Gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS) salınımına neden oldukları bilinmektedir ve LPS endotoksin olarak görev yapar. LPS bakteri duvarının bir bileşenidir ve bakteriden bakteriolizis sırasında salınır. LPS'nin reaktif oksijen

üretimini arttırdığı ve bunun sonucunda motilitenin düştüğü belirlenmiştir (Urata ve ark 2001, Okazaki ve ark 2010).

Enfeksiyon ve yangının geçici veya kalıcı infertiliteye sebep olduğu bilinmektedir. Brecchia ve ark (2010) bakteriyel LPS'nin intraperitonal olarak tavşanlara verilmesinin kısa ve uzun süreli etkilerinin sperma kalitesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; sperma örneklerini haftalık olarak toplayıp değerlendirmiş ve değerlendirmeye 56'ıncı güne kadar devam etmişlerdir. Araştırmacılar spermatozoon membran bütünlüğünün 30'uncu günden sonra etkilenmeye başladığını ve spermatogenik siklusun sonunda nekrotik sperm hücre sayısının maksimum seviyeye yükseldiğini ifade etmişlerdir. Enfeksiyon sonrası LPS seviyesindeki yükselmenin spermatozoonların membran bütünlüğüne zarar vererek infertiliteye neden olabileceği araştırmacılar tarafından önemle vurgulanmaktadır.

1.4. Oksidatif Stres Nedir?

Oksidatif stres, reaktif türler (H_2O_2, süperoksit vs) ve bunlara karşı koyan hücresel antioksidan savunma sistemleri (Glutasyon, superoksit dismutaz vs) arasındaki dengesizlik sonucu oluşmaktadır (Sharma ve ark 1999, Demple 2010). Spermatogenezis esnasında düşük miktarda ROS üretimi normaldir. Bunun nedeni hidrojen peroksit gibi sperm hücresini zona pellusidaya bağlayan serbest radikallere, akrozom reaksiyonu ve spermatozoonun hiperaktivasyonu sırasında ihtiyaç duyulmasıdır. Spermatogenezisin uygun bir biçimde gerçekleşmesi için ROS ve antioksidan miktarı arasında denge sağlanmalıdır (Agarwal ve ark 2014). Bu dengeye ihtiyaç duyulmasının temel nedeni biyolojik sistemdeki antioksidanların serbest radikalleri temizleyemediği durumlarda aşırı miktarda oluşan ROS'lerin hücre, doku ve organlara zarar vererek birçok hastalığa neden olması ve üreme sistemi üzerine olumsuz etki göstermesidir (Agarwal ve ark 2008a). Oksidatif stres neredeyse infertil erkeklerin yarısında görülen patolojik bir durumdur ve iki temel mekanizma ile infertiliteye neden olur. Birinci mekanizma spermatozoa membranının zarar görmesi ile spermanın motilitesi ve oosite füzyon yeteneğinin azalmasıdır. İkinci mekanizma ise ROS'un sperm DNA'sını değiştirerek hasarlı paternal DNA'nın embriyoya geçmesidir (Tremellen 2008). Serbest radikallerin pürin ve primidin bağlarına zarar vermesi sonucu oluşan hasarlı DNA'lar düşük blastosit oluşumuna neden olmaktadır (Agarwal ve ark 2014).

1.4.1. Oksidatif Stresin Sperm Parametreleri Üzerine Etkileri

ROS genellikle oksidatif fosforilasyondaki enzimatik reaksiyonlar sırasında açığa çıkar. Bu enzimatik reaksiyonlar hücrenin enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için ATP formunda enerji üretilebilmesi için gerekmektedir (Tremellen 2008, Valko ve ark 2007). Spermlerde enerji mitokondrilerde üretilmektedir ve mitokondriler hücrenin gövde kısmında bulunmaktadır. Mitokondriyel DNA'lar nükleer DNA'lara göre enerji üretimi sırasında açığa çıkan ROS artışına bağlı şekillenen hasarlara karşı daha hassastırlar (Bogenhagen, 1999, Liu ve ark 2004, Taylor ve Turnbull 2005, Agarwal ve ark 2014). Yüksek ROS konsantrasyonu sitokrom C'nin serbest bırakılmasına neden olmaktadır. Bu da apoptotik raeksiyonları aktive etmektedir. Apoptozis erkek hastalarda infertilite oranını arttırmaktadır (Wang ve ark 2003, Agarwal ve ark 2014).

1.5. Oksidatif Stres Parametreleri

1.5.1. Lipit Peroksitleri ve Malondialdehit

Yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitleri meydana gelir. Lipit hidroperoksitleri, lipit peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile biyoaktif aldehitler oluşur. Bunlardan başlıcaları malondialdehit (MDA) ve hidroksialkenaller (örn. 4-OH-nonenal)'dir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir, ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar yaratırlar. Aerobik bir ortamda gerek metabolizma reaksiyonları sırasında, gerekse dış etkenlere bağlı olarak meydana gelen oksijen kaynaklı radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında bulunan lipitlerde (çoklu doymamış yağ asitleri, PUFA) oksidasyona neden olur. Lipit hidroperoksitleri ile son yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilir. MDA'nın aldehit grupları ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan renkli ürün 545 nm'de absorbans verir. Lipit hidroperoksitleri asidik ortamda Fe^{++} iyonunu, Fe^{+++} iyonuna oksitler. Fe^{+++} iyonunun xylenol orange ile reaksiyona girerek oluşturduğu renk de 560 nm dalga boyunda okunur (Oksante 2012).

1.5.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Memelilerdeki katalaz, GSH-Px gibi NADPH'ye bağımlıdır. GSH-Px aktivitesi sonucu oluşan okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) enzimi tarafından tekrar GSH'a dönüştürülür. Fagositlerde bulunan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sonucu oluşan serbest radikallerin yaptığı peroksidasyon hasarından hücreyi savunur. Ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimi normal dokularda bulunan ve fizyolojik işlemlerde önemli görev üstlenen bir enzim iken çeşitli patolojik şartlar altında serbest oksijen radikallerinin üretilmesinde önemli bir kaynak olan ksantin oksidaz (XO) formuna dönüşerek sistemde belirlenmektedir (Çiğremiş 2009).

1.6. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi

Ejekülatta oksidatif stres çok sayıda metotla ölçülebilmektedir. Birincisi hücrede açığa çıkan SOR'un (serbest oksijen radikalleri) ölçülmesidir. Ancak burada problem, lökosit kontaminasyonunun saptanan SOR düzeyi üzerine etkisidir. Çünkü lökositlerin SOR üretim kapasitesi spermadan 100 kat daha yüksektir. Bu nedenle spermatozoanın SOR üretim kapasitesini değerlendirmek için ortamda bulunan lökositlerin uzaklaştırılması gerekir. Gradiyent ayrıştırma sistemleri bulunmakla birlikte, tek başına tüm lökositlerin elimine edilmesi tam anlamıyla mümkün değildir. En ideali sperm üzerindeki lökosit antijeni CD45'e karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlarla kaplanmış paramanyetik tanecikler veya ferrofluid ile inkübe etmek ve böylece lökositleri uzaklaştırmaktır. Arkasından N-formil-metionil-lösil-fenilalanin (FMLP) provokasyon testi yapılarak lökositlerin elimine edildiğinin belirlenmesidir. Eğer lökositlerin yeteri kadar temizlendiğine kanaat edilirse spermatozoa forbol ester ile muamele edilerek SOR yapımı uyarılır. Forbol esterin olgunlaşmamış, defektif spermatozoadan SOR üretimini artırıcı etkisi gösterilmiştir. Bu etkisi olgun spermlerde gözlenmemektedir (Demirtaş ve Üntan 2011).

Bir hastanın infertil olup olmadığının, ejekülatındaki oksidatif stres ölçülerek belirlenmesi için iki ölçüm şekli bulunmaktadır. Birincisi spermatozoa tarafından üretilen ROS seviyesinin ölçülmesidir. İkinci yöntem ise; protein karbonil gibi metal ve karbon monoksit içeren kimyasal bileşiklerin ölçülerek protein miktarının ya da glutasyon peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzim

konsantrasyonunun belirlenmesidir (Agarwal ve ark 2014). Ejekülat içerisinde spermatozoa tarafından üretilen intra ve ekstrasellüler ROS'un ölçülmesinde luminol-mediated chemiluminescence (kimyasal bileşim oksidasyonu ile ışık oluşması) yöntemi kullanılabilmektedir (Kobayashi ve ark 2001). Horse radish peroksidaz eklenmesiyle ölçüm hidrojen perokside hassas hale getirilmektedir. Luminal adlı oksidasyona karşı çok hassas bir kimyasalın da reaksiyona katılmasıyla luminosens üretimi başlar ve miktarı luminometre tarafından ölçülür (Saleh ve Agarwal 2002). Bu ölçümün referans değerleri ROS konsantrasyonu <20 relatif ışık birimi (RLU)s/10 milyon spermatozoa fizyolojik, ≥20 relatif ışık birimi (RLU)s/10 milyon spermatozoa ise patolojik (oksidatif stres) olarak değerlendirilmektedir (Benjamin ve ark 2012). Diğer yöntem semen örneğindeki ROS seviyesini ölçmek amacıyla protein karbonil gibi kimyasal olarak dengeli oksidasyon ürünlerinin ölçümüdür (Dalle-Donne ve ark 2003). Seminal plazmadaki protein karbonil miktarı ELISA yöntemiyle belirlenebilmektedir (El-Taieb ve ark 2009). Bu yöntemler dışında değişken olan antioksidan miktarının tümünün ölçümü yapılabilmektedir. Total antioksidan kapasite seminal plazma içerisinde üretilen tüm antioksidanların kapasitesinin ölçülmesidir. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz gibi enzimatik antioksidanlar, askorbik asit (vitamin C), alfa-tokoferol (vitamin E) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar ve albumin, seruloplazmin, ferritin, bilirubin, ürik asit ve indirgenmiş glutasyon gibi moleküllerlerdir. Bunların hepsi toplandığı zaman total seminal plazmada üretilen antioksidan etkiyi oluşturmaktadır (Kashou ve ark 2013).

Reaktif oksijen türlerinin hem zararlı hem de yararlı etkileri bulunmaktadır. Yararlı etkileri düşük ve orta yoğunlukta olduğu zaman görülür. ROS'un aşırı üretimi (mitokondrial elektron transport geçiş zincirinden veya NADPH'nin aşırı stimülasyonundan kaynaklanan) DNA, lipit, proteinler ve membran dahil olmak üzere hücre yapılarına önemli bir zarar mediatörü olabilecek oksidatif stres ile sonuçlanır (Valko ve ark 2007).

1.7. Mikrotubül İnhibitörlerinin Sağlıklı Erkek Deney Hayvanları Üzerine Etkileri

Çeşitli bitkisel kökenli maddeler mitoz esnasında sitoplazma içi hareketleri kontrol eden mikrotubüllerin arasındaki polimerize ve depolimerize yapıların dengesini bozarak sitotoksik etki meydana getirmektedir. Tubuline bağlanarak polimerizasyonu inhibe eden bitkisel kaynaklı mikrotubül inhibitörü kemoterapötikler vinblastin, vindesin, vinkristin ve vinorelbin gibi vinka alkaloitleridir. Dosetaksel ve paklitaksel ise tubüllerin yapılmasını engellemeden hücrede mikrotubüllerin toplanmasını arttırarak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotubül toplulukları oluşturmak suretiyle sitotoksik etki göstermektedir (Erdemoğlu ve Şener 2000, Türk 2013).

1.8. Antioksidan Savunma Mekanizması

Spermatozoonlar normal şartlar altında az miktarda ROS üretmektedir. ROS'un spermatozoonun kapasitasyonu, hiperaktivasyonu ve sperma-oosit füzyonu için gerekli olduğu belirtilmektedir. Spermatozoonun sitoplazması düşük miktarda enzim içerdiği için plazma membranı yüksek miktarda doymamış yağ asidi (PUFA) içermektedir (Agarwal ve ark 2008a). Spermatozoonun membranındaki yüksek miktardaki doymamış yağ asitleri akışkanlık sağlaması ve spermatozoonun zona pellusidaya bağlanması için gereklidir. Fakat bunun yanında ROS saldırısına karşı hücreyi savunmasız bırakmaktadır (Agarwal ve ark 2014).

Hücreler özellikle yüksek miktarda ROS'un oluşturacağı hasara karşı çok hassastır. Seminal plazma semende önemli bir antioksidan kaynağıdır (Agarwal ve ark 2014). Seminal plazma içerisinde ROS' un oluşturacağı hasara karşı koruyucu iki farklı antioksidan sınıfı bulunmaktadır. Bunlar enzimatik (katalaz vb.) ve enzimatik olmayan (vitamin C vb.) antioksidanlardır. Bu antioksidan maddelerin savunma mekanizması; önleme, durdurma ve onarma olmak üzere üç aşamalıdır. Savunmanın ilk aşamasında ROS üretiminin önlenmesi için antioksidan maddenin metal iyonlarını bağlayarak zincirleme reaksiyonun başlamasının engellenmesidir. Eğer ağır metaller ROS' a gevşek bir biçimde bağlanırsa özellikle OH^- olmak üzere daha fazla reaktif oksidan üretirler. Serbest radikallerin zincirleme reaksiyon başlatmaya eğilimi vardır. Antioksidanların koruma yollarından ikincisi reaksiyonun

durdurulması ise; oluşacak hasarı önlemek için son ürün olan radikal yapının etkisizleştirilmesidir. Bir antioksidan olan alfa-tokoferol, peroksil ve alkoksil radikallerini temizleyerek lipit peroksidasyonu inhibe etmektedir. Alfa-tokoferol'ün plazma membranındaki peroksil radikallerinin istikrarlı bir oranda azalımını sağlayabilmesi askorbat veya tiyol gibi dışarıdan sağlanan indirgeyici ajanlar tarafından yeniden yapılandırılmasına bağlıdır. Bu şekilde alfa-tokoferolün miktarı azalsa bile bu zincirleme reaksiyonu engellemek için görev yapabilir (Agarwal ve ark 2008a). Üçüncü koruma yolu ise; serbest radikaller tarafından oluşturulan hasarın onarılmasıdır. Ancak spermatozoonlarda ROS tarafından oluşturulan hasarlar onarılamaz, çünkü gerekli olan sitoplazmik enzim sistemine sahip değillerdir. (Ochsendorf 1999, Irshad ve Chaudhuri 2002). Seminal plazmasında yüksek düzeyde ROS tespit edilen infertil erkeklerde antioksidan seviyesindeki düşüşten daha fazla ROS üretiminde artış belirlenmiştir (Lewis ve ark 1995).

1.8.1. Antioksidan Maddelerin Koruyucu Özellikleri

Bir antioksidan enzim olan katalaz spermatozoonun zona pellusidaya bağlanmasını sağlayan hidrojen peroksitin antioksidanıdır. Hidrojen peroksit ve katalaz arasındaki hassas denge hidrojen peroksitin fazlasının absorbe edilerek sperma motilitesinin korunmasını sağlamaktadır (Tremellen 2008). Adriamycin (ADR) antikanser tedavisinde birçok tümör çeşidine karşı kullanılan reprodüktif anormaliteye sebep olan bir ilaçtır. Prahalathan ve ark (2006) lipoik asitin ADR'nin testisler üzerine toksik etkisine karşı etkinliği araştırdıkları çalışmalarında; ratlara intravenöz olarak 1 mg/kg dozunda haftada birkez olmak üzere 10 hafta süreyle ADR uygulamışlardır. Araştırmacılar çalışmada sperma yoğunluğu, motilitesi ve anormal spermatozoon oranlarını değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda ADR'nin sperma yoğunluğu ve motilitesinde gözle görülür düşüşe neden olup ölü ve anormal spermatozoon oranlarını arttırdığı, ADR uygulamasından 1 gün öncesinde 35 mg/kg dozunda lipoik asit uygulamasının sperma kalitesini iyileştirdiğini ifade etmektedirler.

Narayana ve ark (2012) bleomycin, etoposide ve cisplatin'in (BEP) testis üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; yetişkin 7 rata 4 gün boyunca BEP uygulamışlardır. Araştırmacılar BEP grubunda kontrol grubuna göre, spermatozoa

motilitesi, yoğunluğu, enzimatik antioksidan aktivitesi ve testis ağırlığının düştüğünü, LPO seviyesinin ise yükseldiğini belirlemişlerdir.

Alam ve ark (2011) fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında taurinin spermatozoa motilitesi, yoğunluğu ve GSH seviyesini arttırdığını DNA hasarı ve anormal spermatozoon sayısını ise düşürdüğünü belirlemişlerdir. Flavanoidlerden ellajik asit, karotenoidlerden likopen, sentetik antibiyotiklerden doksisiklin, β-amino asit olan β-glukan gibi kimyasal antioksidanların da; bitkisel ekstraktlardaki gibi serbest radikal süpürücü etkileriyle doksorubisinin neden olduğu testis histolojisindeki hasarları, sperm kalite parametreleri'ndeki düşüşleri (yoğunluk, motilite, anormalite) ve apoptotik germ hücre sayısındaki artışları önleyebildiği bildirilmektedir (Türk 2013).

