T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİNİN RAT TESTİS DOKUSUNDA MEYDANA GETİRDİĞİ HASARLARIN BELİRLENMESİ VE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİLERİ

Ali Erdem ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK

KONYA-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİNİN RAT TESTİS DOKUSUNDA MEYDANA GETİRDİĞİ HASARLARIN BELİRLENMESİ VE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİLERİ

Ali Erdem ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19102006 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA- 2021

ÖNSÖZ

Kanser, insanlığın varoluşundan beri süregelen bir hastalıktır. Modern çağın getirdiği teknolojik değişikliklere bağlı olarak değişen şehirleşme, radyasyon, stres, hava kirliliği ve kimyasal yoğunluğuna bağlı olarak artan kanser vakalarına paralel olarak gelişen tıbbi teknikler ve yeni ilaçlar ile mortalite oranlarında düşüş yaşanmıştır.

Kanser tedavisinde kemoterapi günümüzde en çok kullanılan tedavi şeklidir. Modern kemoterapötik ilaçlar yalnızca hedef dokuya spesifik ilaçlar olsalar da hem tedavi sürecinin uzun olması hem de oldukça pahalı olmaları geleneksel kemotrepötik ilaçların kullanılmasına neden olmaktadır. En sık kullanılan kemoterapötik ilaçlardan biri olan doksorubisin, topoizomeraz inhibitörü olarak etki etmesine karşın, seçici olmayan sitotoksik etkisi nedeniyle hedef doku ve hücrelerin yanı sıra pek çok diğer organ ve dokular üzerine de etki etmektedir. Buna bağlı olarak kanser tedavisi gören erkek (E) bireylerde testis toksisitesi oluşmakta ve bir yıldan fazla süre azospermi olguları ile karşılaşılmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında doksorubisininin sitotoksik etkisini önlemek amacıyla resveratrol ile timokinon kullanılmış ve testis dokusunun korunması hedeflenmiştir.

Sunulan tez çalışmasında ve doktora eğitimimin her aşamasında hiçbir yardımını ve tecrübesini esirgemeyen, daha iyi bir araştırmacı olmam için çalışan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK'a teşekkür ederim.

Akademik hayata katılmam ve doktora eğitimime başlamam konusunda büyük emeği olan, pek çok konuda benim için elini taşın altına koyan Sayın Prof. Dr. Serpil SARIÖZKAN'a teşekkür ederim.

Araştırma görevliliğim süresince tecrübelerinden istifade ettiğim, bilimsel düşünme yetime katkıları olan Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN, Prof. Dr. Abdullah KAYA, Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR ve Prof. Dr. İlhami ÇELİK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince patolojik analizlerimi yapan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Burak ATEŞ'e teşekkür ederim.

Sunulan tez çalışması uygulamalarında yardımlarını gördüğüm meslektaşlarım Vet. Hek. Vahit AĞIR'a ve Vet. Hek. Ayşe ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Doktora sürecimde beni motive eden, ihtiyacım olduğu anlarda yardımıma koşan, akademik hayatın bana kazandırdığı ve bundan sonra da beraber çalışacağım arkadaşım Arş. Gör. Dr. Mustafa BODU'ya teşekkür ederim.

Bu noktaya kadar gelmemde en büyük emek sahibi olan ilk öğretmenim, eğitimici ve emektar annem Nurten ÖZTÜRK ve babam Metin ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tanıdığım günden beri her zaman yanımda olan, doktora sürecinin zorlu ve stresli günlerinde beni motive eden, her an yanımda olduğunu hissettiğim ve fikirlerine değer verdiğim biricik eşim Pınar Gizem ÖZTÜRK'e teşekkür ederim. Bu çalışmayı tez sürecinde dünyaya gelen ve adeta tüm stresimi alıp götüren biricik oğlum Ata Metin ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Son olarak, her başarım ile övünen, iyi bir birey olmam için elinden gelen gayreti gösteren, her daim tavsiyelerine uyduğum, doktora yapmam ile gurur duyan ancak bu günleri göremeyen rahmetli dedem Nurettin ÖZTÜRK'e bu tez çalışmamı armağan ediyorum.

Dedem Nurettin ÖZTÜRK
Eşim Pınar Gizem ÖZTÜRK
ve
Aileme…

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ 1
1.1. Rat Fizyolojisi 3
1.1.1. Cinsiyet Tespiti 3
1.1.2. Pubertas 4
1.1.3. Seksüel Siklus 4
1.1.4. Çiftleşme 6
1.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu ve Oksidatif Stres 6
1.2.1. Süperoksit Anyonu 9
1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 10
1.2.3. Hidroksil Radikali (.OH) 10
1.4. Antioksidanlar ve Antioksidatif Etki 12
1.5. Doksorubisin ve Etki Mekanizması 14
1.6. Timokinon ve Koruyucu Etki 18
1.7. Resveratrol ve Koruyucu Etkisi 21
2. GEREÇ VE YÖNTEM 24
2.1. Ratların Bakımı ve Beslenmesi 24
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması 24
2.3. Spermatolojik Parametreler 28
2.3.1. Motilite Muayenesi 28
2.3.2. Yoğunluk Tayini 28
2.3.3. Anormal Spermatozoon Oranı 29
2.3.4. Akrozomal Bütünlük Tayini 29
2.3.6. Mitokondrial Aktivitenin Belirlenmesi 30
2.4. Patolojik Değerlendirmeler 30
2.4.1. Makroskobik Muayeneler ve Relatif Testis Ağırlığının Belirlenmesi 30
2.4.2. Histopatolojik Değerlendirmeler 30
2.4.3. İmmunohistokimyasal Ölçümler 31
2.5. İstatistiksel Analizler 32
3. BULGULAR 33
3.1. Spermatolojik Parametreler 33
3.2. Patolojik Bulgular 38
3.2.1. Makroskobik Muayene ve Relatif Testis Ağırlığı 38

3.2.2. Histopatolojik Bulgular 40
3.2.3. İmmunohistokimyasal Bulgular 46
4. TARTIŞMA 59
4.1. Spermatolojik Bulgular 59
4.2. Relatif Testis Ağırlığı Bulguları 69
4.3. Histopatolojik Bulgular 70
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular 73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 76
6. KAYNAKLAR 77
7. EKLER 86
7.1. EK (ETİK KURUL) 86
7.2. TURNİTİN RAPORU 87
7.3. ÖZGEÇMİŞ 92