Vitamin E süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini temizleyen sperm membran antioksidanıdır (Agarwal ve ark 2008b). Astenozoospermik erkeklerde vitamin E tedavisi sonrası lipit peroksidasyon azalmakta, hareketlilik ve gebelik oranları artmaktadır (Suleiman ve ark 1996). Vitamin C, vitamin E'yi yenileyen süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri üzerine etkili ve sperm aglütinasyonunu engelleyen bir antioksidandır. Vitamin C'nin glutasyon ve vitamin E ile kombine tedavisi sonrasında, spermatozoa hidroksiguanin düzeyi düşüp, sperm sayısı yükselmektedir. Vitamin E ile birlikte kullanıldığında ise DNA hasarını düşürmektedir (Demirtaş ve Üntan 2011). Asetil-KoA'dan üretilen asetatın hücre içerisinde depolanmasında ve mitokondrial zarlardan yağ asitlerinin geçişinde L-karnitin önemli role sahiptir. Sperm metabolizması ve spermatozoanın kullanacağı enerjinin üretilmesinde L-karnitin ve L-asetil karnitin önemli bir yere sahiptir (Demirtaş ve Üntan 2011). Ayrıca karnitin toksik bir ara ürün olan açil-koA'yı ortadan kaldırarak apoptozu engeller (Ng ve ark 2004). İnfertil erkeklerde L-karnitin tedavisi sonrası sperm konsantrasyonunda artış gözlenmiştir (Moradi ve ark 2010). Koenzim Q10 testislerde belirgin bir şekilde üretilen, hücre zarları ve lipoproteinlerle ilgili yağda çözünebilen önemli bir antioksidan maddedir (Demirtaş ve Üntan 2011). Koenzim Q10 tedavisi sonrası seminal plazma ve sperm hücrelerinde koenzim Q10 seviyesinde, fosfotidilkolin düzeyinde ve sperm motilitesinde artış görülmüştür (Balercia ve ark 2009).

1.9. Kematerapötik İlaçların Erkek Deney Hayvanlarında Testis Dokusu Üzerine Etkileri

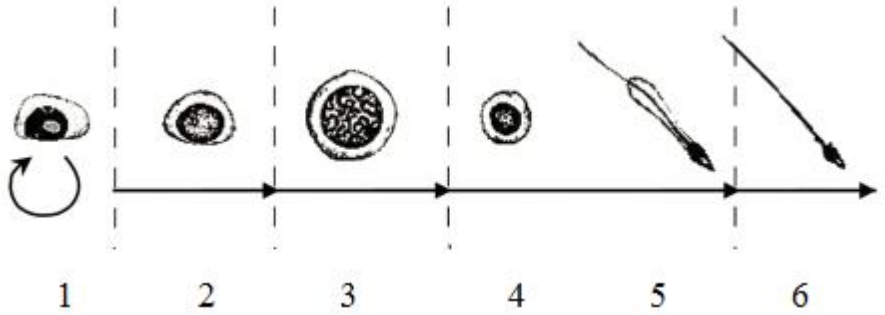
Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen kemoterapötiklere direnç sağlayabilirken, germinal epitelyum son derece hassastır. Tedavide kullanılan kemoterapi protokolü sonrasında, eğer germinal epitelyumdaki kök hücreler sağlam kalırsa, tedavinin sonrasında belirli bir zaman içerisinde spermatogenezis tekrar normale dönebilmektedir (Türk 2013).

Okzafosforinler sınıfından siklofosfamid; sitotoksik alkilleyici bir kematerapötik madde olup birçok kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Geniş klinik kullanımının yanı sıra insan ve deney hayvanlarında reprodüktif toksisiteyi de kapsayan önemli yan etkilere neden olduğu belirtilmektedir. Bu ajanla tedavi gören erkek hastalarda başta sperma yoğunluğunda azalmalar olmak üzere testis ve epididimiste biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler belirlenmiştir (Anderson 1995).

Antikanser ilaçların sperma kalitesi ve fertilite üzerine yan etkileri doz ve uygulama sıklığına bağlı olarak vücuttaki birikimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kemoterapötiklerin etkisi tadavi öncesindeki gonadal fonksiyonlara bağlı olarakta değişmektedir. Altı ay boyunca kemoterapi gören hastaların %67'sinde şiddetli oligospermi ve %60'ında ise anormal spermatozoa miktarında artış olmaktadır. (Ragheb ve Sabanegh 2010).

1.10. Kemoterapinin Gonodotoksik Etkileri

1.10.1. Spermatogenetik Aşama



Şekil 1.2. Antikanser ilaçların spermatozoa üzerindeki etkilerinin şematik sunumu (Meistrich 2009).

(1) Köken Spermatogonium: Kendiliğinden yenilenebilir ve yaşam boyu devam eden farklılaşabilen hücrelerdir. Sadece bazı antikanser ilaçlarla öldürülmeye hassastır. DNA hasarı genellikle tamir edilebilir. Daha düşük düzeyde mutasyonlar gözlenebilir.

(2) Farklılaşan Spermatogonium: Birçok antikanser ilaç tarafından öldürülmeye karşı aşırı hassas hücrelerdir.

(3) Spermatosit: Bazı antikanser ilaçları anormal kromozom ayrılmalarını indükleyebilir.

(4) Spermatid ve (5) Testiküler spermatozoon: Antikanser ilaç tarafından öldürülmeye nispeten hassas hücrelerdir.

(5) Testiküler Spermatozoon ve (6) Ejeküle edilmiş spermatozoon: DNA hasarı tamir edilemez (Meistrich 2009).

1.10.2. Spermatogenetik Aşamada Antikanser Ajanların Sitotoksik Etkileri

Spermatogenezisin farklı aşamalarının fizyolojisinin anlaşılması antikanser ilaçların üreme sisteminde neden olduğu toksik etkiyi daha iyi anlamamızı sağlamaktadır. Antikanser ilaçlara maruz kalma sonrasında spermatogenetik hücre toksikasyonu histolojik olarak testis dokusunun değerlendirilmesi ile incelenmiştir. A1 spermatogoniumlar hızlı bölünen hücreler oldukları için en hassas hedeftirler ve ilk spermatotoksik aşamadadırlar. Spermatogoniumlar gelişimine göre köken,

proliferatif ve farklılaşan spermatogoniumlar olmak üzere 3 ayrı şekilde sınıflandırılmaktadır. Kemoterapi uygulamasından 4-6 hafta sonrasında fertilite potansiyeli en düşük seviyeye düşmektedir, bu farklılaşan spermatogoniumların kemoterapötik gonadotoksiteye karşı en savunmasız hücreler olduğunu düşündürmektedir. Köken spermatogoniumlar değişken hücrelere göre kemoterapotik toksisiteye karşı daha dirençlidir. Bu durum değişken hücrelerin yüksek proliferasyon oranına bağlanabilir. Kemoterapiye bağlı fertilitenin düşüş şiddeti ve hızı köken spermatogoniumlardaki hasarın seviyesine bağlıdır. Bundan dolayı her antikanser ilacın kendine özgü sperm iyileşme hızı vardır ve bu ilacın mekanizmasına bağlı olarak şekillenir. Ayrıca kemoterapötik ilaçlar kan testis bariyerini geçip köken spermatogoniumlara zarar verdikten sonra bu durum köken spermatogoniumlarında azalmanın dışında testis intestinal dokusunda hiyalinizasyon ve fibrozise neden olur (Ragheb ve Sabanegh 2010).

1.11. Kemoterapötikler ve Paklitaksel'in Etki Mekanizması

Kemoterapötikler hızlı üreyen ve farklılaşma kabiliyetindeki sağlıklı hücreler üzerinde primer yan etkiye sahip oldukları için sitotoksik kemoterapi doğrudan gonadal hasara neden olmakta ve bu hasarın derecesi de ilacın veriliş şekline ve dozuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kemoterapinin yanında radyoterapi uygulandığında, düşük dozlarda da spermatogenesis çok ciddi oranlarda etkilenmektedir (Türk 2013).

Birçok kemoterapötik ilaç etkisini hızlı bölünen hücreler üzerinde göstermektedir. Bu sebeple yan etkiler daha çok kıl follikülleri, kemik iliği ve gastrointestinal sistem mukozası gibi hücreler üzerinde şekillenmektedir. Testisteki Leydig ve Sertoli hücreleri kemoterapötiklere karşı direnç gösterirken, germinal epitelyum bu ilaçlara son derece hassastır. Ancak kullanılan kemoterapi protokolünün ilaç sayısı, dozları ve uygulama sürelerine bağlı olmakla birlikte, eğer germinal epitelyumdaki kök hücreler sağlam kalırsa, tedavinin sonlandırılmasından belli süre sonra spermatogenezis normale dönebilmektedir (Özbey 2011). Testis germinal epitel hücreleri yüksek mitotik aktiviteye sahip olmaları sebebiyle sitotoksik kemoterapötiklere karşı hassastırlar. Hematolojik malignitelerin tedavisi sırasında gonad fonksiyonları hasta yaşı, kümülatif doz ve kullanılan her bir ajana

bağlı olarak farklı şekillerde etkilenmektedir. Kemoterapötikler, germ hücrelerinde mutajenik değişikliklere neden olabilmektedir (Dilek 2010).

Alkilleyici ajanlar (mekloretamin, siklofosfamid, klorambusil, ifosfamid, dakarbazin, tiotepa, melfalan, busulfan, karmustin, lomustin, prokarbazin) gonadotoksik etki göstermektedir (Poyrazoğlu ve ark 2010). Siklofosfamid malign olmayan hastalıkların tedavisinde tek ilaç olarak kullanıldığı için gonadotoksik etkisi tespit edilmiştir. Siklofosfamid, özellikle hızlı bölünen hücreler üzerine etki gösterirken en fazla testisin germinal epiteli üzerine etki gösterir. Özellikle toplam >7.5 g/m^2 siklofosfamid dozu gonadotoksisite açısından yüksek riske sahiptir. Toplam 5-45 g siklofosfamid kullanılan hastalarda puberte normal olarak ilerlemiş sadece hormonal olarak kendini gösteren dengelenmiş bir Leydig hücre yetersizliği belirlenmiştir (Oeffinger ve Hudson 2004, Poyrazoğlu ve ark 2010).

1.11.1. Paklitaksel

Doğal bir diterpen alkaloidi olan paklitaksel, porsuk ağacı (*Taxus Brevifolia*) kabuğundan elde edilmektedir. Paklitaksel, mikrotubül polimerine bağlanarak de-polimerizasyona karşı kararlılığın sağlanmasında görev alır ve en fazla tercih edilen antikanser ilaçlardan bir tanesidir (Karlığa ve Talınlı 2004).

Kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçlar tesirini hücre kinetiği üzerine etki ederek gösterir. Tümör hücrelerinin mitoz kabiliyeti diğer hücrelerden yüksek olduğundan, bu hücreler sitotoksik ilaçlara karşı daha hassastır. Kemoterapi ajanlarının kümülatif ve irreversible yan etkileri gözlenebilir. Jinekolojik onkolojide kullanılan kemoterapatik ajanlarla, kullanıldığı dozlarda, kümülatif toksisite nadir görülür ve çoğunlukla karşı konulabilir seviyededir. Paklitaksel jinekolojik malignitelerde çoğunlukla kullanılan mikrotubül üzerinden etki gösteren kemoterapi ilacıdır (Özgül ve ark 2012).

Taksan grubu ilaçlar hücre bölünmesi ve mitozun dinamik dengesini bozduğu için apoptoza neden olur. Bunu tubüline bağlandıktan sonra mikrotubül ayrılmasını engelleyerek gerçekleştirir (Guo ve ark 2002). Paklitaksel antineoplastik etkisini mitozun durmasına ve apoptozisin başlamasına yol açarak gerçekleştirmektedir (Loo ve ark 2005). Son yıllarda paklitakselin serbest oksijen radikallerini artırabileceği bildirilmiştir (Kim ve ark 2008).

Çizelge 1.1. Mikrotubül inhibitorleri, alkilize edici ajanlar, platin analogları (Şen 2002).

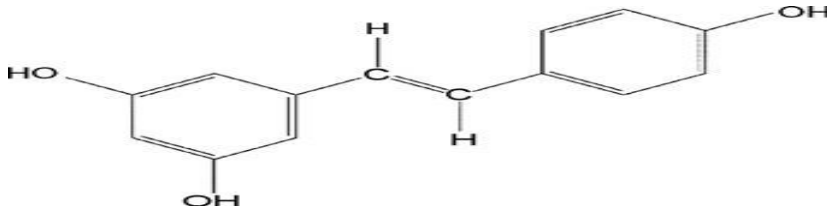
Mikrotubül inhibitorleri	Alkilleyici ajanlar	Platin Analogları
Vinkristin	Azotlu hardallar 1. Siklofosfamid 2. Mekloretamin 3. Klorambusil 4. Melfalan 5. İfosfamid	Sisplatin
Vinblastin	Etileniminler, metilmelaminler 1. Tiotepa (aziridin) 2. Altretamin	Karboplatin
Taksanlar 1. Paklitaksel 2. Dosetaksel 3. Kabazitaxel 4. Protein bağlı Paklitaksel	Nitrozoüreler 1. Karmustin (i.v. İnf.) 2. Lomustin (p.o.) 3. Estramusin (p.o)	Okzaliplatin
	Alkil sulfonatlar 1. Busulfan	

1.12. Resveratrol'ün Biyolojik Etkisi ve Muhtemel Faydaları

1.12.1. Resveratrol

Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) bitkiler tarafından doğal olarak üretilen üzüm (kırmızı üzümlerin kabuğunda) ve şarapta bulunan antioksidan ve antiproliferatif etkili doğal bir fitoaleksindir (antimikrobiyal ve antifungal etkili bileşik). Resveratrol inflamatuvar olaylarda ve karsinogenezde düzenleyici rol oynar ayrıca antioksidan, antisiklooksijenaz, lipit ve lipoprotein metabolizmasını düzenleyici etkinliğe sahip bir maddedir (Pace-Asciak ve ark 1995, Jang ve ark 1997, Uguralp ve ark 2005).

Güney Fransa'da yaşayan insanlar yüksek miktarda doymuş yağlar kullanmalarına rağmen koroner kalp hastalığı görülme sıklığının düşük olması olgusu "*Fransız Paradoksu*" olarak tanımlanmaktadır. Bu olayın, bölgede yüksek miktarda resveratrol içeren ürünlerin tüketilmesine bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle resveratrol üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda önemli düzeyde artmıştır (Ahmad ve ark 2000).



Şekil 1.3. Resveratrol'ün kimyasal yapısı (Marques ve ark 2009).

Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik etkileri olan resveratrol'ün çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan oksidatif hasara karşı koruma yeteneği'de gösterilmiştir (Kolgazi ve ark 2006, Mokni ve ark 2007).

Dokulardaki oksijenizasyon sonucu meydana gelen serbest oksijen radikallerini, normal şartlar altında katalaz, glutasyonperoksidaz ve superoksit dismutaz gibi hücresel antioksidan mekanizmalar sayesinde etkisiz hale getirilir. Resveratrol'ün süperoksit ve hidroksil radikalini yakalama özelliğinin olduğu belirtilmiştir. Resveratrol, in vitro koşullarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen in vivo olarak güçlü bir antioksidan işlevi göstermektedir. Resveratrol'ün in vivo antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini artırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada in vivo antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürekliliğini de sağlamaktadır (De La Lastra ve Villegas 2007).

1.12.2. Biyolojik Etkisi

Resveratrol'ün çok sayıda biyolojik etkisinin olmasının sebebi çok çeşitli intrasellüler molekül üzerine etki edebilmesinden kaynaklanmaktadır. En iyi bilinen etkisi sirtuin sınıfı enzimler üzerine yaptığı etkidir. Memelilerde 7 çeşit sirtuin sınıf enzim bulunmaktadır (sirt1-sirt7) (Baur ve Sinclair 2006, Brooks ve Gu 2009). Sirtuinler birçok hücre içi geçiş yollarını düzenler. Bunu hücre beslenmesinin sağlanabilmesi için transkripsiyon faktörlerini aktive ederek ve enzim cevabını sağlayarak yaparlar. Sirt 1 grup içerisinde önemli bir yere sahiptir. DNA onarımı, hücre canlılığı, glukoneogenezis ve lipit metabolizması gibi birçok hayati süreç ile direkt ilişkilidir (Brooks ve Gu 2009).

Resveratrol çeşitli hücre sinyali moleküllerine bağlanarak hücre döngüsünü düzenleyen genler üzerine etki gösterir. Birtakım transkripsiyon faktörünü aktive eder. Proteinkinazları, metastatik gen üretimini ve yangı belirtilerini inhibe eder. Resveratrol antioksidan enzimlerini uyarmaktadır (Baur ve Sinclair 2006).

1.12.3. Muhtemel Faydaları

Resveratrol geniş spektrumlu etkiye sahip olması nedeniyle birçok patolojik olguya karşı koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Memelilerin alt organizmaları üzerine besleyici özelliği bulunan resveratrol'ün bu yeteneği sayesinde hücrelerin yaşlanma ve metabolizma etkilerinden korunmasına yardımcı olmaktadır. Resveratrol'ün yüksek yağ içeren diyetlerle beslenen farelerde bu diyetin olumsuz etkilerini baskılayarak yaşam değerlerini normal hale getirdiği ve erken ölümleri engellediği belirlenmiştir. Bunun yanında insülin hassasiyeti ve motor fonksiyonlarını artırmaktadır (Baur ve Sinclair 2006). Resveratrol'ün normal diyetle beslenen farelerde yaşam değerleri üzerinde belirgin olumlu bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir (Pearson ve ark 2008). Ayrıca yüksek doz resveratrol uygulanmasının farelerde kas yorgunluğunda azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir (Lagouge ve ark 2006). Sisplatin gibi kemoterapi ilaçlarının olumsuz etkilerini baskıladığı belirlenmiştir (Olas ve ark 2005). Resveratrol mitokondriyel süperoksit dismutaz2 (SOD2) seviyesini düzenleyerek mitokondriyel oksidatif stresi engellemekte ve sinir hücrelerini oksidatif sitotoksik etkiye karşı korumaktadır (Fukui ve ark 2010).