Şekiller Listesi

Şekil 1.1. Bir mumyada bulunan 2200 yıllık prostat kanseri ve ilk kez kanserden bahseden Edwin Smith papirüsü…….....2
Şekil 1.2. Dişi Rat Seksüel Siklusu Dönemleri ve Hücresel Görüntüsü……..5
Şekil 1.3. Sperm mitokondrisinde meydana gelen elektron transport zinciri ve ATP üretim mekanizması……..8
Şekil 1.4. Serbest oksijenin aşama aşama elektron ve proton alarak radikalleşmesi ve su oluşumuna giden yol……9
Şekil 1.5. Süperoksit anyonunun hidrojen perokside dönüşmesi……...10
Şekil 1.6. Hidrojen peroksidin elektron alarak hidroksil anyonuna dönüşmesi…….10
Şekil 1.7. Suyun yüksek enerjili radyasyon ile tepkimesi sonucu hidroksil radikali oluşumu……...11
Şekil 1.8. Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşumu…….11
Şekil 1.9. Doksorubisin'in hücre içi etki mekanizması……..15
Şekil 1.10. NAD(P)H oksidaz enzimi aracılığı $NAD(P)^+$ üretimi……..16
Şekil 1.11. Timokinonun kimyasal yapısı…….....18
Şekil 1.12. Timokinonun moleküler yapısındaki değişimler…….20
Şekil 1.13. Resveratrolün kimyasal yapısı…….22
Şekil 1.14. Resveratrolün moleküler yapısındaki değişimler…… 23
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar……..25
Şekil 2.2. Koruyucu bileşiklerin oral gavaj yöntemi ile uygulanması ve doksorubisin enjeksiyonu…….26
Şekil 2.3. Ölçümlerin yapıldığı ve örneklerin toplandığı çalışma masası…….27
Şekil 2.4. Örneklerin toplanması esnasında testis yapısı……28
Şekil 2.5. Hemositometrik yöntem ile yoğunluk tayini belirleme formülü……29
Şekil 3.1. Anormal spermatozoon örnekleri……...36
Şekil 3.2. Mitokondrial aktivite, akrozomal bütünlük ve membran bütünlüğü floresan mikroskop görüntüsü……..37
Şekil 3.3. Kontrol, D+R5 ve D grubu rat testis görüntüsü…….39
Şekil 3.4 (A,B). Seminifer tubullerin histopatolojik görüntüsü ……..40
Şekil 3.4 (C,D). Seminifer tubullerin histopatolojik görüntüsü …….41
Şekil 3.4 (E,F). Seminifer tubullerin histopatolojik görüntüsü ……..…….42
Şekil 3.4 (G,H). Seminifer tubullerin histopatolojik görüntüsü …….43
Şekil 3.4 (I,J). Seminifer tubullerin histopatolojik görüntüsü …….……...44
Şekil 3.5 (A,B). Seminifer tubullerin Bax görüntüsü…… 47
Şekil 3.5 (C,D). Seminifer tubullerin Bax görüntüsü…… 48
Şekil 3.5 (E,F). Seminifer tubullerin Bax görüntüsü…… 49

Şekil 3.5 (G,H). Seminifer tubullerin Bax görüntüsü…….…….. 50
Şekil 3.5 (I,J). Seminifer tubullerin Bax görüntüsü……..…… 51
Şekil 3.6 (A,B). Seminifer tubullerin Bcl-2 görüntüsü…….....53
Şekil 3.6 (C,D). Seminifer tubullerin Bcl-2 görüntüsü…….....54
Şekil 3.6 (E,F). Seminifer tubullerin Bcl-2 görüntüsü…….....55
Şekil 3.6 (G,H). Seminifer tubullerin Bcl-2 görüntüsü…….....56
Şekil 3.6 (I,J). Seminifer tubullerin Bcl-2 görüntüsü……..…….....57

Çizelgeler Listesi

Çizelge 1.1. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması…….13

Çizelge 1.2. Türlerine göre kaspazların sınıflandırılması……..15

Çizelge 2.1. Deney 1 gruplar ve dozlar çizelgesi…….……..25

Çizelge 2.2. Primer antikorlara göre immunohistokimyasal boyama protokolleri….32

Çizelge 3.1. Deney gruplarının motilite, yoğunluk, anormal spermatozon, membran bütünlüğü, mitokondrial aktivite ve akrozomal bütünlük değerlerine ait bulgular…35

Çizelge 3.2. Uygulama sonrası grup relatif testis ağırlık yüzdelerinin gösterimi…38

Çizelge 3.3. Testis içi germinatif hücre katman kalınlığı, tubul çapları ve Johnson'un testiküler skorlaması……...45

Çizelge 3.4. Gruplar arası Bax ve Bcl-2 değerleri karşılaştırması…….46

SİMGELER VE KISALTMALAR

-	Eksi
+	Artı
±	Artı-Eksi
%	Yüzde
º	Derece
<	Küçüktür
=	Eşittir
≈	Yaklaşık Eşittir
>	Büyüktür
/	Bölme
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
ºC	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ΔΨm	Mitokondrial Membran Potansiyeli
ADP	Adenozin Di Fosfat
ATP	Adenozin Tri Fosfat
Apaf-1	Apoptoz Aktivatör Faktör-1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lenfoma 2
CAT	Katalaz
CHD	Koroner Kalp Hastalıkları
D	Doksorubisin
D+T5	Doksorubisin + 5 mg/kg Timokinon
D+T20	Doksorubisin + 20 mg/kg Timokinon

D+R5	Doksorubisin + 5 mg/kg Resveratrol
D+R20	Doksorubisin + 20 mg/kg Resveratrol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
Dş	Dişi
e^-	Elektron
E	Erkek
FAD^+	Flavin Adenin Dinükleotid
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GSH	Glutatyon
H^+	Hidrojen İyonu
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HO^-	Hidroksil Radikali
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IHK	İmmunohistokimya
IMI	İmidaklopride
i.p.	İntraperitoneal
JC-1	5, 5', 6, 6'-Tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iyodür
Kg	Kilogram
LDH	Laktat Dehidrojenaz
LPO	Lipid Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar

M.Ö.	Milattan Önce
M.S.	Milattan Sonra
NAD^+	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
O_2^-	Süperoksit Radikali
P	Fosfor
PARP	Poli ADP Riboz Polimeraz
Pb	Kurşun
PI	Propidium İyodür
PNA	Peanut Agglutinin
R	Resveratrol
R5	5 mg/kg Resveratrol
R20	20 mg/kg Resveratrol
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Serbest Oksijen Radikali
Sit O	Sitokrom C Oksidaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
T	Timokinon
T5	5 mg/kg Timokinon
T20	20 mg/kg Timokinon
TSC	Tubulus Seminiferus Kontortus
UV	Ultraviyole
Xox	Ksantin Oksidaz
Y.Y.	Yüzyıl

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doksorubisin'in Rat Testis Dokusunda Meydana Getirdiği Hasarların Belirlenmesi ve Çeşitli Antioksidanların Koruyucu Etkileri

Ali Erdem ÖZTÜRK

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA 2021

Sunulan tez çalışmasında, beşeri hekimlikte kemoterapötik olarak kullanılan doksorubisinin rat testis dokusu üzerine zararlı etkileri ve bu zararlı etkiler üzerine timokinon ve resveratrolün koruyuculuğu araştırıldı.