Sunulan çalışmasında, paklitaksel'in erkek tavşanlarda spermatolojik ve oksidatif stres parametereleri ile testis histolojisi üzerine oluşturabileceği hasarların araştırılması amaçlandı, eğer hasar oluşuyor ise bunun fertilite üzerine etkileri ve resveratrol'ün bu hasarlara karşı koruyucu özelliğinin belirlenmesi hedeflendi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi ve Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü.

Sunulan çalışma için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan gerekli izin (2012/031) alındı.

2.1. Tavşanların Bakım ve Beslenmesi

Çalışmada canlı ağırlıkları 2,5-3 kg arasında değişen 32 erkek ve 32 adet dişi olmak üzere toplam 64 adet Beyaz Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Sperma toplama işlemi için ayrıca 3 adet dişi tavşandan yararlanıldı. Tavşanlar, yem haznesi ve otomatik sulukları bulunan paslanmaz çelik kafeslerde her kafeste tek hayvan kalacak biçimde sessiz, sıcaklığın 20±2 ºC ve nemin % 60-65 arasında kontrol altında tutulduğu, ayrıca 16 saat ışık, 8 saat karanlık ışık döngüsünün sağlandığı bir odada barındırıldılar. Tavşanlar standart pelet yem ve içme suyu ile beslendi.



Şekil 2.1. Tavşanların bakıldığı kafesler.

2.2. Tavşanların Sperma Eldesine Alıştırılması

Çalışma öncesi erkek tavşanlar 15 gün süreyle dişi tavşan kullanılarak suni vajene alıştırıldı. Çalışma süresince erkek tavşanlardan 3 gün ara ile haftada 2 kez dişi tavşan erkeğin kafesine götürülerek suni vajen yardımıyla sperma alındı. Alınan ejekülattan jel kısmı ayrıldıktan sonra örneklerin spermatolojik muayeneleri gerçekleştrildi.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Hayvanlar, genel sağlık yönünden muayene edildikten sonra canlı ağırlıkları tartılarak ve spermatolojik muayeneleri yapılarak her grupta 8 tane olmak üzere 4 eşit gruba ayrıldı ve çalışma öncesi homojen dağılım sağlandı.

Çizelge 2.1. Hayvanların 0. hafta canlı ağırlıkları ve gruplara göre dağılımı.

2,4 kg	K1	2,5 kg	P1	2,7 kg	R1	2,7 kg	P+ R1
2,5 kg	K2	2,5 kg	P2	2,7 kg	R2	2,7 kg	P+ R2
2,8 kg	K3	2,4 kg	P3	2,7 kg	R3	2,8 kg	P+ R3
2,6 kg	K4	2,35 kg	P4	2,5 kg	R4	2,5 kg	P+ R4
2,4 kg	K5	2,8 kg	P5	2,5 kg	R5	2,6 kg	P+ R5
2,7 kg	K6	2,7 kg	P6	2,6 kg	R6	2,6 kg	P+ R6
2,7 kg	K7	2,6 kg	P7	2,5 kg	R7	2,5 kg	P+ R7
2,6 kg	K8	2,4 kg	P8	2,4 kg	R8	2,8 kg	P+ R8

Çizelge 2.2. Hayvanların 0. hafta subjektif motilite değerleri ve gruplara göre dağılımı.

%80	K1	%85	P1	%80	R1	%85	P+ R1
%85	K2	%85	P2	%85	R2	%80	P+ R2
%85	K3	%85	P3	%80	R3	%80	P+ R3
%85	K4	%80	P4	%80	R4	%85	P+ R4
%80	K5	%85	P5	%85	R5	%80	P+ R5
%80	K6	%85	P6	%80	R6	%85	P+ R6
%85	K7	%85	P7	%85	R7	%85	P+ R7
%80	K8	%80	P8	%85	R8	%80	P+ R8

2.4. Tavşanlarda İntravenöz Enjeksiyon

Bu uygulamalar için vena auricularis marginalis kullanıldı. İlk olarak hayvan türe uygun bir şekilde sabitlendi. Ven çevresindeki deri alkol ile temizlendi. İşlemi uygulamak için venin kulak üzerindeki başlangıç noktasına bastırıldı ve vena auricularis marginalisin dilate hale gelmesi sağlandı.

Damar belirgin bir biçimde görüldüğünde bir elle kulak tutuldu ve diğer elle intraket vene paralel olarak 1-2 cm ilerletildi. Damarda olunduğundan emin olduktan sonra uygulama yapıldı.

2.5. Antikanser İlaç Uygulaması

Paklitaksel (actavis, sindaxel 300mg/50ml) 40 ml serum fizyolojik içerisinde 5 mg/kg/gün dozunda 8 hafta boyunca vena auricularis marginalisten uygulandı.



Şekil 2.2. Kullanılan antikanser ilaçlar.

2.6. Antioksidan Madde Uygulanması

Resveratrol (Sigma–Aldrich) serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek 4 mg/kg/gün dozunda 5 dakikalık infüzyonla 8 hafta boyunca vena auricularis marginalisten intravenöz yolla uygulandı.

Kontrol grubuna ise 40 ml I.V. serum fizyolojik verilerek placebo etkisi oluşturuldu.

2.7. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması

Çalışmada tris içeren ana stok solüsyonu kullanıldı. Solüsyon hazırlanırken 37ºC deki bidistile su kullanıldı. Bidistile su içerisinde tris, sitrik asit, glukoz ve sükroz çözdürülüp üzerine antibiyotik madde eklendi.

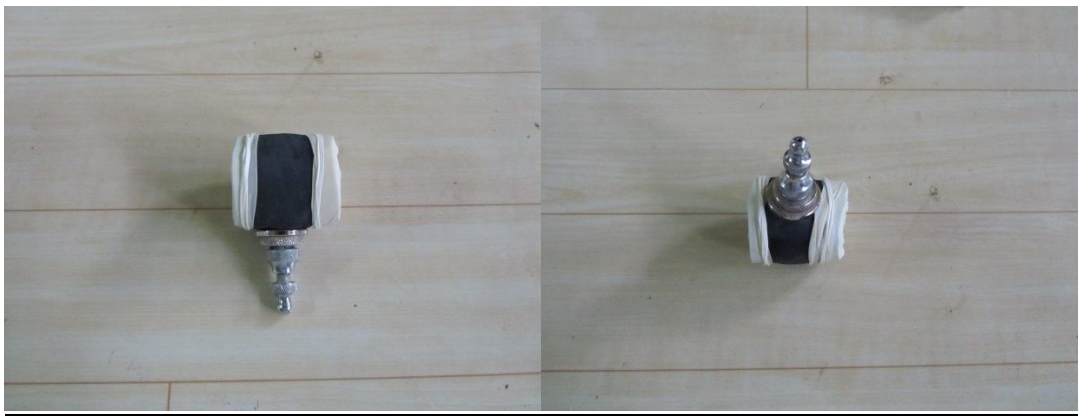
Tris Stok Solüsyon	
Tris	0,25 M / 100 ml
Sitrik asit	88 mM / 100 ml
Glukoz	47 mM / 100 ml
Sükroz	50 mM / 100 ml

Stok solüsyon çalışmanın tümünde yetecek miktarda hazırlanarak +4 ºC'de saklandı. Sperma alınacağı gün stok solüsyona % 20 oranında günlük yumurta sarısı

eklendi. Yumurta sarısının tortularını uzaklaştırmak için solüsyon 15 ml'lik falcon tüpler içerisine konularak 15 dakika 6000 devirde santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında sulandırıcı filtre edilerek hazır hale getirildi.

2.8. Suni Vajenin Hazırlanması

Suni vajen ve ekipmanları etüvde sterilize edildi. Vajenin içerisi 44-45 ^{o}C'deki su ile 2/3 oranında doldurulduktan sonra sperma toplama kadehi yerleştirildi ve puar yardımıyla şişirilip hazır hale getirildi. Son olarak kayganlaştırıcı olarak ağız kısmına sperma sulandırıcısı sürüldü.



Şekil 2.3. Tavşanlardan sperma eldesi için kullanılan suni vajen.

2.9. Sperma Eldesi ve Sulandırılması

Ejekülatlar 11 hafta boyunca haftada 2 kez cam tüplere alındı ve jel kısmı uzaklaştırıldıktan sonra miktarı ölçüldü. Sperma 32 ^{o}C'deki su banyosuna yerleştirildi. Gruplar kendi içerisinde pooling yapıldı. Mix yapılan sperma 1/4 oranında tris bazlı sulandırıcı ile sulandırıldı.

2.10. Motilitenin Belirlenmesi

Spermatozoa motilitesi sıcaklığı 37 ^{o}C'ye ayarlanmış ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun x40 objektifinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 4 mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması motilite oranı olarak kaydedildi.

2.11.Yoğunluğun Belirlenmesi

Spermatozoa yoğunluğu hemositometrik yöntem ile hayem eriğiyi kullanılarak sulandırılan sperma numunesinin thoma-lamında toplam 10 kare içerisinde sayılmasıyla belirlendi.

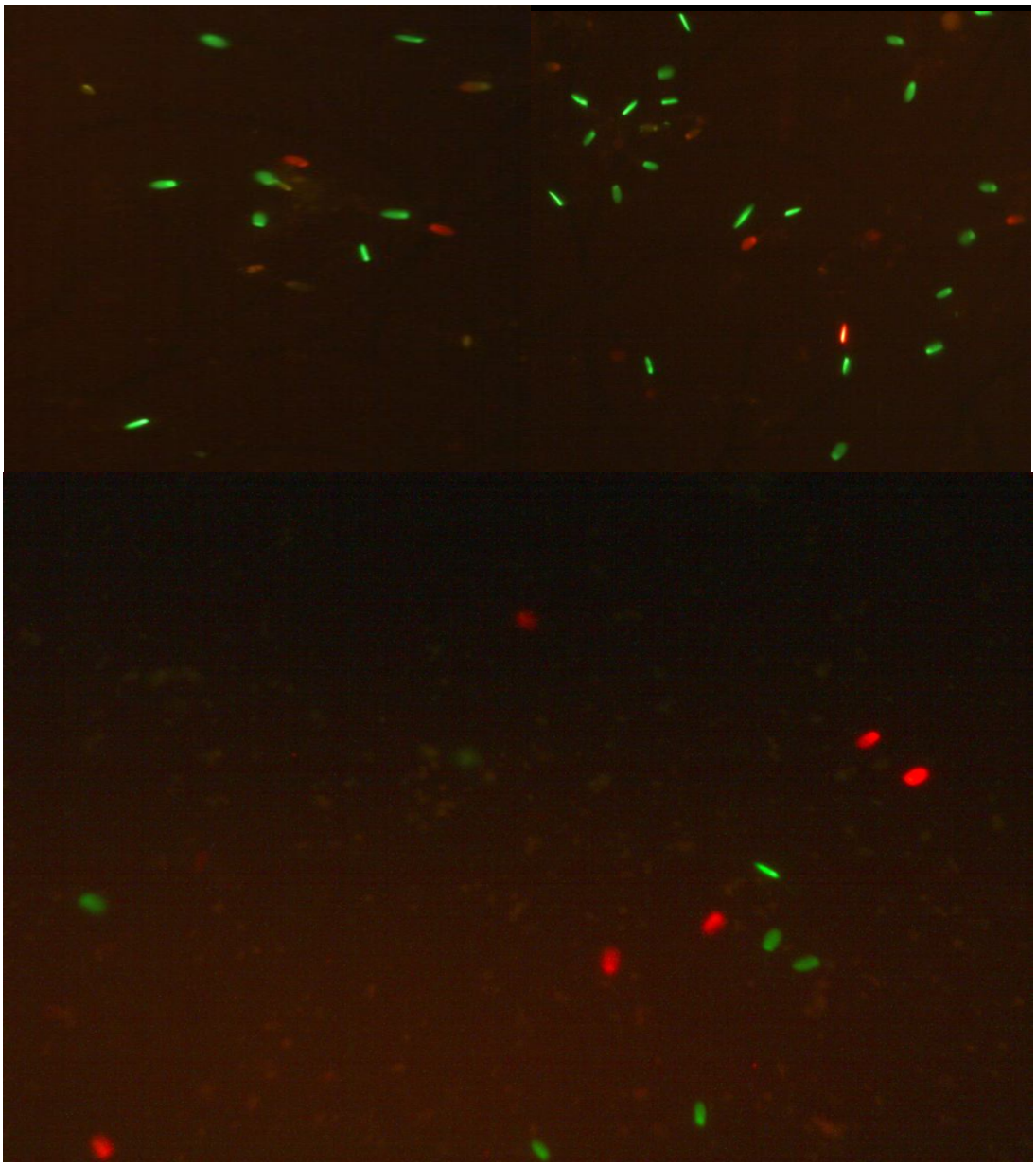
2.12. Floresan Mikroskop ile Canlılık (SYBR-PI), Mitokondriyel Aktivite (JC-1) ve Akrozom Bütünlüğünün (FITCH) Belirlenmesi

2.12.1. Spermatozoa Canlılığının Belirlenmesi

Spermatozoon canlılığının belirlenmesi için SYBR-14/PI (SYBR-14/PI Molecular Probe: L 7011 Invitrogen, Carlsbad, CA) floresan boyaması kullanıldı. Hazırlanan SYBR-14 stok solüsyonu 3'er µl'lik hacimler halinde koyu renkli ependorflara aktarıldı ve -20^{o}C'de dondurulduu.

Sperma analizi için karanlık ortamda PBS ile 1:2 oranında sulandırılmış spermanın 30 mikrolitresi 6 µl SYBR-14/PI ve 2.5 µl PI boyası içeren ependorf üzerine eklenerek 15 dakika süre ile 37°C'de su banyosunda bekletildi ve işlem 10 µl Hancock solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. Ardından boyalı sperma numunesinden 3 µl lam üzerine alınarak üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi.

Değerlendirme floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany) x400 büyütmeli objektif ile en az 200 spermatozoa sayılarak gerçekleştirildi. Baş kısımları açık yeşille boyalı olanlar membranı sağlam (canlı) spermatozoanlar, kırmızı boya alanlar ise membranı hasarlı (ölü) spermatozoanlar olarak belirlendi.



Şekil 2.4. Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranı SYBR/PI boyama tekniğiyle belirlendi. Baş kısmı yeşil floresan veren hücreler, canlı; baş kısmı kırmızı ve kırmızı-yeşil floresan veren hücreler ölü spermatozoon olarak değerlendirildi.

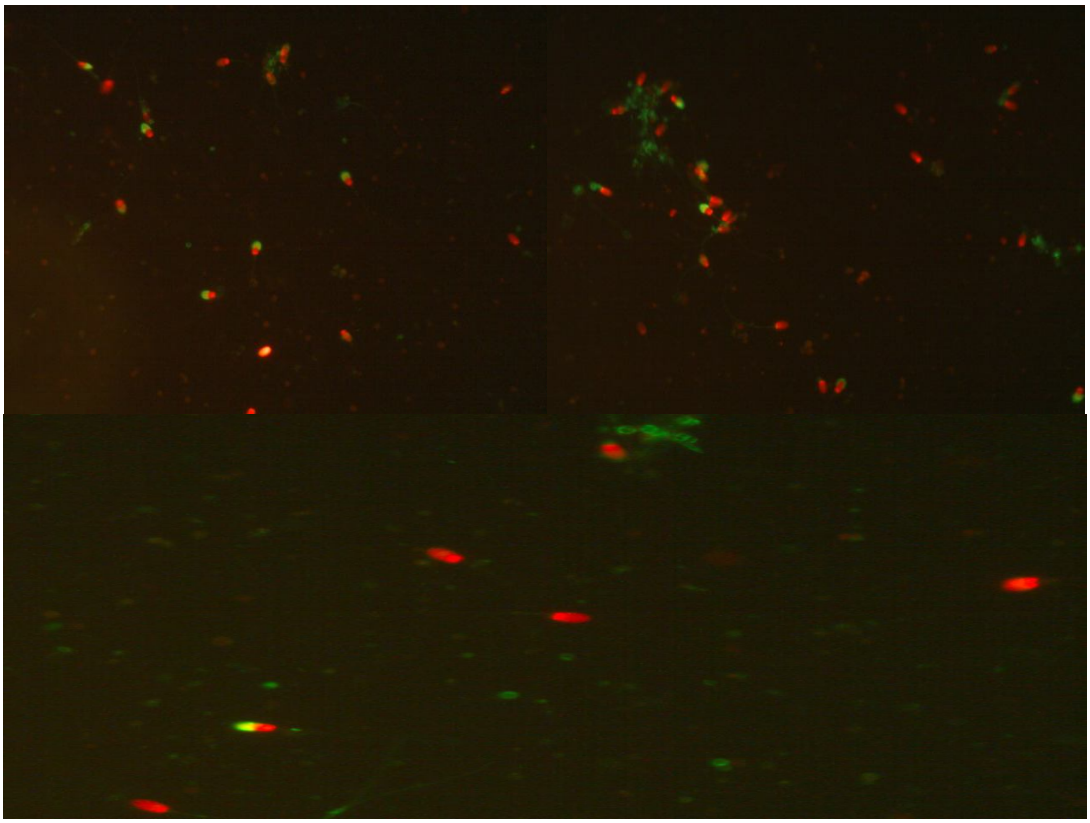
2.12.2. Akrozom Bütünlüğünün Belirlenmesi

Akrozom bütünlüğünün değerlendirmesinde, FITC-PNA/PI floresan boyaması kullanıldı. Stok halinde -20°C'de bekletilen boyalar, kullanıma hazır hale getirilmeleri için 37°C'lik su banyosuna yerleştirildi. Floresan boyaların olumsuz etkilenmemesi için işlem karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Ejekülat PBS ile 1:2 oranında sulandırıldı. PBS ile sulandırılan numunenin 60 µl'si 37°C'lik su banyosuna yerleştirilen ependorfa aktarıldı. Aktarılan sperma

hücrelerine 10 µl lektin ve 2,5 µl PI boyası eklenerek 15 dakika 37^{o}C'ye ayarlanmış etüvde ekilibrasyona bırakıldı. İşlem 10 µl Hancock solüsyonu ilavesi ile tamamlandı.