Çalışmada 10 grup yer aldı. Her bir grupta 8 erkek rat olmak üzere toplamda 80 erkek Albino Wistar rat kullanıldı. Çalışma grupları kontrol, 15 mg/kg doksorubisin (D), 5mg/kg timokinon (T5), 20mg/kg timokinon (T20), 5mg/kg resveratrol (R5), 20mg/kg resveratrol (R20), D+T5, D+T20, D+R5 ve D+R20 olarak belirlendi. Kontrol grubuna oral gavaj yöntemiyle gün aşırı serum fizyolojik, D grubuna 10. gün 15 mg/kg dozda intraperitoneal (İP) olarak doksorubisin, timokinon ve resveratrol içeren gruplarda ise antioksidanlar oral gavaj yöntemi ile 21 gün boyunca gün aşırı uygulandı. Yirmibir günün sonunda ratlar anesteziye alınarak servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edildi. Spermatolojik ve patolojik parametrelerin ölçülmesi için örnekler alındı. Yapılan ölçümler sonucunda motilite değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda motilite %65,83 çıkarken, doksorubisin uygulanan grupta bu oran %37,5'a kadar düşüş gösterdi ($p<0,05$). Yine motilite üzerinde, D+T5 (%31,66) ve D+T20 (%40) grupları doksorubisinin zararlı etkisini tersine çeviremezken ($p>0,05$), D+R5 (%54,16) ve D+R20 (%61,66) grupları doksorubisin grubundan daha iyi sonuçlar vermeyi başardı. Epididimal spermatozoa yoğunluğu göz önüne alındığında doksorubisin grubu ($66,66x10^6$) kontrol grubuna ($181,66x10^6$) oranla spermatozoa yoğunluğunu önemli ölçüde azalttı. Kombine uygulamalarda ise tüm gruplar doksorubisin grubuna oranla daha iyi sonuçlar vererek spermatozoa yoğunluğunun düşmesini önledi. Anormal spermatozoa oranları değerlendirildiğinde, doksorubisin uygulaması anormal spermatozoa oranını (%5,16) diğer gruplara göre önemli derecede artırdı. D+T5 (%2,5), D+T20 (%2,16) ve D+R5 (%1,41) grupları doksorubisin grubuna oranla anormal spermatozoon oranlarını düşürmeyi başardı. Doksorubisin uygulaması (%50,58) spermatozoa membran bütünlüğünde önemli oranda hasar oluşturdu. Kombine uygulamalar, spermatozoon membranında oluşan hasarı kontrol grubu seviyesine getirmede başarısız olmakla birlikte, doksorubisin'in oluşturduğu hasarı önemli ölçüde azalttı. Mitokondrial aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, doksorubisin grubu (%46,66), diğer gruplara göre önemli oranda düşüşe neden oldu. D+R5 (%74,1) ve D+R20 (%78,61) gruplarında oluşan hasar doksorubisin grubuna oranla düzeldi. Doksorubisin (%76,05) uygulaması akrozomal bütünlüğünü kontrol grubuna (%86,41) oranla önemli oranda düşürdü ($p<0,05$). Kombine gruplar doksorubisinin oluşturduğu akrozomal hasarı gidermede başarılı olamadı ($p>0,05$)

Relatif testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, doksorubisin içeren grup (%0,3672) kontrol grubuna (%0,4371) göre önemli oranda düşüşe neden oldu. D+T5 (%0,4559), D+T20 (%0,4972), D+R5 (%0,4497) ve D+R20 (0,4845 g) doksorubisinin neden olduğu testis ağırlık kaybını önlemeyi başardı. Doksorubisin uygulanan hayvanlarda testis germinatif hücre katman kalınlığı (32,9 µm), kontrol (59,91 µm) grubuna göre oldukça düşük çıktı. Kombine gruplarda ise en başarılı sonucu

D+R5 grubu (58,85 µm) verdi. Tubulus seminiferus kontortus çapları dikkate alındığında, kontrol grubunun ortalama tubulus çapı 308,6 µm iken, doksorubisin uygulanan grupta ortalama 232,33 µm olarak ölçüldü. D+T5 ve D+T20 uygulamaları, doksorubisinin hasar verici etkisine karşı bir miktar koruma sağlasa da tubulus çapı değeri kontrol grubuna yaklaşamadı. D+R5 (292,59 µm) ve D+R20 (292,55 µm) grupları tubulus çapı bakımından doksorubisinin hasarını engelleyici etki göstererek kontrol grubunun ortalamasına oldukça yaklaştırdı ($p<0,05$). Johnson'un testiküler skorlaması incelendiğinde, en iyi sonucu 9,0833 ile kontrol grubu verdi. Yalnızca doksorubisin içeren grup (4,0833) oldukça düşük bir skor alırken, timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) içeren gruplar kontrol grubuyla benzer sonuçları verdi ($p>0,05$).

Kontrol grubunda Bax değeri 4,19 olarak gözlenirken, doksorubisin grubunda (12,37) oldukça yüksek çıktı. Doksorubisin ile kombine gruplarda Bax miktarı doksorubisin grubundan daha düşük çıksa da en iyi sonucu 5,75 ile D+T5 grubu verdi. Bcl-2 sonuçları değerlendirildiğinde, doksorubisin grubunun Bcl-2 değeri (2,86) diğer tüm gruplara oranla önemli ölçüde düşük çıktı. Kontrol grubunda bu değer 17,25 çıkarken, D+T5 (18,57), D+T20 (16,36) ve D+R20 (18,98) kontrol grubuyla benzer ve D grubundan daha yüksek Bcl-2 skorları verdi ($p<0,05$).

Sunulan tez çalışmasında, doksorubisinin testis dokusuna zarar verici etkileri ortaya kondu. Timokinon ve resveratrol bileşikleri ise testiküler dokuda doksorubisine bağlı oluşan hasarı önlemede hem spermatolojik hem de patolojik açıdan başarılı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, timokinon, resveratrol, rat, testis.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

Determination of Damage Caused by Doxorubicin and Protective Effects of Various Antioxidants in Rat Testicular Tissue

Ali Erdem ÖZTÜRK

Department of Reproduction and Artificial Insemination

PhD THESIS / KONYA 2021

In the presented thesis, harmful effects of doxorubicin on rat testicular tissue were determined and the protectiveness of thymoquinone and resveratrol have been studied.

A total of 80 male Albino Wistar rats, including 10 groups and 8 male rats in each group, were used in the study. Experimental groups were designed as; control, 15 mg/kg doxorubicin (D), 5mg/kg thymoquinone (T5), 20mg/kg thymoquinone (T20), 5mg/kg resveratrol (R5), 20mg/kg resveratrol (R20), D+T5, D+T20, D+R5 and D+R20. Physiological Saline was administered to the control group every other day by oral gavage. On the doxorubicin group, 15 mg/kg doxorubicin injected intraperitoneally on 10th day of 21 day period and same procedures has been applied with control group then administrated by oral gavage every other day for 21 days. At the end of the 21th day, rats euthanised by cervical dislocation method. After the euthanise, samples collected for spermatologic and pathologic measurements. When the motility values were compared, while the motility was 65.83% in the control group, this rate decreased to 37.5% in the doxorubicin applied groups ($p<0,05$). D+T5 (31.66%) and D+T20 (40%) groups could not reverse the harmful effect of doxorubicin ($p>0,05$), but the D+R5 (54.16%) and D+R20 (61.66%) groups were better than the doxorubicin group. Considering the concentration of epididymal spermatozoa, the doxorubicin group ($66.66x10^6$) significantly reduced the spermatozoa concentration compared to the control group ($181.66x10^6$). In combined applications, all groups provided better results when compared to the doxorubicin group and preventing the decrease in spermatozoa concentration. When the abnormal spermatozoa rates were evaluated, doxorubicin administration significantly increased the rate of abnormal spermatozoa (5.16%) compared to the other groups. Among the combined groups, D+T5 (2,5%), D+T20 (2,16%) and D+R5 (1,41%) groups were able to reduce the abnormal spermatozoon rates when compared to the doxorubicin group. In terms of spermatozoon membrane integrity, doxorubicin administration (50.58%) caused significant damage to membrane integrity. Although the combined applications failed to bring the damage to the spermatozoon membrane to the level of the control group, it significantly reduced the damage caused by doxorubicin. When the mitochondrial activity results were evaluated, the doxorubicin group (46.66%) caused a significant decrease compared to the other groups. Damages on the D+R5 (74.1%) and D+R20 (78.61%) groups were ameliorated according to the doxorubicine group. In acrosomal integrity, administration of doxorubicin (76.05%) significantly reduced acrosomal integrity compared to the control group (86.41%, $p<0,05$). Combined groups could not succeed in removing the acrosome damage consisting of doxorubicin ($p>0,05$).

When the relative testicular weights were evaluated, the group containing doxorubicin (0.3672%) caused a significant decrease compared to the control group (0.4371%), D+T5 (0.4559%),

D+T20 (0.4972%), D+R5 (0.4497%) and D+R20 (0.4845 g) prevented testicular weight loss caused by doxorubicin. Germinative cell layer thickness in animals treated with doxorubicine (32.9 μm) decreased considerably compared to the control (59.91 μm). In the combined groups, D+R5 (58.85 μm) gave the most successful result. When tubulus seminiferus contortus diameters were taken into consideration, it was noted that while the avarege tubulus diameter of control was 308.6 μm, it was measured as 232.33 μm in doxorubicine group. Although D+T5 and D+T20 groups provided some protection against the damaging effect of doxorubicin, their tubulus diameters could not come close to the control. D + R5 (292.59 μm) and D+R20 (292.55 μm) groups preventing the damaging effect of doxorubicin in terms of tubular diameter and brought it closer to the average value of the control ($p<0,05$). When Johnson's testicular score was examined, the best result was found in the control (9.0833). While the only doxorubicin (4.0833) group had considerably low score, the groups containing thymoquinone (T5 and T20) and resveratrol (R5 and R20) gave similar results to that of control ($p>0,05$).

While Bax was 4.19 in the control, this value was 12.37 in the doxorubicin group. Although the amount of Bax in the groups combined with doxorubicin was lower than the doxorubicin group, the D + T5 group (5.75) gave the best result. When the Bcl-2 results were evaluated, the Bcl-2 value of the doxorubicin group (2.86) was significantly lower than all other groups. While this value was 17.25 in the control group, D + T5 (18.57), D + T20 (16.36) and D + R20 (18.98) gave similar results to that of control ($p>0,05$) and gave higher Bcl-2 scores than doxorubicin ($p<0,05$).

In the presented thesis, the damaging effects of doxorubicin on testicular tissue were revealed. Thymoquinone and resveratrol compounds were found to be both spermatologically and pathologically successful in preventing doxorubicin-induced damage to testicular tissue.

Keywords: Doxorubicin, thymoquinone, resveratrol, rat, testes.

1.GİRİŞ

Kanser, modern çağın vebası olarak adlandırılan son derece ölümcül bir hastalıktır. Son yıllarda kanserden ölüm oranları dünyada artış göstermiş, 2018 yılı TUİK verilerine göre Türkiye'de kanserden ölen kişi sayısı 80.213 olarak açıklanmıştır. Genel tabloda %18,4'lük oranla en çok ölüme sebep olan ikinci hastalık olarak belirlenmiştir (TÜİK 2019). Dünya verileri incelendiğinde 2019 yılı istatistiki verilerine göre yılda 9.6 milyon insan kanser nedeni ile hayatını kaybetmektedir (WHO 2019).

İnsanlarda olduğu kadar düzenli kayıtlar tutulmasa da hayvanlarda da kanser oldukça önemli bir yere sahip olmakla birlikte pek çok ölümle sonuçlanan kanser vakaları bildirilmiştir (Morrison 2002).

Antik Mısır papirüslerinde, Babil çivi yazıtlarında ve Hint yazmalarında malign tümörlerden bahsedilmekte, Ebers Papirüsünde (M.Ö. 15. Yy) tümör tedavisinin öldürücü olabileceği bildirilmektedir. Antik anlamda pek çok yerde kansere rastlansa da modern anlamda kanser terimi M.Ö. 460-377 yıları arasında Hipokrat'ın "organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları" anlamıyla kendine karkinoma ya da karkinos olarak isim bulmuş, M.S. 2. yüzyılda ise Galen, yengece benzettiği yapıları bu gün de kullanılan "kanser" ismi ile adlandırmıştır (Hajdu 2004, Atıcı 2007).



Şekil 1. 1. Bir mumyada bulunan 2200 yıllık prostat kanseri (Prates ve ark 2011) ve ilk kez kanserden bahseden Edwin Smith papirüsü (Wikipedia 2020).

İnsanlarda görülen kanser tiplerinin neredeyse tamamı hayvanlarda da gözükmekte, özellikle pet hayvanlarında çeşitli ilaç ve hormonal kullanımlarına da bağlı olarak kanser vakaları oldukça artış göstermektedir. Kanser vakalarının artışı ile birlikte çok sayıda kemoterapötik ilaç da kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçlardan biri de uzun yıllardır kullanılan "doksorubisin" dir. Doksorubisin (D) etken maddeli pek çok ilaç hali hazırda satılmakta olup meme, akciğer, mesane, tiroit bezi ve pek

çok farklı kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır. Doksorubisinin testis dokusu üzerine yaptığı hasarlar birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Shinoda ve ark 1999, Hou ve ark 2005, Brilhante ve ark 2011).

Yapılan tez çalışmasında, farklı kanser türlerinde kemoterapötik olarak kullanılan doksorubisine bağlı oluşan testiküler doku hasarlarını belirlemek ve kanser tedavisi görmüş hastalarda oluşan uzun süreli azospermi vakalarının önüne geçmek amacıyla deney hayvanı olarak seçilen ratlara, timokinon (T) ve resveratrol (R) uygulanmıştır. Doksorubisinin rat spermatolojik parametreleri ve testis dokusu üzerine oluşturduğu hasarlar çeşitli analizler ışığında belirlenmiş, timokinon ve resveratrolün koruyucu etkinliği histopatolojik ve immunohistokimyasal parametreler ile ortaya konmuştur.

1.1. Rat Fizyolojisi

Rat, pek çok bilim dalının çalışmalarında tercih ettiği bir deney hayvanıdır. Günümüzde kullanılan laboratuvar ratlarının kökeni *Rattus norvegicus* türüne aittir (Dwinell 2010, Sharp ve Villano 2012).