Değerlendirme, boyalı sperma numunesinden 3 µl lam üzerine alınıp üzeri lamel ile kapatılarak ve floresan mikroksopta x400'lük büyütmede en az 200 spermatozoon hücresi sayılarak yapıldı. Akrozomu yeşil boya alanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoonlar, akrozomu boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoonlar olarak değerlendirildi.



Şekil 2.5. Spermalarda akrozom ve membran bütünlüğü Lectin/PI boyama tekniğiyle belirlendi. Akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler, hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı; akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen ya da kırmızı floresan veren hücreler, sağlam akrozoma sahip olan spermatozoon olarak değerlendirildi.

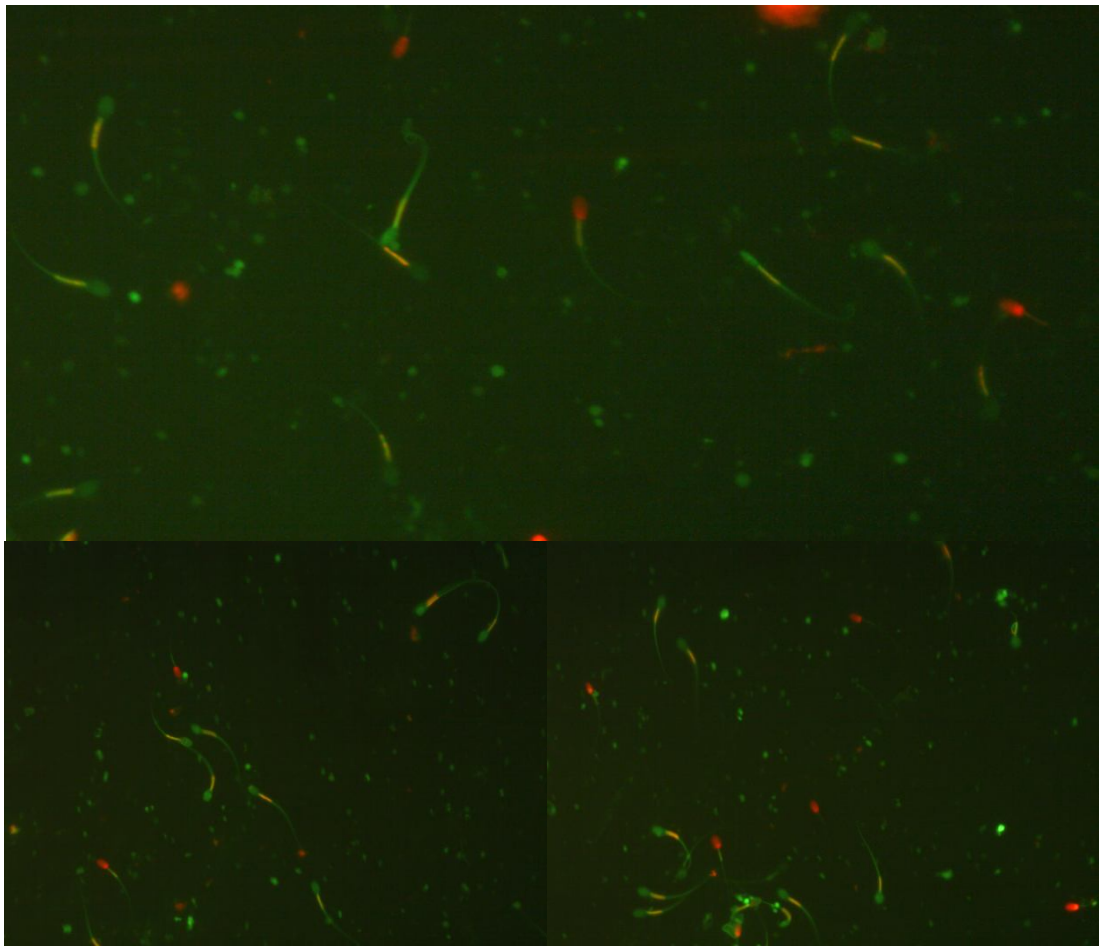
2.12.3. Mitokondriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Mitokondriyel aktivite belirlenmesinde, JC-1/PI floresan boyaması kullanıldı. Boya çözeltisinin hazırlanması amacıyla 2 µl JC-1 boyası alındı (1,53 mM DMSO), 12 µl PI (2,99 mM PI modifiye Tyrode çözeltisi) ve 0,7 µl SYBR-14® 1 ml HEPES/BSA-buffer çözeltisi içerisine aktarıldı. Sonrasında -20°C'de stok halinde

saklanan boyalar 37°C'lik su banyosunda çözdürülerek hazır hale getirildi. Bu işlem floresan boyaların olumsuz etkilenmemesi için karanlık bir odada yapıldı.

Ejekülat 37°C'lik su banyosunda bekletilen PBS ile 1:2 oranında sulandırıldı. PBS ile sulandırılan numunenin 300 µl'si 37°C'lik su banyosunda bekletilen ependorfa aktarıldı. JC-1/PI boyasından 2.5 µl ve PI boyasından 2.5 µl alınarak 300 µl sperma süspansiyonu içerisine eklendi ve 15 dakika süre ile 37°C'de su banyosunda inkube edildi. İnkübasyondan sonra spermatozoonların hareketlerini durdurmak için 10 µl Hancock solüsyonu eklendi. Hazırlanan 2 µl'lik lam-lamel arası örnekte, spermatozoanların mitokondriyel aktivitesi değerlendirildi.

Değerlendirme işlemi, floresan mikroksopta x400'lük büyütmede en az 200 spermatozoon sayılarak gerçekleştirildi. Gövde rengi turuncu olanlar yüksek mitokondriyel aktiviteye sahip, yeşil renkte olanlar mitokondriyel aktiviteye sahip ve renksiz olanlar ise mitokondriyel aktiviteye sahip olmayan spermatozoonlar olarak değerlendirildi.



Şekil 2.6. Spermalarda mitokondriyel aktivite ve membran bütünlüğü JC-1/PI boyama tekniği ile belirlendi. Gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler, yüksek mitokondriyel aktivite gösteren spermatozayı; gövde kısmı yeşil floresan veren hücreler, düşük mitokondriyel aktivite gösteren spermatozayı; gövde kısmı floresan vermeyen hücreler, mitokondriyel aktivite göstermeyen spermatozayı; baş kısmı yeşil floresan veren hücreler, membranı sağlam; baş kısmı kırmızı floresan veren hücreler, membranı hasarlı spermatozoon olarak değerlendirildi.

2.13. Biyokimyasal Ölçümler

2.13.1. Sperma Numunelerinin Hazırlanması

Spermatozoonları ayrımak için sulandırılmış ejakülat 3 kere +4^{o}C de 800 x devirde, 15 dk süre ile santrifüj edildi, dipteki hücreler her seferinde süpernatant kısmı uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı ve işlem bitiminde PBS ile 0,5 ml'ye tamamlandı. Homojenizasyon için sperm süspansiyonu buzlu su içerisindeki 2 ml'lik hazne içerisine konuldu ve soğuk ortamda 10 sn süreli sonikasyon (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic HeinrichstraBe, D-12207, Gerate-Typ:UW 2070, Pro-Nr. 51900037369.004, Berlin) uygulandı. Her uygulamanın sonunda örnekler 30 sn buz içerisinde bekletilmek suretiyle 5 kez işlem tekrarlandı. Lipit peroksidasyon

(LPO) analizi için 120 µl homojenat alınıp üzerine 10 µl 0,5 mM BHT (bütil hidroksi toluen) ilave edildi, tGSH analizi için ise homojenattan 50 µL kullanıldı ve geriye kalan homojenat 12000 x devirde +4^{o}C de 15 dakika santrifüj edilip süpernatantlar ayrımlandı. Total antioksidan kapasite ölçümü için 20 µl süpernatant kullanıldı. Tüm örnekler analizler yapılıncaya kadar -86^{0}C'de saklandı.

2.13.2. Lipit Peroksidasyonu (LPO)

Lipit peroksidasyon ürünleri düzeyleri ticari LPO-586^{TM} Oxis Research (OxisResearch^{TM}, Bioxytech, USA) kiti ile belirlendi. Ölçüm için 120 µl homojenat üzerine 650 µl asetonitril içerisinde N-metil-2-fenilindol eklendi ve vortexle karıştırıldı. Sonrasında 150 µl metansülfonik asit eklendi ve tekrar karıştırılıp 45^{0}C'de 60 dakika inkübe edildi. Son olarak 15000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Sonuçlar temiz bir tüpe aktarılan süpernatant ile spektrofotometrik olarak (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) 586 nm' de ölçüldü.

2.13.3. Total Glutasyon (tGSH) Düzeyinin Analizi

Total Glutasyon düzeyleri GSH-420^{R} Oxis Research kiti (OxisResearch^{R}, Bioxytech, USA) kullanılarak ölçüldü. Homojenat üzerine 1/20 oranında çöktürücü madde (trikloroasetik asit) eklendi ve +4^{o}C de 10 dakika 3000 x devirde santrifüj edilip süpernatant kısmı ayrıldı. Süpernatant üzerine sırasıyla 200 µl buffer (potasyum fosfat, dietilentriaminpentaasetik asit, Lubrol, pH 7.8), 200 µl indirgeyici ajan (HCI içerisinde tris fosfin), 200 µl kromojen (HCl içerisinde 1-Methyl-4-chloro-7-trifluoromethylquinolinium methylsulfate) ve 200 µl renk geliştirici (NaOH) sırasıyla eklendi. Sonrasında karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Total GSH düzeyi, spektrofotometre ile 420 nm' de ölçüldü.

2.13.4. Total Antioksidan Kapasite Analizi

Ölçüm için SIGMA Antioxidant Assay Kit (CS0790) ve ELISA yöntemi kullanıldı. Standardizasyon için ilk 6 pleyte 10 µl troloks standardı ve 20 µl myoglobin çalışma solüsyonu konuldu. Diğer pleytlere 10 µl süpernatant ve 20 µl myoglobin çalışma solüsyonu konuldu. Her bir pleyte 150 µl ABTS eklendi ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Son olarak 100'er ml stop solüsyonu ilave edildi

ve karıştırıldı. Değerledirme işlemi 405 nm dalga boyunda pleyt okuyucusunda yapıldı.

2.14. Testis Dokusunun Biyokimyasal Ölçümler İçin Hazırlanması

Tüm hayvanlarda ölçümler için sol testisler kullanıldı. Testislerin tamamında aynı bölgesinden 0,2 g doku kesilerek eppendorf tüplere yerleştirildi. Tüpler 0,8 ml PBS eklenerek (5 kat sulandırıldı) 1 ml'ye tamamlandı.

Testis dokusu öncelikle soğuk ortamda mekanik homojenizatörle (Sartorius Potter S 37070) 1500 devirde 3 dk homojenize edildi ve dokunun yeterince parçalanması sağlandı.



Şekil 2.7. Spermatozoonların parçalanmasında kullanılan sonikasyon cihazı.

Mekanik homojenizasyon sonrasında parçalanan dokulara 10 sn süre ile soğutmalı sonikasyon işlemi uygulandı ve hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Sonikasyon işlemi 5 kez tekrar edildi.

Sonikasyon işlemi sonrası hazırlanan homojenat ve süpernatant spermatozoanlarda uygulanan yöntem ve miktar ile aynı şekilde hazırlanıp değerlendirildi.

2.15. Tavşanların Çiftleştirilmesi

Çalışmada deney gruplarındaki erkek tavşanların her birinin kafesine birer adet dişi hayvan bırakılarak beş gün süre ile çiftleşmeleri sağlandı.



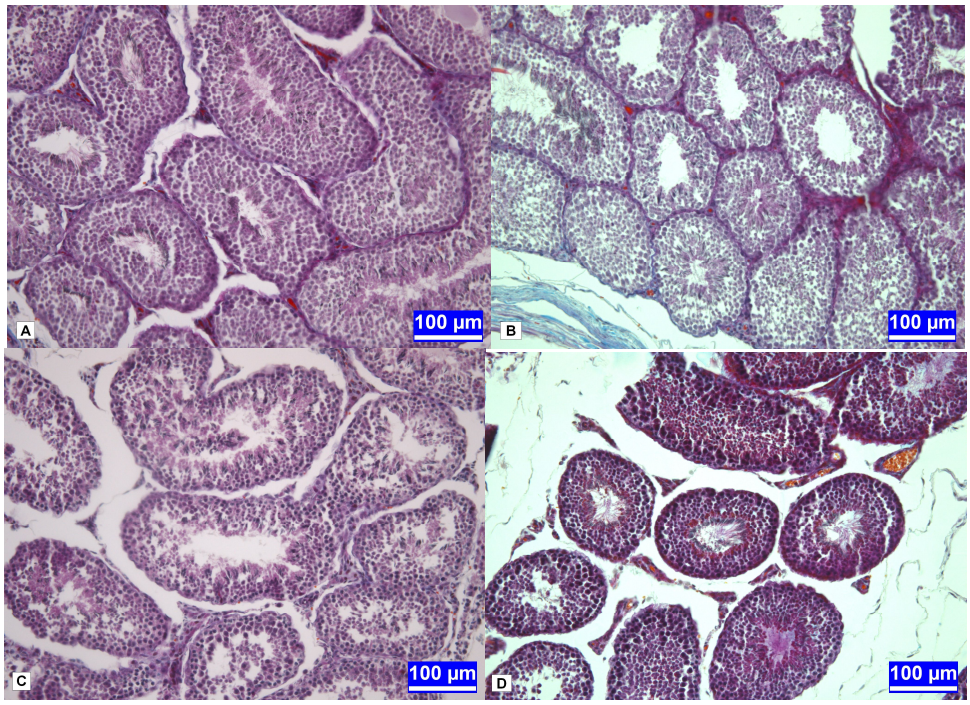
Şekil 2.8. Erkek ve dişi tavşanların kafeslerde çiftleştirilmesi.

2.16. Histolojik Yöntemler

Hayvanlar 11 haftanın sonunda tartılıp kesildikten sonra sağ ve sol testisleri çıkartıldı. Doku örnekleri alınarak histolojik (seminifer tubullerin çapı, testisin genel histolojik yapısı ve hücrelerdeki değişiklikler) yönden değerlendirme yapıldı.

Tüm testislerin aynı yön ve bölgesinden alınan doku örnekleri trimming yapılıp en az 24 saat süreyle nötral tamponlu formalin ile tespit edildi. Sonra doku takip cihazına yerleştirilip blokaj işlemi gerçekleştirildi. Alınan kesitler üçlü boyama metoduyla boyandı. Hazırlanan preparatlarda seminifer tubullerin çaplarını ölçmek amacıyla Leica DFC 320 model kamera ile resimler çekilerek kaydedildi. Resimlerde IM 50 (Leica, Switzerland) paket programı kullanılarak tubul çapları ölçüldü.

Bu amaçla her bir hayvandan alınan beşer seri kesitin rastgele seçilmiş onar bölgesinin resmi çekilerek kaydedildi. Çekilen her bir resimden de onar adet tubulün çapı ölçüldü.



Şekil 2.9. Testis kesitleri. Üçlü boyama. Kontrol (A), resveratrol (B), paklitaksel (C), paklitaksel+resveratrol (D).

2.17. İstatistiksel Analiz

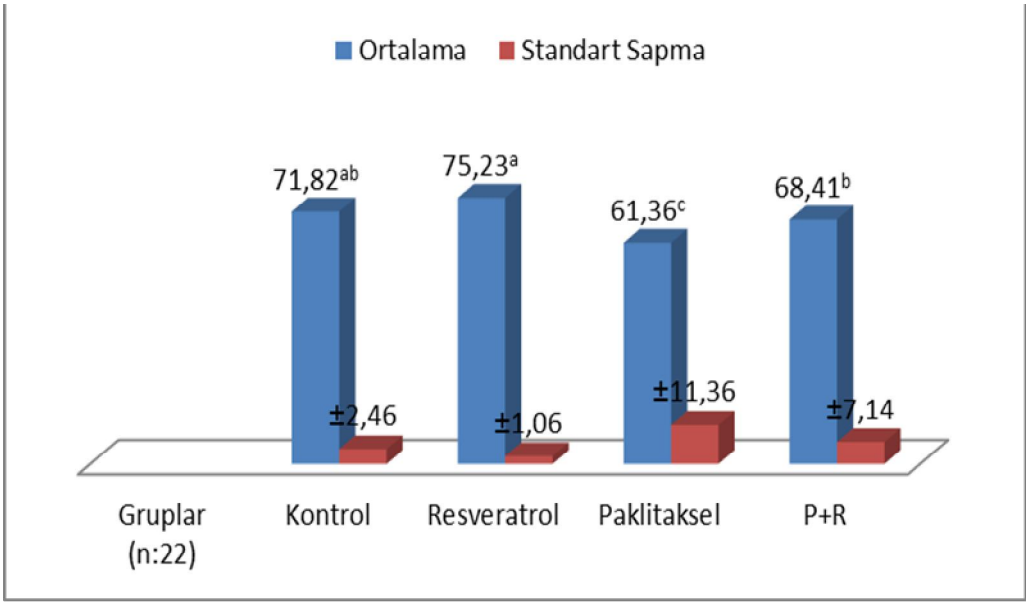
İstatistiksel analiz için IBM SPSS 21 kullanıldı. Analizde motilite, yoğunluk, ölü-canlı, akrozom bütünlüğü, mitokondriyel aktivite ve spermanın biyokimyasal analizleri haftalara göre değerlendirildi. Grupların ortalama değerlerini bulmak için varyans analizi (ANOVA), aralarında önemli farklılık bulunan grubu karşılaştırmak için de çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testi kullanıldı. Farklılığın $P<0.05$ düzeyde olması anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda şekiller halinde sunuldu.

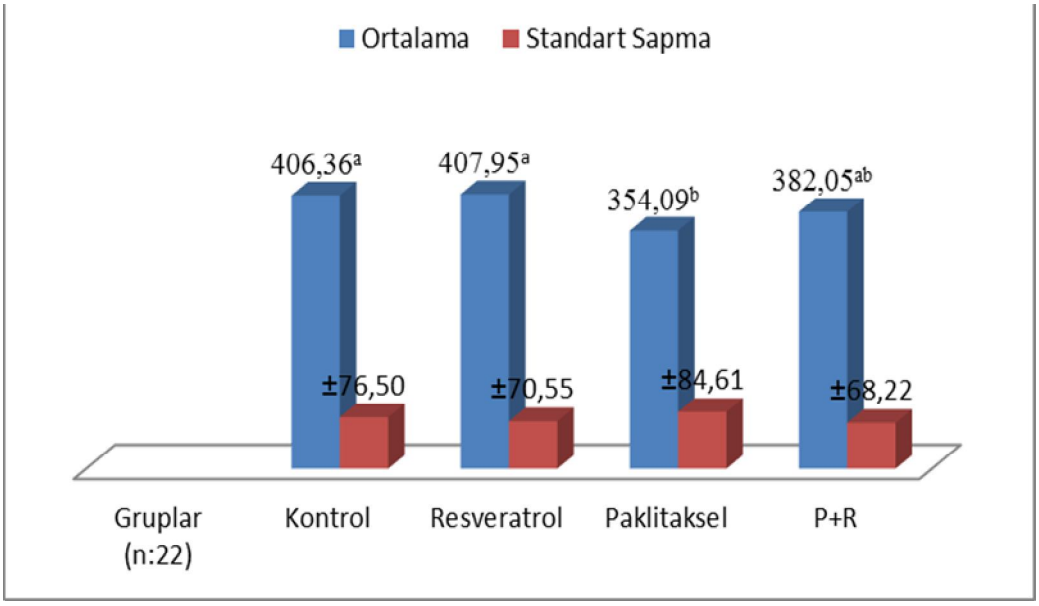
3.1. Motilite ve Yoğunluk Değerleri

Sunulan çalışmada kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonu motilite oranları (%) sırasıyla 71,82±2,46; 75,23±1,06; 61,36±11,36 ve 68,41±7,14 sperma yoğunlukları (x10^6) 406,36±76,50; 407,95± 70,55; 354,09 ± 84,61 ve 382,05 ± 68,22 olarak tespit edildi.



Şekil 3.1. Motilite (%) değerlerine ait bulgular.

Motilite (Şekil 3.1) değerleri açısından kontrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel ve resveratrol ile paklitaksel+resveratrol; yoğunluk (Şekil 3.2) değerleri açısından kontrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel grupları arasında istatistiksel farklılık önemli ($P<0.05$) olarak belirlendi.

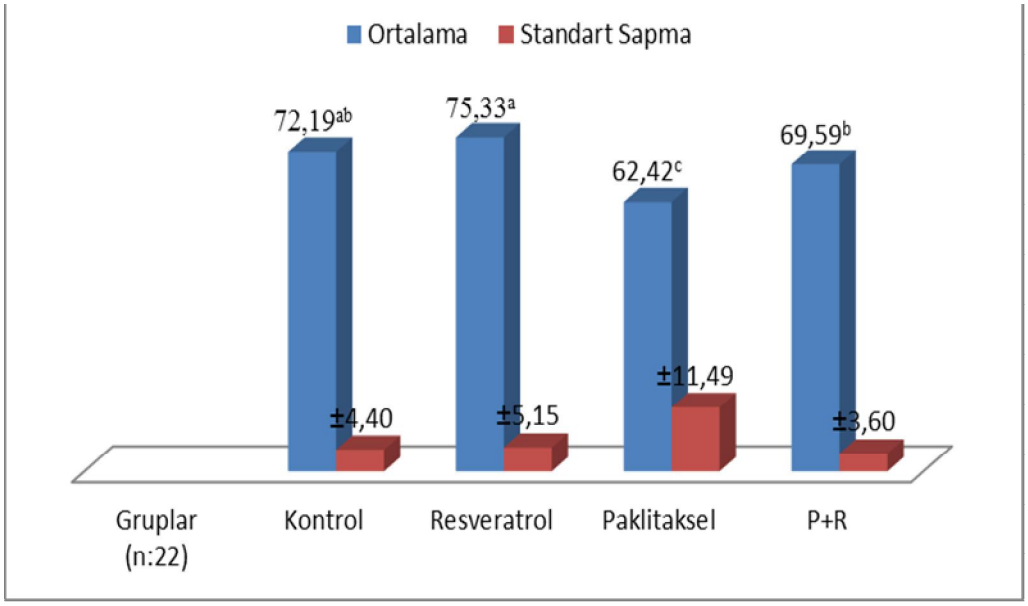


Şekil 3.2. Sperma yoğunluklarının karşılaştırılması ($x10^6$).

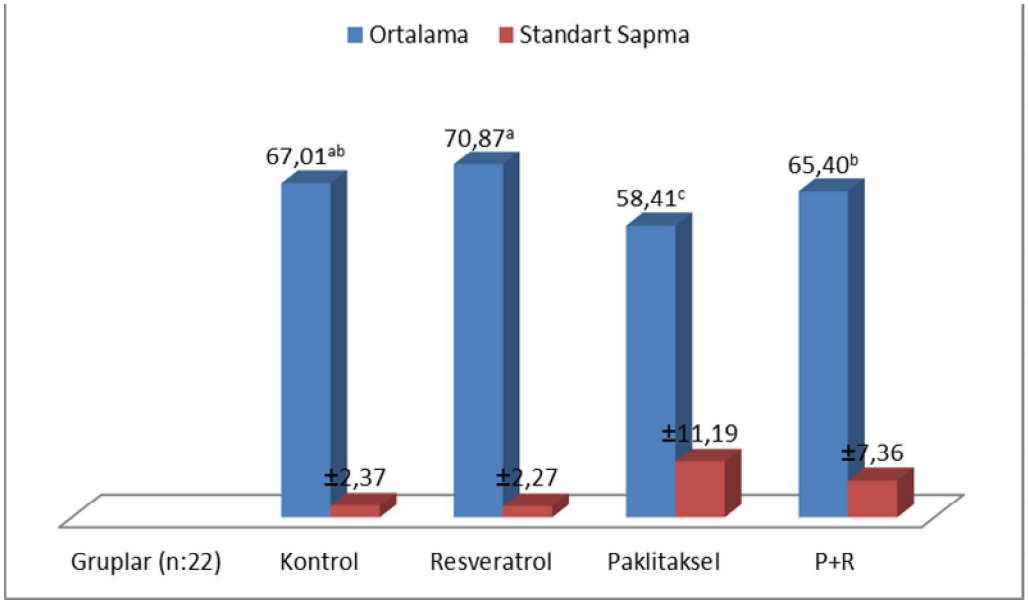
3.2. Spermatozoa Canlılığı (SYBR-PI), Akrozom Bütünlüğü (FITCH) ve Mitokondriyel Aktivite (JC-1) Değerleri

Kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonu spermatozoa canlılık oranları (%) sırasıyla 72,19±4,40; 75,33±5,15; 62,42±11,49 ve 69,59±3,60 akrozomu sağlam spermatozoa oranları (%) 67,01±2,37; 70,87±2,27; 58,41±11,19 ve 65,40±7,36 mitokondriyel aktivite oranları (%)73,27±1,80; 74,50±1,54; 70,08±5,32 ve 72,57±1,87 olarak tespit edildi.

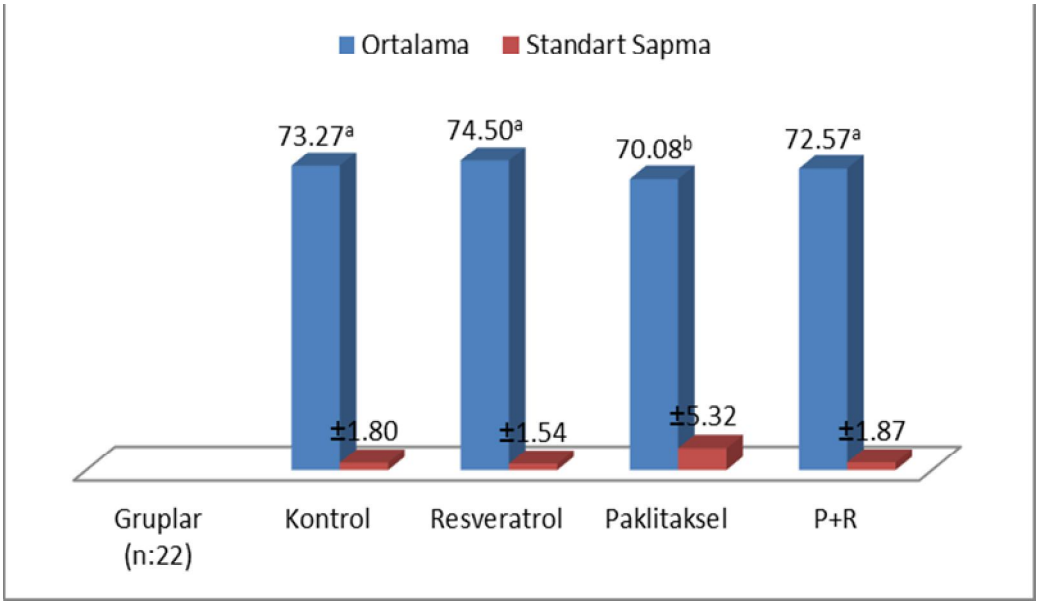
Spermatozoa canlılığı oranları (Şekil 3.3) açısından kontrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel+resveratrol ve paklitaksel ile paklitaksel+resveratrol; akrozom bütünlüğü oranları (Şekil 3.4) açısından kontrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel+resveratrol, paklitaksel ile paklitaksel+resveratrol; mitokondriyel aktivite değerleri (Şekil 3.5) açısından kontrol ile paklitaksel, resveratrol ile paklitaksel ve paklitaksel ile paklitaksel+resveratrol grupları arasında önemli ($P<0.05$) istatistiksel farklılık belirlendi.



Şekil 3.3. Spermatozoa canlılığının karşılaştırılması (%).



Şekil 3.4. Akrozom bütünlüğü oranlarının karşılaştırılması (%).

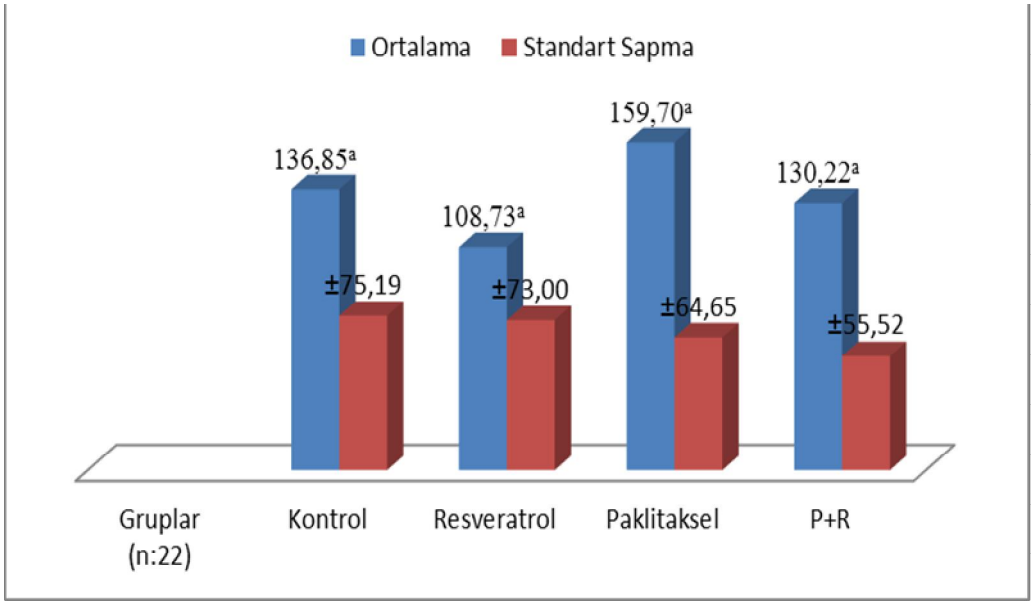


Şekil 3.5. Mitokondriyel aktivite oranlarının karşılaştırılması (%).

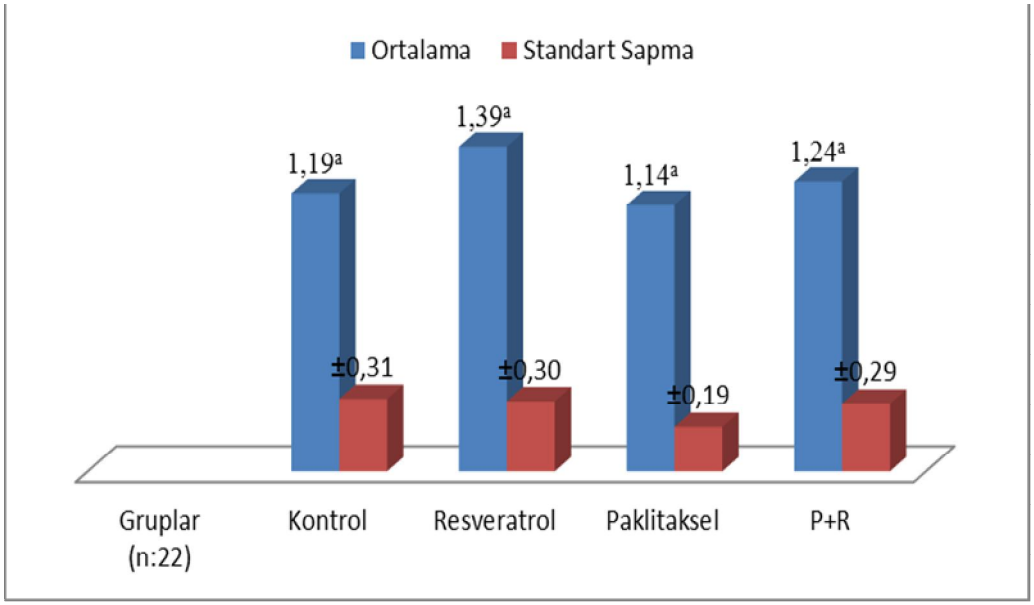
3.3.Spermatozoa Hücrelerinde Lipit Peroksidasyon(LPO), Total Glutasyon(tGSH) ve Total Antioksidan Kapasite Değerleri

Kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonu spermatozoa LPO oranları (µMx10^9 spz) sırasıyla 136,85±75,19; 108,73 ±73,00; 159,70±64,65 ve 130,22±55,52; tGSH oranları (µMx10^9spz) 1,19±0,31; 1,39± 0,30; 1,14±0,19 ve 1,24±0,29; total antioksidan kapasite oranları (mMx10^9spz) 127,59±32,64; 167,68±57,23; 142,98±28,42 ve 151,02±48,71 olarak tespit edildi.