Ratların vücut sıcaklıkları 35,9-37,5°C'tır. Optimal yaşabilecekleri çevre sıcaklığı 20-26 ºC arasındadır. Erkek ratların 31,6- 32,5ºC arası yüksek sıcaklıklara maruz bırakılması durumunda sıcaklık stresine bağlı olarak geri dönüşümsüz testis dejenerasyonları gözlenmektedir (Soylu 2010, Suckow ve ark 2019).

Uygulanan ışık süresi, üreme fizyolojisi üzerine oldukça etkilidir. 12 saat aydınlık/12 saat karanlığa maruz bırakılan dişi ratlarda östrus 4 gün sürerken, bu denge 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olan ratlarda 5 gün sürmektedir. Aydınlık ortamda 22 saat bırakılan ratlarda östrus düzensizlikleri ve üreme problemlerinin arttığı görülmüştür (Soylu 2010, Suckow ve ark 2019).

1.1.1. Cinsiyet Tespiti

Ratlarda cinsiyet tespiti perineal bölgeye bakılarak, genital organlarının gelişmemiş olmasından dolayı 2 haftalık yaştan sonra yapılır. Erkeklerde testisler, anüs ve üretral açıklığın arasında kalan bölgede görülür. Ancak kimi zaman ratların tutuluş pozisyonlarına da bağlı olarak testislerin abdomen içerisine çekildiği görülmektedir. Bu durumda anogenital aralığa (üretra ve anüs arasındaki uzaklık) bakılır. Anogenital aralık dişilerde (Dş) erkeklere göre daha kısadır. Erkek ratlarda

meme ucu bulunmadığından memelere bakılarak da dişiler tespit edilebilir (Suckow ve ark 2019).

Erkek rat testislerinin skrotuma inmesi doğumdan sonraki 30. ve 40. gün arasında gerçekleşir. Ratlarda inguinal kanal kapanmadığı için testisler abdomen ve skrotum arasında hareket edebilir.

Erkek ratların eklenti bezleri ampulla ductus deferens, veziküla seminalis, prostat, glandula bulboüretralis ve koagülasyon bezden ibarettir. Özellikle vesicula seminalis ve koagulasyon bezi oldukça önemli olmakta ve çiftleşme sonrası oluşan vaginal plak'ın bu bezlerin salgılarıyla oluştuğu bilinmektedir. Vaginal plak, çiftleşmenin bir belirteci olduğu gibi nadiren de olsa plak oluşmadan da gebelikler gözlenebilmektedir (Sofikitis ve ark 1992).

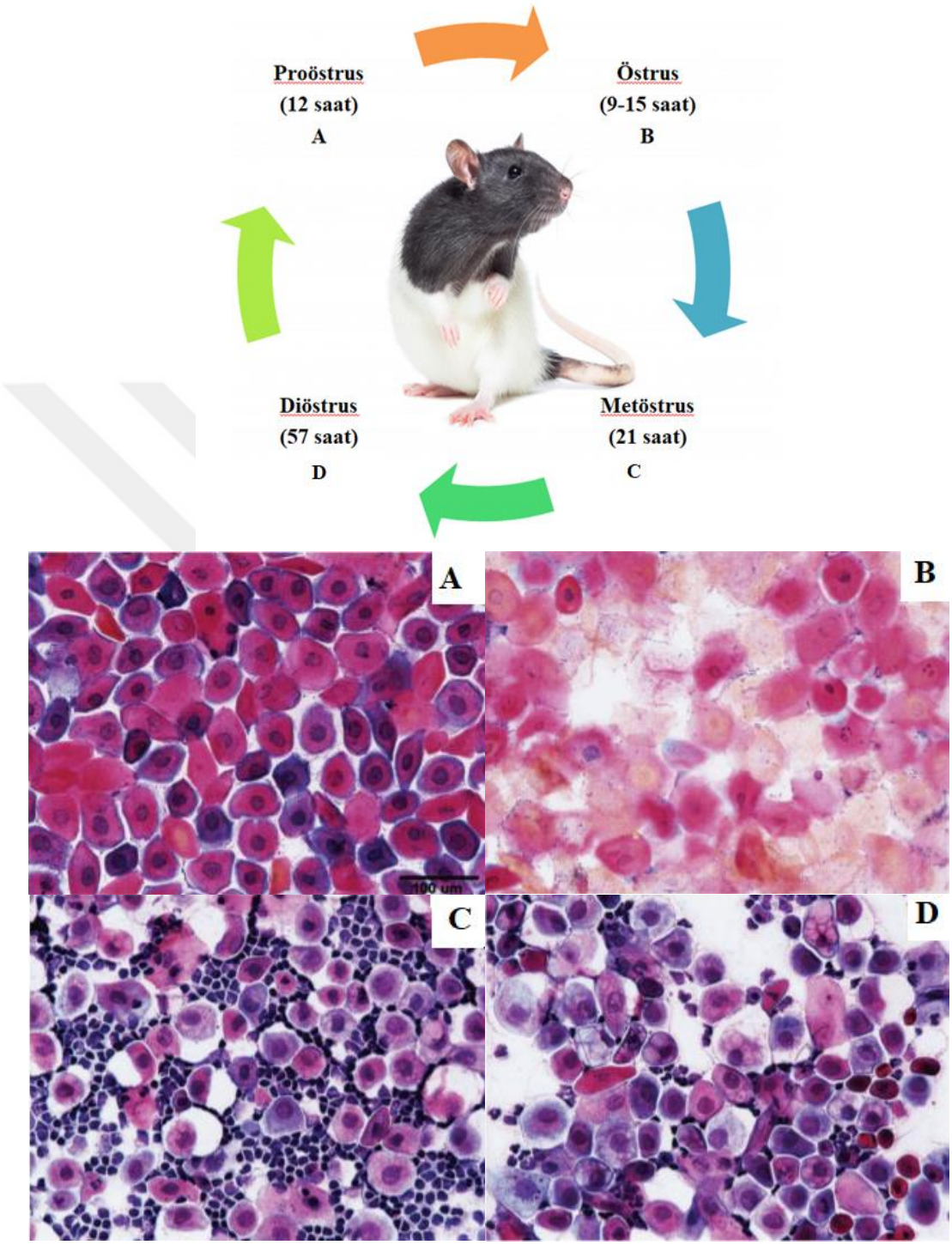
1.1.2. Pubertas

Pubertas (seksüel aktivitenin başlangıcı) yaşı ratın ırkına ve çevre şartlarına bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir. Nagatani ve ark (2000) leptin düzeyinin artmasıyla pubertanın uyarıldığını bildirmektedir. Erkek ratta sperma üretimi testislerin skrotuma indiği 30-45 günlük yaşta başlar ancak optimal üretim yoğnluğu 75 günlük yaşa geldiklerinde oluşur. Dişilerde ise 33-52 günlük yaşta vaginal açıklığın oluşması ile pubertas başlar ve östrus siklusları da vaginal açılmanın bir hafta sonrasında gözlenir (Mohr ve ark 1992, Maeda ve ark 2000).

1.1.3. Seksüel Siklus

Mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlar olan ratlar, postpartum dönem de dahil olmak üzere yaşlanana kadar östrus gösterirler. Seksüel sikluslar proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus dönemleri olmak üzere 4-5 gün sürer. Proöstrus 12 saat sürer ve dişi erkeği kabul etmeye başlar. Bu dönemde vajinal sitolojide çekirdekli epitel hücreleri görülür. Östrus evresi 12 (9-15) saat devam eder, dişi çiftleşmeye izin verir ve lordozis (sırtın içbükey yapılıp genital bölgenin açığa çıkarılması) gözlenir (Suckow ve ark 2019). Vajinal sitolojiye östrusta hâkim olan hücre tipi keratinize superficial hücrelerdir. Metöstrus, östrustan sonra gelen ve dişinin erkeği kabul etmeyi bıraktığı 21 saatlik dönemi kapsar. Vaginal sitolojide çekirdekli ve anükleer kornifiye hücrelere ek olarak lökositler de görülür. Metöstrustan sonra gelen diöstrus

ise 57 saat sürer ve vajinal sitolojide çoğunlukla lökositler görülür (Agca 2020, Lohmiller ve ark 2020)(Şekil 1.2.).



Şekil 1. 2. Rat seksüel siklusu, proöstrus dönemindeki yoğun çekirdekli epitel hücreler (intermedier hücreler) (A), östrus dönemindeki keratinize olmuş çekirdeksiz hücreler (anükleer hücreler) (B), metöstrus döneminde keratinize olmuş hücreler ve bir miktar eritrosit (C) ve eritrosit yoğunluklu diöstrus dönemi (D) (Hubscher ve ark 2005).

1.1.4. Çiftleşme

Fotoperiyot ratlarda çiftleşme üzerine direkt etkilidir. Çiftleşme davranışı fotoperiyodun karanlık evresinde görülür. Çiftleşmeden sonra vaginanın içerisinde veziküla seminalis ve koagulasyon bezleri salgılarının pıhtılaşmasıyla bir vajinal tıkaç oluşur (Matthews Jr ve Adler 1978). Vajinal tıkaç spermartozoanın uterusa ulaşmalarında rol oynar (Carballada ve Esponda 1992). Aynı zamanda vaginal tıkacın spermatozoa deposu olup spermatozoanın aralıklarla salınımına neden olan ya da spermatozoanın vaginadan geri kaçmasına engel olan bir yapı olduğu da düşünülmektedir (Sofikitis ve ark 1992). Yavru sayısı ve vaginal tıkaç büyüklüğü arasında bir ilişki yoktur.Carballada ve Esponda (1993) yaptıkları çalışmada eklenti bezleri çıkarılmış erkeklerle çiftleşen dişilerde gebelik oluşmadığını ortaya koymuşlardır(Soylu 2010).

1.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu ve Oksidatif Stres

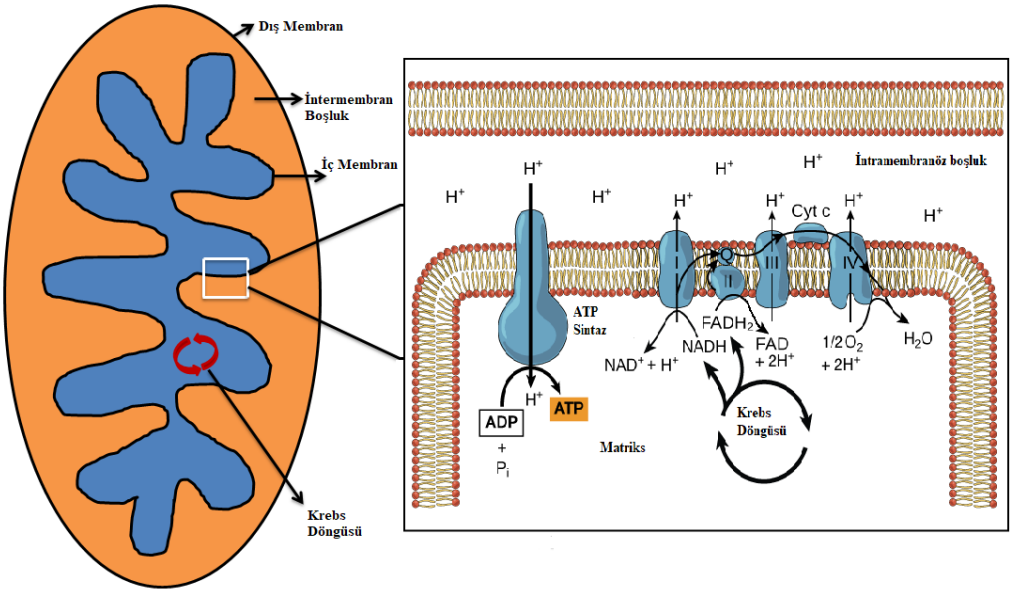
Hücresel işleyiş sürecinde serbest oksijen radikalleri (ROS) mitokondrial enerji üretiminde meydana gelen elektron kaçakları nedeniyle sürekli olarak oluşmaktadır. Hali hazırda vücutta normal olarak üretilen ve antioksidatif savunma mekanizması ile tehlikesiz boyutlarda tutulan ROS organel ve membrana zarar verememektedir (Conklin 2004). Üretilen bu serbest radikaller, optimal sınırlar içinde tutulduklarında, zararlarının yanında yararları da vardır. Serbest oksijen radikalleri, vücutta sinyal iletimi ve fagositlerin bakterisit etkinliğinin devamlılığında rol oynaması bakımından oldukça önemlidir (Dupré-Crochet ve ark 2013, Schieber ve Chandel 2014, Brown ve Griendling 2015).

Mitokondrideki ROS oluşum mekanizması detaylandırılacak olursa, iç mitokondriyal matrikste meydana gelen Krebs döngüsü sonucunda oluşan $NADH^+$ ve $FADH_2$ oksidasyona uğrayarak $NAD^+ + H^+ + 2e^-$ ve $FAD^+ + 2H^+$ açığa çıkar. Meydana gelen bu oksidasyon sonucunda yüksek miktarda proton gradyanı (H^+) ve çok yüksek enerjiye sahip elektron ($2e^-$) salınımları olur. Bu elektronlar elektron taşınma zinciri denen bir sistem içerisine girerek adeta bir motorun çalışması için gerekli olan marş görevi görürler. Sistem içerisindeki elektronlar iç mitokondrial membranda yer alan koenzim Q ve sitokrom C denen moleküllerin yardımı ile sırasıyla kompleks 1, kompleks 3 ve kompleks 4 denen yapılardan geçerek yüksek enerjilerini kaybederler. Her bir kompleksten geçtikleri esnada iç mitokondrial

membranda bulunan 1 proton gradyanını intramembranöz ortama iterek intramembranöz ortamda yüksek miktarda proton birikmesine neden olurlar. Kompleks 4 den çıkan elektronlar iç mitokondrial membranda serbest halde bulunan hidrojen ve oksijen ile birleşerek su meydana getirirler. Her bir elektron transport zinciri sonucunda intramembranöz ortama itilen proton gradyanları, iç mitokondrial membranda bulunan ATP sintaz denen ve protein yapıda bulunan bir kanal yardımı ile tekrar iç mitokondrial membrana geçmek üzere yola çıkarlar. Ancak ATP sintaz kanalı bir jet motoru türbini gibi çalışarak hareket halindeki protonları, serbest ADP ve fosfat (P) grupları ile çarpıştırarak ATP oluşumunu sağlar (Piomboni ve ark 2012, Öztürk ve ark 2019) (Şekil 1.3.).