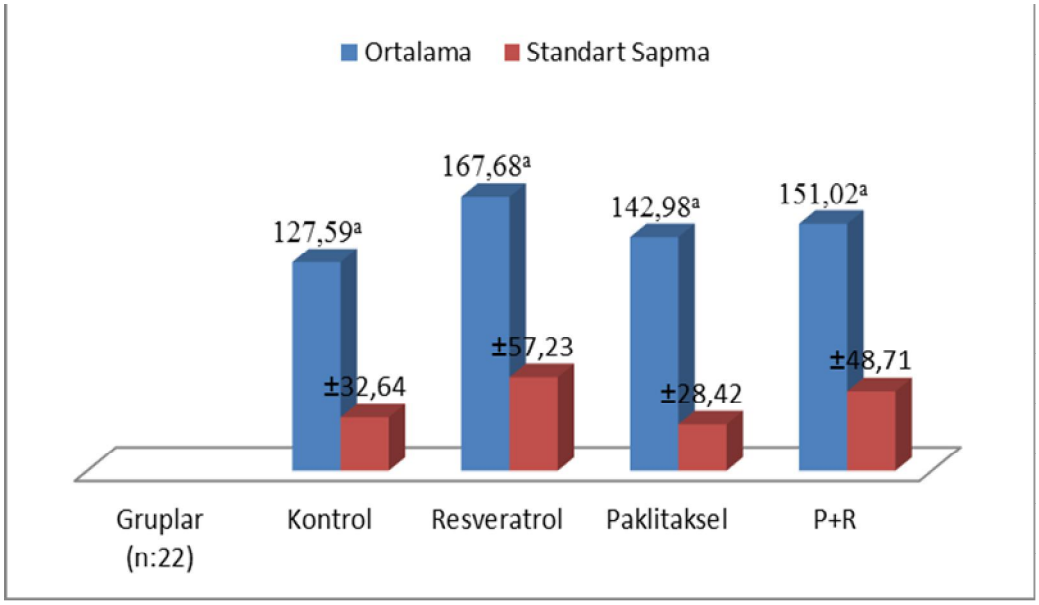
Lipit peroksidasyon (Şekil 3.6), total glutasyon (Şekil 3.7) ve total antioksidan kapasite (Şekil 3.8) oranları açısından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel farklılık ($P>0.05$) elde edilmedi.



Şekil 3.6. Lipit peroksidasyon değerleri (10^9spz).



Şekil 3.7.Total glutasyon seviyeleri (10^9spz).

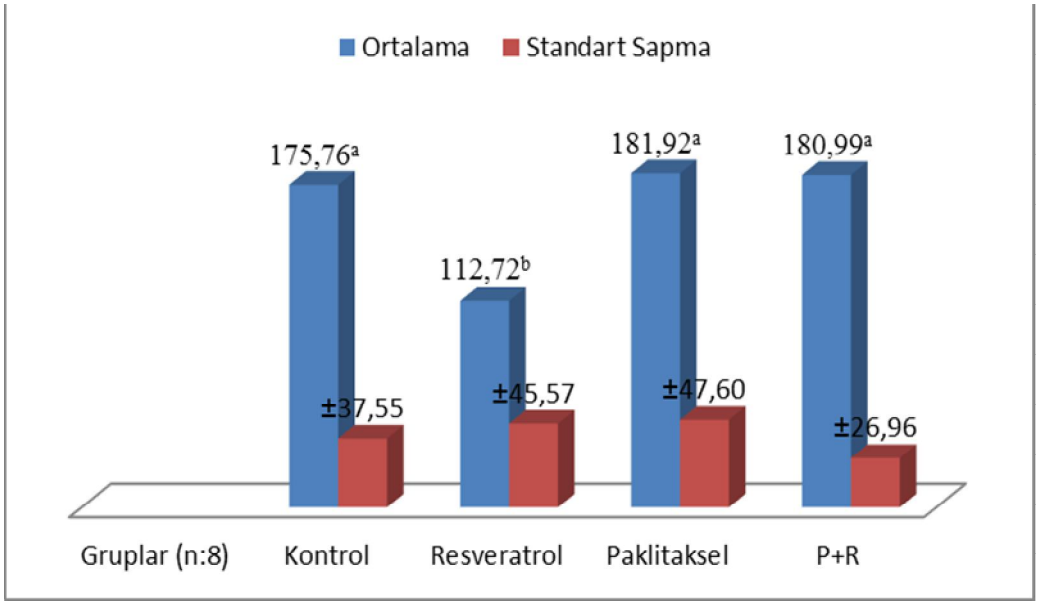


Şekil 3.8. Total antioksidan kapasite değerleri (10^9spz).

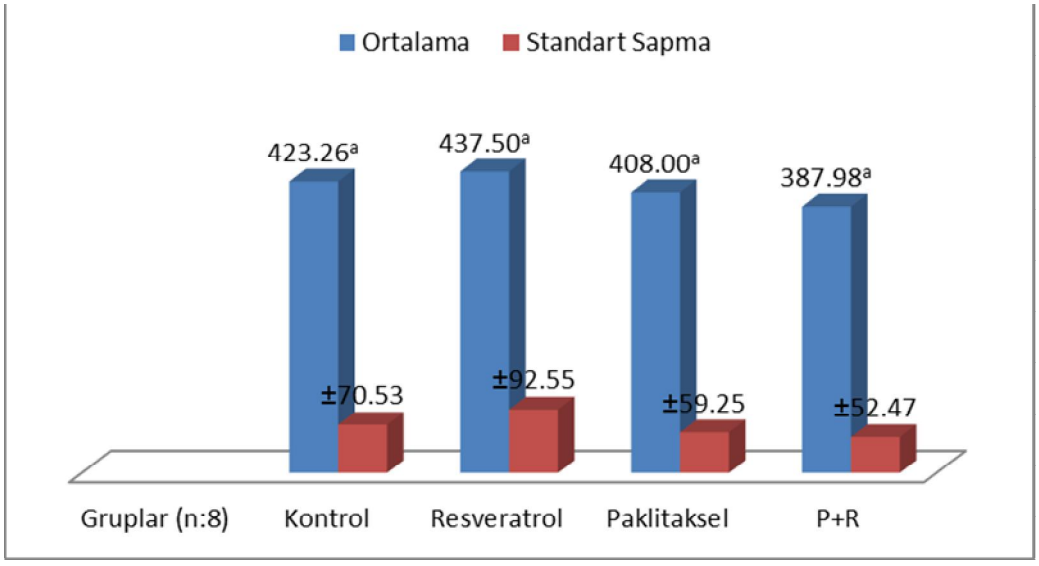
3.4. Testis Dokusunda Lipit Peroksidasyon(LPO), Total Glutasyon (tGSH) ve Total Antioksidan Kapasite Değerleri

Kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonu testis dokusu LPO oranları (mikromol/g doku) sırasıyla 175,76±37,55; 112,72±45,57; 181,92±47,60 ve 180,99±26,96; tGSH oranları (mikromol/g doku) 423,26±70,53; 437,50±92,55; 408,00±59,25 ve 387,98±52,47; total antioksidan kapasite oranları (milimol/g doku) 0,35±0,41; 0,16±0,29; 0,09±0,25; 0,09±0,24 olarak tespit edildi.

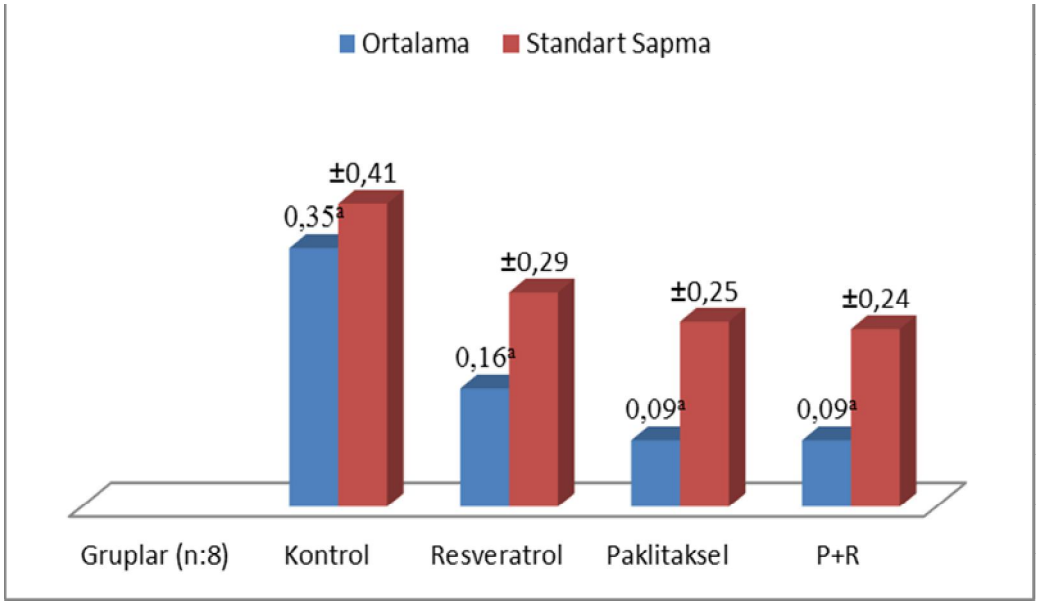
Testis dokusu LPO oranları (Şekil 3.9) açısından kontrol ile resveratrol, paklitaksel ile resveratrol ve paklitaksel+resveratrol ile resveratrol grupları arasında önemli ($P<0.05$) istatistiksel farklılıklar elde edilirken tGSH (Şekil 3.10) ve total antioksidan kapasite oranları (Şekil 3.11) açısından önemli ($P>0.05$) istatistiksel farklılıklar elde edilmedi.



Şekil 3.9. Lipit peroksidasyon değerleri (mikromol/g doku).



Şekil 3.10. Total glutasyon (tGSH) değerleri (mikromol/g doku).

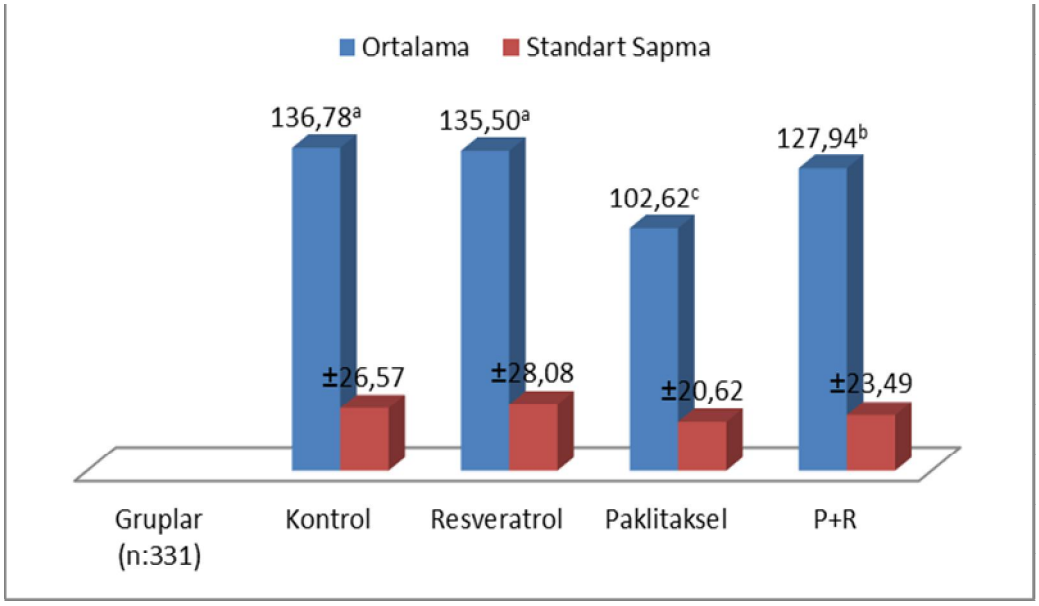


Şekil 3.11. Total antioksidan kapasite değerleri (milimol/g doku).

3.5. Seminifer Tubul Çapı Değerleri

Kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının testis dokularına ait seminifer tubul çapları (µm) sırasıyla 136,78±26,57; 135,50±28,08; 102,62±20,62 ve 127,94±23,49 olarak tespit edildi.

Seminifer tubul çapları ölçümü değerleri açısından (Şekil 3.12) kontrol ile paklitaksel, kontrol ile paklitaksel+resveratrol, resveratrol ile paklitaksel resveratrol ile paklitaksel+resveratrol ve paklitaksel ile paklitaksel+resveratrol grupları açısından önemli ($P<0.05$) istatistiksel farklılıklar elde edilirken diğer gruplar arasında herhangi bir farklılık belirlenmedi ($P>0.05$).

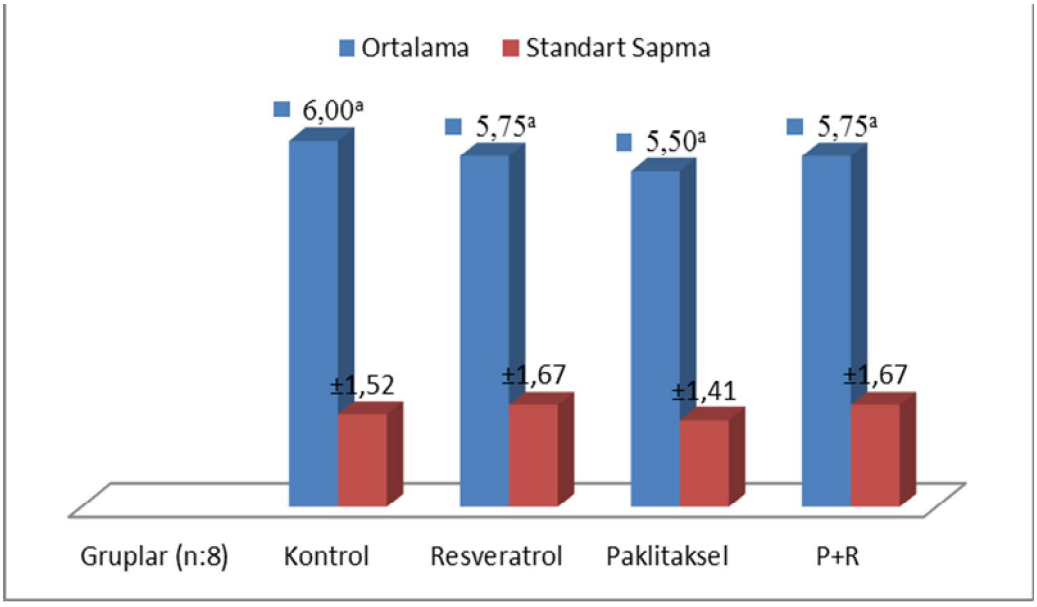


Şekil 3.12. Seminifer tubul çapı ölçümleri (µm).

3.6. Gebelik ve Doğan Yavru Sayılarının Karşılaştırılması

Kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarındaki hayvanların çiftleştirilmesi sonucunda (%) gebelik oranları sırasıyla 87,50; 87,50; 75,00; 87,50; doğan yavru sayıları 6,00±1,52; 5,75±1,67; 5,50±1,41 ve 5,75±1,67 olarak tespit edildi.

Kontrol ve diğer gruplar arasında doğan yavru sayıları açısından istatistiksel farklılık (P>0.05) elde edilmedi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Doğan yavru sayılarının karşılaştırılması.



Şekil 3.14. Çalışma sonunda doğan yavrular.

4. TARTIŞMA

Sitotoksik kemoterapi bir çok kanser çeşidinin tedavisinde etkili bir yöntem olmasına rağmen organizmada çok sayıda yan etkilere yol açmaktadır. Kemoterapötik ilaçların meydana getirdiği en önemli yan etkilerden biri de infertilitedir. Bu ilaçlar hem kanserli hemde sağlıklı deney hayvanlarında aynı etkileri göstermektedir (Türk 2013).

Sunulan tez çalışmasında, tavşanlarda antikanser ilaç (paklitaksel) uygulamalarının tavşan sperması, testis dokusu ve fertilite sonuçları üzerine etkileri değerlendirildi. Çalışmada ayrıca oluşan bu etkiler üzerine antioksidan madde (resveratrol) uygulamasının koruyucu etkisi olup olmadığı araştırıldı. Elde edilen veriler, hem daha önce paklitaksel ve resveratrol kullanımı sonucu elde edilen verilerle hem de aynı amaçla kullanılan diğer antikanser ilaç ve antioksidan madde kullanım sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Sunulan tez çalışmasında, kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonrası ortalama motil spermatozoon oranları (%) sırasıyla 71,82±2,46; 75,23±1,06; 61,36±11,36 ve 68,41±7,14 olarak tespit edildi (Şekil 3.1).

Resveratrol'ün insan ve rat sperması üzerine etkilerini inceleyen Collodel ve ark (2011) 6 µM, 15 µM ve 30 µM dozunda resveratrol uygulamalarının sperma motilitesi üzerine olumlu etkiye sahip olduğunu ayrıca resveratrol'ün spermatositler üzerine spermatidlerden daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ourique ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmada hipertiroidili ratlara 10 mg/kg dozunda uygulanan resveratrol'ün motiliteyi arttırıp, anormal spermatozoon oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda alınan motilite sonuçları tez çalışması ile benzerlik göstermektedir. Silva ve ark (2012) sperma sulandırıcısına 0; 5; 10; 15 ve 20 µg/ml resveratrol ekledikleri çalışmalarında elde ettikleri progresif motilite sonuçlarını (%) sırasıyla 50; 50; 52,5; 50,8 ve 49,2 olarak saptamışlardır. Bucak ve ark (2014)'nın boğa sperma sulandırıcısına ekledikleri resveratrol ile yapmış oldukları çalışmada kontrol ve resveratrol gruplarının motilite oranları sırasıyla %50,7 ve %61,9 olarak belirlenmiştir. Sunulan tez çalışmasında Silva ve ark (2012)' nın yapmış oldukları çalışmada uygulanan 10 µg/ml dozunda resveratrol ve Bucak ve

ark (2014) yapmış oldukları çalışmada kullandıkları 1 mM dozunda resveratrol ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Buna karşın Bucak ve ark (2014) çalışmasında olduğu gibi kontrol ve resveratrol grupları arasında istatistiksel bir farklılık tespit edilmemiştir. Farklılıkların kullanılan sulandırıcının kimyasal kompozisyonu ve spermanın sulandırma işlemine karşı gösterdiği duyarlılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında paklitaksel uygulaması sperma motilitesini kontrol grubuna kıyasla istatistiksel farklılık oluşturacak şekilde düşürmüştür. Bir mikrotubül inhibitörü olan paklitakselin gonadotoksik etkilerini araştıran Koehler-Samouilidou ve ark (2001) çalışmalarında; Wistar ratlarına intraperitoneal yolla 12,4 mg/kg dozunda paklitaksel uygulaması yapmışlardır. Uygulamaya 11 hafta süresince haftada tek uygulama şeklinde devam etmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda motilite değerlerini paklitaksel ve kontrol grubunda sırasıyla %44,51±8,64, %54,01±4,29 olarak belirlemişlerdir. Koehler-Samouilidou ve ark (2001) çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar sunulan tez çalışması ile benzerlik göstermektedir. Ratlarda taksol uygulamasının sperma kalitesi üzerine etkilerini araştıran Delkhoshe-Kasmaie ve ark (2013) yapmış oldukları çalışmada; 7,5 mg/kg dozunda uyguladıkları taksolün sperma kalitesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmacılar motilite oranlarını (%) sırasıyla kontrol ve taksol gruplarında 81,9±7,1; 52,9±3,7 olarak belirlemişlerdir. Sunulan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Sunulan tez çalışmasında, kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonrası ortalama ml'deki sperma yoğunlukları ($x10^6$/ml) sırasıyla 406,36±76,50; 407,95±70,55; 354,09±84,61 ve 382,05±68,22 olarak saptandı (Şekil 3.2). Ratlara 90 gün süreyle oral yolla resveratrol uygulaması yapan Juan ve ark (2005) çalışmada kontrol ve resveratrol grupları sperma yoğunluklarını ($x10^6$/ml) sırasıyla 14,1±0,80 ve 24,8±3,30 olarak belirlemişlerdir. Delkhoshe-Kasmaie ve ark (2013) yapmış oldukları çalışmada kontrol ve taksol gruplarının yoğunluğunu ($x10^6$) sırasıyla 105,2±9,2 ve 46,3±3,8 olarak tespit etmiş ve taksol uygulamalarının yoğunluğu düşürdüğünü vurgulamışlardır. Çalışmalarda ifade edilen yoğunluk değerleri sunulan tez çalışmasındaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Shin ve ark (2008) yaptıkları

çalışmada trans-resveratrol'ün spermatozoa motilitesi ve yoğunluğu üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda trans-resveratrol'ün epididimal spermatozoa motilitesi ve sperma yoğunluğunu yükselttiğini ifade etmektedirler. Sunulan tez çalışmasında resveratrol grubunda elde edilen motilite değeri ve sperma yoğunluğu ile bu çalışmada elde edilen epididimal sperma sonuçları benzerlik göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonrası ortalama spermatozoa canlılık oranları (%) sırasıyla 72,19±4,40; 75,33±5,15; 62,42±11,49 ve 69,59±3,60 (Şekil 3.3); akrozom bütünlüğü oranları (%) 67,01±2,37; 70,87±2,27; 58,41±11,19 ve 65,40±7,36 (Şekil 3.4); mitokondriyel aktivite oranları (%)73,27±1,80; 74,50±1,54; 70,08±5,32 ve 72,57±1,87 (Şekil 3.5) olarak tespit edildi.

Silva ve ark (2012) sperma sulandırıcısına sırasıyla 0; 5; 10; 15; ve 20 µg/ml dozunda resveratrol eklediklerini ve mitokondriyel aktivite oranlarını (%) 36,7; 27,1; 27,1; 31,9 ve 22,3; akrozomu sağlam spermatozoa oranları oranlarını (%) ise 61,4; 61; 65,9; 64,2 ve 65 olarak tespit ettiklerini ifade etmektedirler. Bucak ve ark (2014)' nın boğa sperma sulandırıcısına ekledikleri resveratrol ile yapmış oldukları çalışmada kontrol ve resveratrol gruplarının sırasıyla spermatozoon canlılık oranları %31,7 ve %40,3; akrozom bütünlüğü %42,2 ve %47,26; mitokondriyel aktivite sonuçları %11,8; %30,1 olarak bulunmuştur. Delkhoshe-Kasmaie ve ark (2013) taksol uygulamasının sperma canlılığı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında; kontrol ve taksol gruplarındaki spermatozoon canlılık oranlarını sırasıyla %86,8±8,4 ve %42,6±6,3 olarak belirlemişler ve taksol'ün sperma canlılık oranları üzerine olumsuz etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır. Sunulan tez çalışmasında Delkhoshe-Kasmaie ve ark (2013), Silva ve ark (2012) ve Bucak ve ark (2014)'nın bulgularına benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Giaretta ve ark (2014) aygır spermasının kısa süreli saklanması amacıyla yapmış oldukları çalışmada; resveratrol'ün 4 farklı dozunu (10, 20; 40 ve 80 µM) kontrol grubuyla karşılaştırmışlar ve kontrol grubunda resveratrol grubuna kıyasla motilite, SYBR-PI, FITCH-PI ve JC-1-PI oranlarında daha iyi sonuç elde ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda ulaşılan değerler tez çalışması ile farklılık göstermektedir. Farklılıkların çalışmalarda kullandıkları antioksidan madde

oranları, uygulama yöntemleri ve spermanın sulandırma işlemine karşı gösterdiği bireysel duyarlılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışmaında kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonrası ortalama spermatozoa LPO oranları ($x10^9$ spz) sırasıyla 136,85±75,19; 108,73±73,00; 159,70±64,65 ve 130,22±55,52 (Şekil 3.6); tGSH oranları ($x10^9$ spz) 1,19±0,31; 1,39±0,30; 1,14±0,19 ve 1,24±0,29 (Şekil 3.7); total antioksidan kapasite oranları ($x10^9$ spz) 127,59±32,64; 167,68±57,23; 142,98±28,42 ve 151,02±48,71 (Şekil 3.8) olarak saptandı.

Kasdallah-Grissa ve ark (2006) yaptıkları çalışmada resveratrol'ün lipit peroksidasyonunu engellediğini ve MDA değerlerini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Resveratrol'ün spermatozoonlar üzerine etkilerini inceleyen Collodel ve ark (2011); 15 μM dozunda uygulanan resveratrol'ün LPO seviyesini düşürdüğünü, 6 μM dozunda ise etkisiz kaldığını belirlemişlerdir. Garcez ve ark (2010); insan spermasında farklı dozlarda uyguladıkları resveratrol'ün (0,1; 1; 10 mM) tüm dozlarda spermayı çözüm sonrası lipoperoksidasyona karşı koruduğunu saptamışlardır. Ourique ve ark (2012); hipertiroidili ve sağlıklı ratlara 1 ve 10 mg/kg dozunda uyguladıkları resveratrol'ün hipertiroidili ratlarda LPO oranını düşürdüğünü sağlıklı ratlarda ise etkisiz kaldığını ifade etmektedirler. Sunulan tez çalışmasında da Collodel ve ark (2011) ve Garcez ve ark (2010)'na benzer sonuçlara ulaşılırken; Ourique ve ark (2012) hipertiroidili ratlarda aldıkları sonuçlar benzer olmasına rağmen sağlıklı ratlarda alınan sonuçlar tez çalışmasından farklılık göstermiştir. Sağlıklı ratlarda gözlenen bu farklılığın kullanılan doz ve süreye bağlı olarak oluşabileceği düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışmaında kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının çalışma sonrası ortalama testis dokusu LPO oranları (mikromol/g doku) sırasıyla 175,76±37,55; 112,72±45,57; 181,92±47,60 ve 180,99±26,96; tGSH oranları (mikromol/g doku) 423,26±7053; 437,50±92,55; 408,00±59,25 ve 387,98±52,47; total antioksidan kapasite oranları (milimol/g) 0,35±0,41; 0,16±0,29; 0,09±0,25 ve 0,09±0,24 olarak saptandı.

Uguralp ve ark (2005) ratlarda testiküler iskemi oluşturup resveratrol'ün tedavi etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında grupların MDA seviyelerinin düştüğünü, GSH seviyesinin ise yükseldiğini belirtmişlerdir. Arı sütünün taksol uygulamasına karşı ratlarda testis dokusunu koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada Delkhoshe-Kasmaie ve ark (2013) taksol'ün sebep olduğu histopatolojik ve biyokimyasal değişimlere karşı arı sütünün koruyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu etkinin arı sütünün antioksidan kapasitesinden kaynaklanabileceği vurgulanmaktadır. Eybl ve ark (2006) yaptıkları çalışmada farelerde kurkumin, resveratrol ve melatonin gibi antioksidanların, dokularda kadmiyum kaynaklı oksidatif hasara karşı etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda antioksidanların kadmiyum kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı koruma sağladığı ifade edilmektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda resveratrol ve taksol uygulaması sonucu gözlenen etkiler tez çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Kuş (2007) sıçanlarda formaldehit ve melatonin uygulamasının testis dokusu üzerine biyokimyasal etkilerini incelediği araştırmasında; kontrol, formaldehit ve formaldehit+melatonin gruplarında sırasıyla GSH-Px aktivite değerleri 237,4±3,1; 77,5±5,3; 198,2±5,6; MDA değerleri 6,1±0,6; 13,7±0,8; 7,3±0,5 olarak saptanmıştır. Sahoo ve ark (2008) yapmış oldukları çalışmada; testis dokusu üzerine L-tiroksin ve antioksidan maddelerin etkinliğini incelemişlerdir. L-tiroksin uygulaması LPO ve GSH seviyelerini yükseltmiş antioksidan madde (kurkumin ve vitamin E) uygulaması sonucu ise LPO seviyesi düşerken GSH seviyesinde değişiklik gözlenmemiştir. Castellini ve ark (2002) tavşan spermatozoonlarında oksidatif stres parametreleri üzerine alfa-tokoferol, vitamin E ve selenyum'un etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; kontrol, vitamin E, Se ve vitamin E+Se gruplarında sırasıyla MDA değerlerini 21,4 MDA/10^8spz, 12,44 MDA/10^8 spz, 20,11 MDA/10^8 spz, 13,33 MDA/10^8 spz; glutasyon peroksidaz değerlerini 1103 mU/10^9spz, 1168 mU/10^9spz, 1338 mU/10^9spz, 1403 mU/10^9spz olarak tespit ettiklerini ifade etmektedirler. Sunulan tez çalışmasında Kuş (2007) ile Castellini ve ark (2002)'nın elde ettikleri değerlere benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Sahoo ve ark (2008)'nın yapmış oldukları antioksidan madde uygulaması sonucu LPO seviyesi üzerine gözlenen etki tez çalışması ile benzer iken GSH seviyelerinde tez çalışmasından farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Farklılığın nedeninin kullanılan hayvan türü, uygulama yöntemi veya uygulanan antioksidan maddelerden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Ratlarda testis dokusu üzerine yine bir mikrotubül inhibitörü olan sisplatinin biyokimyasal ve histolojik etkisini araştıran Awadalla (2012) sisplatin ile birlikte uygulanan çörek otu yağının bir antioksidan gibi etki göstererek MDA değerlerini düşürerek bazal seviyelere yaklaştırdığı ve histolojik yapısı üzerine de olumlu etki gösterdiğini belirlemiştir. Tez çalışmasında paklitaksel ile birlikte resveratrol uygulaması LPO değerlerini paklitaksel grubuna kıyasla düşürmüş ve koruyucu etki gözlenmiştir. Çalışmaların sonuçları benzerlik göstermektedir.

Sunulan tez çalışmaında kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarının testis dokularına ait seminifer tubul çapları (μm) sırasıyla 136,78±26,57; 135,50±28,08; 102,62±20,62 ve 127,94±23,49 olarak saptandı (Şekil 3.12).

Koehler-Samouilidou ve ark (2001) wistar ırkı ratlarda paklitaksel uygulamasının erkek üreme organları, sperma parametreleri ve diğer organlar üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar ratlara haftada bir kez 4 hafta boyunca 12,4 mg/kg paklitaksel uygulamışlardır. Çalışma sonucunda histolojik olarak bölünebilen ve spermlere dönüşebilen hücrelerin daha fazla etkilendiği araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Ayrıca da Leydig hücrelerinin dejenerasyona uğradığı vurgulanmıştır. Fareler üzerine yapılan çalışmada benzo[a]piren (BaP) 5 hafta süresince farelere deri altı yolla uygulanmış ve aynı anda resveratrol uygulaması yapılarak koruyucu etkinliğinin olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak BaP'in özellikle spermatogoniumlar ve seminifer tubuller üzerine apoptoz etkisi gösterirken resveratrol'ün ise BaP'in etkilerini baskıladığı belirlenmiştir (Revel ve ark 2001). Juan ve ark (2005) ratlara oral yolla 90 gün süreyle resveratrol içirmiş ve seminifer tubul çaplarını ve tubuler yoğunluğu kontrol grubu ile kıyaslamışlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda resveratrol ve kontrol gruplarında sırasıyla tubul çapları 310,9±0,1 μm ve 437,5±0,1 μm; tubuler yoğunluk değerlerini ise 6,58±0,18 ve 3,20 ±0,18 tubul/mm^2 olarak belirlemişlerdir. Juan ve ark (2005)'nın yaptıkları çalışmada elde edilen veriler ile tez çalışması sonuçları farklılık arzetmektedir. Tez çalışması ile olan farklılığın sebebinin türe dayalı olabileceği, uygulama dozu, süresi ve şeklinin etkili olabileceği düşünülebilir.

Antikanser bir ajan olan sisplatinin kullanıldığı erkek fareler üzerinde yürütülen bir çalışmada, Narayana ve ark (2009) hayvanları kontrol, L-askorbik asit,

sisplatin (1 mg/kg), L-askorbik asit+sisplatin (1 mg/kg), sisplatin (2,5 mg/kg ve L-askorbik asit+sisplatin (2,5 mg/kg) olarak 6 gruba ayırmışlardır. Grupların sırasıyla anormal seminifer tubul oranları %1-2; %1-2; %33; %8-10; %100 ve %75-80 olarak belirlenmiştir. Sisplatin uygulanan iki grupta diğer gruplara kıyasla seminifer tubul çaplarında küçülme gözlenmiştir. Çalışma sonucunda sisplatine karşı L-askorbik asit' in kısmi koruyucu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde tez çalışmasında da mikrotubül inhibitörü (paklitaksel) uygulaması seminifer tubul çaplarında küçülmeye neden olurken resveratrol koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sunulan tez çalışmasında kontrol, resveratrol, paklitaksel ve paklitaksel+resveratrol gruplarındaki hayvanların (%) gebelik oranları sırasıyla 87,50; 87,50; 75,00; 87,50; doğan yavru sayıları 6,00±1,52; 5,75±1,67; 5,50±1,41 ve 5,75±1,67 olarak saptandı (Şekil 3.13). Tez çalışmasına benzer olarak Kai ve ark (1994)'ı ratlarda yapmış oldukları çalışmada paklitaksel'in 0,6 mg/kg/gün ve 0,3 mg/kg/gün uygulanmasının reprodüktif parametreler üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Sunulan tez çalışmasında da benzer fertilite sonuçları elde edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürde tez konusu ile ilgili olarak paklitakselin toksisitesine karşı resveratrol'ün koruyucu etkilerini inceleyen çalışmalara rastlanamadı. Bu açıdan tez çalışmamız önem arzetmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, tavşanlarda üreme üzerine önem arzeden parametrelerin geniş kapsamlı araştırılması gerçekleştirildi. Spermatozoon üzerine hasar oluşup oluşmadığını görmek için tavşanlara İ.V. antikanser ilaç (paklitaksel) uygulaması yapıldı. Antioksidan maddenin (resveratrol) spermatozoon kalitesi üzerine etkisinin daha sağlıklı anlaşılabilmesi için kullanılan sulandırıcıya antioksidan ilave etmek yerine antioksidan madde tavşanlara İ.V. yolla verildi. Spermatozoonların üretildiği yer olan testis dokusu, sperma kalitesi üzerine etkinliği bilinen oksidatif stres parametreleri (LPO, tGSH ve total antioksidan kapasite) ve floresan boyama tekniklerinden faydalanılarak spermatolojik parametreler incelendi. Fertilite denemesi de çalışmaya eklenerek çalışma zenginleştirildi.

Sonuç olarak paklitakselin spermatolojik parametreleri olumsuz etkilediği, oksidatif stres parametrelerinin gruplar arasında istatistiksel fark oluşmamasına rağmen etkilendiği, antioksidan kapasite ölçümü haricindeki resveratrol uygulamasının olumlu sonuçlar gösterdiği belirlendi. Testisin histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda paklitaksel uygulamasının tubul çaplarında daralmaya neden olduğu ve kontrol grubu ile istatistiksel fark oluşturduğu, resveratrol'ün bu daralmayı engelleyici özellik gösterdiği saptandı. Fertilite denemesi sonucunda ise doğan yavru sayıları açısından gruplar arasında fark gözlenmedi.