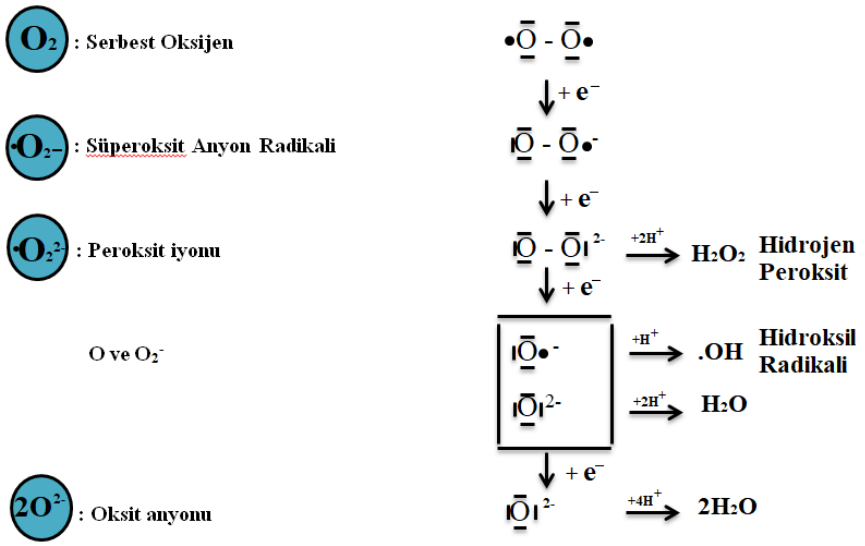
Optimal sınırlar içerisinde tutulamayan ROS, spermada lipid peroksidasyonu (LPO), Adenozin Tri Fosfat (ATP) tüketiminin artması ve motilite kaybı gibi etmenler ile sperm fizyolojisine doğrudan etki etmektedir (de Lamirande ve ark 1997).

Hücrelerde başlıca ROS oluşum kaynağı mitokondridir. Sperm mitokondrisi yapısında sitokrom C, sitokrom C oksidazın alt üniteleri, laktat dehidrojenaz (LDH) ve piruvat E_1 dekarboksilaz gibi protein izoformları ve izoenzimler bulunur (Piomboni ve ark 2012). Ancak, dokularda bulunan moleküler oksijenin büyük çoğunluğu mitokondrial membranda bulunan sitokrom C oksidaz (Sit O) aracılığı ile elektron transport zincirine katılır ve burada 4 e^- alarak su ve ATP oluşumuna katkıda bulunur. Ancak oksijenin %1-5'i bu zincirleme reaksiyondan sapar ve ROS oluşum reaksiyonlarını başlatırlar (Liu ve ark 2002).



Şekil 1.3. Spermatozoon mitokondrisinde meydana gelen elektron transport zinciri ve ATP üretim mekanizması (Lumen 2016, Öztürk ve Bucak 2019).

Mitokondrial membranda meydana gelen elektron transport zinciri reaksiyonları çeşitli stres faktörlerinin (kemoterapötikler, radyasyon vb.) etkisi ile bozulduklarında çok daha fazla elektron kaçağı oluşur. Elektron kaçakları ortamda serbest halde bulunan oksijen ile karşılaşarak çeşitli radikallerin oluşumuna neden olmaktadırlar. Öncelikle süperoksit anyon radikaline dönüşen serbest oksijenler, su oluşumuna kadar geçen yolda aldıkları çeşitli elektron ve protonlar nedeni ile çeşitli radikallere dönüşmektedirler (Henkel 2011) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Serbest oksijenin aşama aşama elektron ve proton alarak radikalleşmesi ve su oluşumuna giden yol (Henkel 2011).

Moleküler oksijenler ilk olarak bir elektron alarak süperoksit radikalini (O_2^-) oluşturur. Süperoksit radikali kendiliğinden H_2O_2'e dönüşebildiği gibi genellikle çoğu zaman süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalize edilerek H_2O_2'e dönüşürler. Oluşan H_2O_2 direkt olarak katalaz ya da GPx ile suya dönüştürülebilir. Ancak kimi zaman H_2O_2 geçişli metaller ile (demir ile Fenton reaksiyonu) ya da direkt süperoksit radikaliyle (Harber-Weiss reaksiyonu) tepkimeye girerek bilinen en tehlikeli radikal olan hidroksil radikalini (HO^-) oluşturur ve hidroksil radikalinin ortamda bulunan H^+ atomu ile redüksiyonu ile su meydana gelir (Florence 1984, Halliwell ve Gutteridge 2015).

Oksijenin redüksiyonu ile süperoksit radikallerinin oluşması için gereken elektronların kaynağı yalnızca bozulan mitokondrial membran stabilitesi değildir. Süperoksit radikalleri, ksantin oksidaz (X_{ox}) ve NADPH oksidaz gibi enzimlerin aktivitelerinin son ürünü olarak da ortaya çıkabilirler (McCord ve Fridovich 1968). NADPH oksidaz enzimi aktivitesi Doksorubisin'in etki mekanizması kısmında detaylıca anlatılmıştır.

1.2.1. Süperoksit Anyonu

Süperoksit (O_2^-), oksijen atomunun II*2p orbitaline bir elektron bağlaması ile oluşan radikal bir anyondur. Sıvı ortamlarda zayıf bir oksidan olan süperoksit anyonu, askorbik asit ve tioller gibi molekülleri okside edebilecek güçtedir. Ancak

sitokrom c ve ferrik-EDTA gibi demir kompleksleri de güçlü bir biçimde redükte edebilirler. Süperoksit anyonu sulu solüsyonlarda hidrojen alarak hidrojen peroksit ve serbest oksijene dönüşebilmektedir (Gutteridge 1994)(Şekil 1.5.).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Şekil 1.5. Süperoksit anyonunun hidrojen perokside dönüşmesi.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenen bu reaksiyon, O_2^- anyonunun sitokrom c ile reaksiyonu hariç, O_2^- reaktivitesinin sınırlı olması bakımından predominant bir reaksiyondur (Simic ve ark 1989).

1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, ortamda bulunan süperoksit anyonunun 2 adet serbest proton alması ve SOD ile katalizlenmesi sonucu oluşan düşük reaktiviteli bir radikaldir. SOD a bağlı olmadan ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-amino asit oksidaz da direkt olarak H_2O_2 meydana getirebilmektedirler. Ortamda metal iyonlarının varlığında yüksek reaktiviteye sahip olan hidrojen peroksit, ortamdan bir elektron alarak hidroksil radikaline dönüşebilmektedir (Gutteridge 1994) (Şekil 1.6.).

$$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH$$

Şekil 1.6. Hidrojen peroksidin elektron alarak hidroksil anyonuna dönüşmesi.