Sunulan tez çalışması resveratrol'ün spermatozoonlar üzerine olumlu etkileri olduğunu gösterdi ve ayrıca benzeri antioksidan maddelerinde aynı koruyucu etkiyi gösterip göstermeyeceğinin tam olarak anlaşılabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı. Sunulan tez çalışması ve yapılacak yeni çalışmaların antioksidan maddelerin koruyucu tedavi alanında kullanılmasına yol göstereceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Agarwal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK, 2008. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment, 195-218a.

Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M, 2014. Proteomics, oxidative stress and male İnfertility. Reproductive BioMedicine Online, 29, 32-58.

Agarwal A, Makker K, Sharma R, 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor ınfertility: An update. American Journal of Reproductive Immunology, 59, 2-11b.

Agarwal A, Saleh RA, 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am, 29(4), 817-27.

Ahmad A, Farhan Asad S, Singh S, Hadi SM, 2000. DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. Cancer Lett, 154, 29-37.

Aitken RJ, West K, Buckingham D, 1994. Leukocytic infiltration intothe human ejaculate and its association with semen quality, oxidativestress, and sperm function. J Androl, 15, 343-52.

Aitken RJ, Roman SD, 2007. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. In: Molecular mechanisms in spermatogenesis. Ed. Cheng CY, New York: Adv Exp Med Biol (Book Series), p. 154-72.

Aitken RJ, Baker MA, 2013. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationshipsforged by the opposing forces of microbial invasion and the search forperfection. Journal of Reproductive Immunology. 100, 11-9.

Akar İ, 2005. Yeni Zelanda beyazı tavsanlarda reprodüktif parametreler ve bazı gebelik tanı yöntemlerinin etkinliliklerinin karşılaştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, p. 2-7.

Alam SS, Hafiz NA, El-Rahim AHA, 2011. Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxfine. Environ Toxicol Pharmacol, 3, 143-52.

Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB, 1995. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutat Res, 330(1), 115-181.

Awadalla EA, 2012. Ameliorative effect of the crude oil of the Nigella sativa on oxidative stress induced in rat testes by cisplatin treatment. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2, 265-68.

Aydın A, 1998. Erkek tavşanlarda genital organlar ve eklenti bezler'inin postnatal morfolojik gelişimi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, Ricciardo-Lamonica G, Boscaro M, Lenzi A, Littarru G, 2009. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. Fertil Steril, 91, 1785-92.

Baur JA, Sinclair DA, 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nature Reviews, 5, 493-506.

Benjamin DJ, Sharma RK, Moazzam A, Agarwal A, 2012. Methods for the detection of ROS in human sperm samples. In: Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG. Studies in Men's Health and Fertility. New York: Springer Science Business Media, 257-73.

Bogenhagen DF, 1999. Repair of mtDNA in vertebrates. Am J Hum Genet, 64, 1276-81.

Boiti C, Castellini C, Theau-clément M, Besenfelder U, Lıguorı L, Renıerı T, Pizzi F, 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. World Rabbit Sci, 13, 71-91.

Brecchia G, Cardinali R, Mourvaki E, Collodel G, Moretti E, Dal Bosco A, Castellini C, 2010. Short- and long-term effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on rabbit sperm quality. Anim Reprod Sci, 118(2), 310-16.

Brooks CL, Gu W, 2009. Anti-aging protein SIRT1: A role in cervical cancer. Aging, 1, 278-280.

Bucak MN, Ataman MB, Başpınar N, Uysal O, Taşpınar M, Bilgili A, Öztürk C, Güngör Ş, İnanç ME, Akal E, 2014. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. Andrologia, 1, 1-8.

Castellini C, 2008. Semen productıon and management of rabbıt bucks. 9th World Rabbit Congress: 10-13, June, Verona Italy.

Castellini C, Lattaioli P, Bosco AD, Beghelli D, 2002. Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. Theriogenology, 58(9), 1723-32.

Collodel G, Federicoa MG, Geminiania M, Martini S, Bonechi C, Rossi C, Figurad N, Moretti E, 2011. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. Reprod Toxicol, 31, 239-46.

Çiğremiş Y, 2009. Tavşanlarda sisplatin ve aminoglikozid grubu antibiyotik indüklü akut böbrek hasarına karşı CAPE ve resveratrol'un koruyucu özelliklerinin araştırılması. Proje No: 104 V 122.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A. Colombo R, 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta, 329, 23-38.

De La Lastra CA, Villegas I, 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. Biochem Soc Trans, 35, 1156-60.

Delkhoshe-Kasmaie F, Malekinejad H, Khoramjouy M, Rezaei-Golmisheh A, Janbaze-Acyabar H, 2013. Royal jelly protects from taxol-induced testicular damages via improvement of antioxidant status and up-regulation of E2f1. Systems Biology in Reproductive Medicine, 60(2), 80-88.

Demirtaş A, Üntan İ, 2011. Seminal sıvı ve spermde oksidatif stres ve antioksidanlar. Türk Ürol Sem, 2, 24-30.

Demple B, 2010. Oxidative stress and free radical signal transduction. Handbook of Cell Signaling. Three-Volume Set 2 ed, p. 2137-43.

Dilek İ. Kemoterapide toksisite değerlendirmesi. 3-7 Kasım 2010, Belek, Antalya.

Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ, 2003. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. Gynecol Oncol, 88, 434-39.

Dursun E, 2010. Arsenik Toksisitesinin Testiste Oluşturduğu Hasara Karşı Resveratrol'ün Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Easson W, 2001. A review of rabbit and rodent production medicine. In Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 10(3), 131-39.

Eken A, 2012. Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 1, 69-73.

El-Taieb MAA, Herwig R, Nada EA, Greilberger J, Marberger M, 2009. Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 144, 199-203.

Erdemoğlu N, Şener B, 2000. Taksan sınıfı bileşiklerin antitümör etkileri. J Fac Pharm, 29(1), 77-90.

Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J, 2006. Comparative study of natural antioxidants-curcumin, resveratrol and melatonin-in cadmium induced oxidative damage in mice. Toxicology, 225, 150-156.

Foote RH, Carney EW, 2000. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. Reprod Toxicol, 14, 477-93.

Fukui M, Yamabe N, Zhu BT, 2010. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. Eur J Cancer, 46, 1882-91.

Garcez ME, dos Santos Branco C, Lara LV, Pasqualotto FF, Salvador M, 2010. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. Fertility and sterility, 94(6), 2118-21.

Giaretta E, Bucci D, Mari G, Galeati G, Love CC, Tamanini C, Spinaci M, 2014. Is resveratrol Effective in Protecting Stallion Cooled Semen? Journal of Equine Veterinary Science, 34, 1307-12.

Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas Jr AJ, Agarwal A, 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsetsof human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod, 16, 1922-30.

Guo XL, Lin GJ, Zhao H, Gao Y, Qian LP, Xu SR, Fu LN, Xu Q, Wang JJ, 2002. Inhibitory effects of docetaxel on expression of VEGF, bFGF and MMPs of LS174T cell. World J Gastroenterol, 9, 1995-98.

Guthrie HD, Welch GR, 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. Theriogenology, 78, 1700-08.

Irshad M, Chaudhuri PS, 2002. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. Indian J Exp Biol, 40, 1233-39.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM, 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 275, 218-20.

Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM, 2005. Trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. The Journal of Nutrition, 135(4), 757-60.

Kai S, Kohmura H, Hiraiwa E, Koizumi S, Ishikawa K, Kawano S, Kuroyanagi K, Hattori N, Chikazawa H, Kondoh H, Kondoh H, 1994. Reproductive and developmental toxicity studies of paclitaxel.(II) Intravenous administration to rats during the fetal organogenesis. The Journal of toxicological sciences, 19, 69-91.

Karlığa B, Talınlı N, 2004. 3'-N-Tiyokarbamat paklitaksel türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları, itüdergisi/c 2, 25-30.

Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa, 2006. Protective effects of resveratrol on ethanol induced lipid peroxidation in rats. Alcohol Alcohol, 41(3), 236-239.

Kashou AH, Sharma R, Agarwal A, 2013. Assessment of oxidative stress in sperm and semen. Methods Mol Biol, 927, 351-61.

Kim HS, Oh JM, Jin DH, Yang KH, Moon EY, 2008. Paclitaxel induces vascular endothelial growth factor expression through reactive oxygen species production. Pharmacology, 81(4), 317-24.

Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Sharma R, Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A, 2001. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. J Androl, 22, 568-74.

Koehler-Samouilidou G, Kaldrymidou E, Papaioannou N, Kotsaki-Kovatsi VP, Vadarakis A, 2001. The effect of paclitaxel (taxol) on the reproductive system and the semen parameters as well as on other organs of male rats. J Hellenic Vet Med Soc, 52, 23-31.

Kolgazi M, Sener G, Çetinel Ş, Gedik N, Alican İ, 2006. Resveratrol reduces renal and lung ınjury caused by sepsis in rats. Journal of Surgical Research, 134, 315-21.

Kulaksız R, 2009. Farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş saanen tekesi spermasının in vitro değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Kuş MA, 2006. Sıçanlarda formaldehit maruziyetiyle testislerde olusan morfolojik değişiklikler üzerine melatonin hormonunun koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J, 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1α. Cell, 127(6), 1109-22.

Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W, 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 64(4), 868-70.

Liu CY, Lee CF, Hong CH, Wei YH, 2004. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. Ann NY Acad Sci, 1011, 133-45.

Loo WTY, Fong JHM, Chow LWC, 2005. The efficacy of Paclitaxel on solid tumour analysed by ATP bioluminescence assay and VEGF expression: atranslational research study. Biomed Pharmacother, 59, 337-339.

Marques FZ, Markus MA, Morris BJ, 2009. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. The İnternational Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41(11), 2125-28.

Meistrich ML, 2009. Male Gonadal Toxicity. Pediatr Blood Cancer, 53, 261-66.

Moce E, Vicente JS, 2009. Rabbit sperm cryopreservation: A review. Anim Reprod Sci, 110, 1-24.

Mokni M, Limam F, Elkahoui S, Amri M, Aouani E, 2007. Strong cardioprotective efect of resveratrol, a red wine polyphenol, on isolated rat hearts after ischemia/reperfusion injury. Arch Biochem Biophys, 457, 1-6.

Moradi M, Moradi A, Alemi M, Ahmadnia H, Abdi H, Ahmadi A, Bazargan-Hejazi S, 2010. Safety and efficacy of clomiphene citrate and L-carnitine in idiopathic male infertility a comparative study. Urol J, 7, 188-93.

Narayana K, Al-Bader M, Mousa A, Khan KM, 2012. Molecular effects of chemotherapeutic drugs and their modulation by antioxidants in the testis. Eur J Pharmacol, 674, 207-16.

Narayana K, Verghese S, Jacob SS, 2009. L-ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy-induced testis damage and oligo-astheno-teratospermia in a mouse model. Exp Toxicol Pathol, 61, 553-63.

Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS, 2004. The Role of Carnitine in the Male Reproductive System. N.Y. Acad. Sci, 1033, 177-88.

Ochsendorf FR, 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. Hum Reprod, 5, 399-420.

Oeffinger KC, Hudson MM, 2004. Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. CA Cancer J Clin, 54, 208-36.

Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, Yoshida S, Teshima H, Shimada M, 2010. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improvesthe quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. Theriogenology, 74, 1691-1700.

Oksante. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Erişim tarihi, 26.01.2014. Erişim adresi, http://www.oksante.com.tr/Oksantest.pdf.

Olas B, Wachowicz B, Majsterek I, Blasiak J, 2005. Resveratrol may reduce oxidative stress induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. Anticancer Drugs, 16(6), 659-65.

Ourique GM, Finamor IA, Saccol EM, Riffel AP, Pês TS, Gutierrez K, Goncalves PBD, Baldisserotto B, Pavanat MA, Barretoa KP, 2013. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. Reprod Toxicol, 37, 31-9.

Özbey İ, 2011. Kemoterapi ve erkek infertilitesi. Androloji Bülteni, 45, 123-27.

Özgül N, Erten Ö, Düzgüner S, Turan T, Kög İ, Boran N, Balta İ, Köse MF, 2012. Paklitaksel /Platin kombinasyonu ve alopesi. Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, 9, 239-43.

Öztemel S, Doğan İ, Soylu MK, 2003. Beyaz Yeni Zelanda Irkı Tavşanların Kimi Spermatolojik Özellikleri. Uludag Univ J Fac Vet Med, 1-2-3, 69-73.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM, 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. Clin Chim Acta, 235, 207-19.

Pearson, KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, IkenoY, Couteur DL, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R, 2008. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. Cell Metabolism, 8(2), 157-68.

Poyrazoğlu Ş, Baş F, Darendeliler E, Darendeliler F, 2010. Çocukluk çağı kanser tedavisinin endokrin geç yan etkileri, Türk Onkoloji Dergisi, 25(1), 37-46.

Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P, 2006. Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. Chem Biol Interact, 160, 108-14.

Ragheb AM, Sabanegh Jr ES, 2010. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 10, 92-102.

Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Robert F, Casper RF, 2001. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(*a*)pyrene. Reprod Toxicol, 15, 479-86.

Sabuncuoğlu S, Özgüneş H, 2011. Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 31(2), 137-50.

Sahoo DK, Roy A, Chainy GB, 2008. Protective effects of Vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. Chem Biol Interact, 176(2), 121-28.

Saleh RA, Agarwal A, 2002. Oxidative stress and male infertility from research: bench to clinical practice. J Androl, 23, 737-52.

Sandoval JS, Raburn D, Muasher S, 2013. Leukocytospermia: Overview of diagnosis, implications and management of a controversial finding. Middle East Fertility Society Journal, 18, 129-34.

Sarıözkan S, 2005. Laboratuvar hayvanlarında reprodüksiyon. Lalahan Hay Arast Enst Derg, 45(1), 33-9.

Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A, 1999. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. Hum Reprod, 14, 2801-07.

Shin S, Jeon J, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, Joo SS, Nahm SS, Kim JC, Kim YB, 2008. Trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. Archives of Pharmacal Research, 31(1), 83-7.

Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP, 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology, 77, 1722-26.

Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZMS, El-Malik EMA, Nasr MA, 1996. Lipid peroxidation and Human Sperm Motility: Protective Role of Vitamin E. J Androl, 17, 530-37.

Şen F. Antimikrotubül ajanlar, alkalize edici ajanlar ve platin analoglarının etkileşimleri. 5. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi Bildirileri: 55-59, 2002, Antalya.

Tao X, Yu H, Zhang Y, Li Z, Jhanji V, Ni S, Wang Y, Mu G, 2013. Role of corneal epithelium in riboflavin/ultraviolet-A mediated corneal cross-linking treatment in rabbit eyes. Biomed Res Int. Article ID 624563.

Taylor RW, Turnbull DM, 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat Rev Genet, 6, 389-402.

Tekcan M, 2009. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. Androloji Bülteni, 37, 131-36.

Tremellen K, 2008. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. Human Reproduction Update, 14, 243-58.

Tsiligiannia TH, Saratsia A, Besenfelderb U, Anastasiadisc A, Vainasc E, Saratsisa PH, Bremb G, 2004. The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. Theriogenology, 61, 989-95.

Tsunenari I, Kast A, 1992. Developmental and regressive changes in the testes of the Himalayan. Rabbit Laboratory Animals, 26, 167-79.

Türk G, 2013. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17, 73-92.

Türk Tıbbi Onkoloji Derneği (TTOD). Hastalar için kemoterapi rehberi. Erişim tarihi, 25.01.2014. Erişim adresi, www.kanser.org/toplum/pdf/Kemoterapi_Rehberi.pdf.

Uguralp S, Usta U, Mizrak B, 2005. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. Eur J Pediatr Surg, 15, 333-36.

Urata K, Narahara H, Tanaka Y, Egashira T, Takayama F, Miyakawa I, 2001. Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility. Fertil Steril, 76(1), 163-66.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J Biochem Cell Biol, 39, 44-84.

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A, 2003. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertil Steril, 80, 844-50.

7. EKLER

EK. A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	28.03.2012	Toplantı Sayısı	2012/06	Karar Sayısı	2012/031

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN tarafından sunulan "**Tavşanlarda Paklitaksel'in Spermatolojik Parametreler, Testis Histolojisi ile Fertilite Üzerine Etkileri ve Resveratrol'ün Koruyucu Özelliğinin Belirlenmesi**" isimli tez projesi değerlendirilmiştir.

Projede, Konya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilecek 64 adet tavşanın 8 hafta süreyle kullanılacağı, hayvanlara ilaç uygulanacağı, kan ve sperma örnekleri alınacağı bildirilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun olduğuna"** oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet MADEN Başkan	Doç. Dr. Uğur USLU Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Sadettin TAPIRDAMAZ Üye	Prof. Dr. Mustafa ACAROĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi

Prof. Dr. Fatma İNAL Raportör Üye	Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU Üye	Hüseyin AYDIN Sivil Üye

8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Konya'da doğdu. İlköğrenimini Mümtaz Koru İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini Selçuklu Anadolu Lisesinde tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesini 2004 yılında kazandı ve 2009 yılında mezun oldu. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında 2009 yılında doktora eğitimine başladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 2010-2015 yılları arasında Sağlık Bilimleri Enstitüsü kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. Tavşanlarda paklitaksel'in spermatolojik parametreler, testis histolojisi ile fertilite üzerine etkileri ve resveratrol'ün koruyucu özelliğinin belirlenmesi adlı tez ile 2015 yılında doktora eğitimini tamamladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.