NADP(H) dehidrojenaz enzim aktivitesinin bir sonucu olarak da ortaya çıkan hidrojen peroksit, kendi başına reaktivitesi az olmasına rağmen demir iyonları varlığında, çeşitli sebepler ile elektron kaçaklarının olduğu durumlarda hızlıca hidroksil radikaline dönüşebilmesi bakımından hücre içi yapılarda tehlike arz etmektedir. Hücrede istenmeyen hidrojen peroksit ise katalaz ve glutatyon peroksit gibi enzimler ile yok edilebilmektedir (Gutteridge 1994, Halliwell ve Gutteridge 2015).

1.2.3. Hidroksil Radikali (.OH)

Hidroksil radikali, suyun yüksek enerjili iyonize radyasyon ile tepkimesi sonucu (Şekil 1.7.) oluştuğu gibi, H_2O_2 in demire bağlı dekompozisyonu (Fenton reaksiyonu, Şekil 1.8.) sonucu da oluşabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1990).

$$H_2O \rightarrow {}^{\cdot}OH + H^{\cdot} + E_{aq} + H_2O_2$$

Şekil 1.7. Suyun yüksek enerjili radyasyon ile tepkimesi sonucu hidroksil radikali oluşumu.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\cdot}OH$$

Şekil 1.8. Fenton reaksiyonu ile hidroen peroksitten hidroksil radikali oluşumu.

Çok saldırgan bir radikal olan ·OH, oluştuğu bölgeye göre farklı hasarlar verebilmektedir. Örneğin DNA yakınlarında oluştuğu takdirde pürin ve primidin bazlarında modifikasyona yol açarak DNA kırıklarına sebep olurken, laktat dehidrojenaz gibi enzimatik moleküllerin yanında şekillendiğinde ise o enzimi inaktive ederek işlevsizleştirmektedir (Mello Filho ve ark 1984, Halliwell ve Gutteridge 1986).

1.3. Lipid Peroksidasyon Hasarı (LPO)

Çeşitli etmenlere bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikaller, hücrede LPO hasarına neden olmaktadır. Mitokondrideki elektron transport zincirinde ortaya çıkan reaktif oksijen grupları, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerince zengin membran fosfolipidlerine etki ederler. Hücrelerdeki membran fosfolipidleri yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşürler ve oldukça mutajenik ya da sitotoksik son ürünler açığa çıkmaktadır. Bu duruma lipid peroksidasyonu denir (Yarsan 2014, Öztürk ve ark 2019). LPO üç fazdan oluşmaktadır;

1. Başlangıç Fazı: Başlangıç fazında, yüksek reaktivitedeki OH- ya da hidroksiperoksil radikali (-HO_2) lipid katmandaki çoklu doymamış yağ asitlerine etkiyerek ortamdan bir proton (H+) koparır, mevcut yapıyı lipid radikaline dönüştürür ve su açığa çıkarır. H_2O_2 gibi düşük reaktivitedeki oksijen grupları bu reaksiyonu başlatamazlar (Blake ve ark 1987). Mevcut durumda lipid radikalleri serbest haldeki elektronlara sahip çeşitli formlarda olabilirler. Bu aşamada lipid radikalleri moleküler oksijen ile tepkimeye girerek lipid perokside dönüşebilirler.

2. Yayılma Fazı: Yayılma fazında, bir önceki fazda oluşan lipid radikali, moleküler oksijen ile birleşir ve lipid peroksit radikalini oluşturur. Lipid peroksit

radikali, komşu bir yağ asidi ile reaksiyona girerek yeni bir lipid peroksidini oluşturur ve kendisi lipid hidroperoksili halini alır. Bu şekilde devam eden reaksiyonlar bütününe de "radikal zincir reaksiyonu" denir. Bu yayılımdaki LPO olayı membran lipidlerinin %60'ını etkilemektedir (Kothari ve ark 2010).

3. Bitiş Fazı: Bitiş fazında iki ve daha fazla lipid radikali birbiriyle bağ oluşturarak son aşamada tehlikeli özelliklere sahip malondialdehit (MDA), 4-Hidroksi-2- Alken ve 2- Alkenal gibi hidroperoksil radikallerini oluşturur (Henkel 2011).

Çeşitli etmenlere bağlı olarak ortaya çıkan ve hücresel yapılara zarar veren serbest radikaller, hücresel antioksidatif savunma sistemi ile durdurulabilmektedirler. Ancak hücresel savunmanın yeterli olmadığı durumlarda serbest radikaller hücresel yapılara zarar vererek apoptozis ya da nekrozise giden bir zincirleme reaksiyonu başlatırlar. Bu reaksiyonun zayıflatılması için hücrelere dışarıdan çeşitli antioksidatif özellikli katkılar yapılmaktadır (Valko ve ark 2006, Öztürk ve ark 2019).

1.4. Antioksidanlar ve Antioksidatif Etki

Antioksidanlar, hücre içerisinde kendiliğinden bulunan, düşük miktarlardaki ROS ve reaktif metabolitlerin zararlı etkilerini azaltan ajanlardır. Normal ve sağlıklı hücresel döngüde oksidanlar ve antioksidanlar tamamen bir denge halindedir. Çeşitli sebepler (radyasyon, kemoterapötikler, soğuk şoku vb.) nedeni ile bozulan bu dengede artan oksidanlara bağlı olarak oluşan oksidatif stresin giderilmesi için çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır (Ďuračková ve Gvozdjáková 2008).

Antioksidanların sınıflandırılması pek çok kaynak tarafından farklı biçimlerde yapılmıştır. Kasapçopur Özel ve Birdane (2014)'den modifiye edilerek yapılarına göre bazı antioksidanlar aşağıda sınıflandırılmıştır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması.

ANTİOKSİDANLAR
Enzimler ⟶ SOD, GPx, CAT vb.
Vitaminler ⟶ Vitamin C (Askorbik Asit), Vitamin E (α-tokoferol), Vitamin K
Karetenoidler ⟶ β-Karoten, Likopen
Tiyol Bileşikleri ⟶ GSH, Sistein, Metionin, Taurin vb.
Flavonlar ⟶ Quarcetin, Taxifolin, Hesperetin vb.
Polifenoller ⟶ Resveratrol, Ferulik Asit vb.
Melatonin
Diğer Antioksidan Etkili Maddeler ⟶ Lesitin, Probukol, Tamoksifen vb.

Antioksidanlar hücre ve dokularda;

- ROS oluşumunun önlenmesi,
- LPO ve buna bağlı zincir reaksiyonlarının önlenmesi,
- Başlamış zincir reaksiyonunun durdurulması,
- Oksidatif hasarın onarımı,
- Hasar görmüş moleküllerin eliminasyonu,
- Tamir edilemez genetik moleküllerin mutasyonunun önlenmesi

gibi hayati öneme sahip görevler üstlenirler (Cheeseman ve Slater 1993).

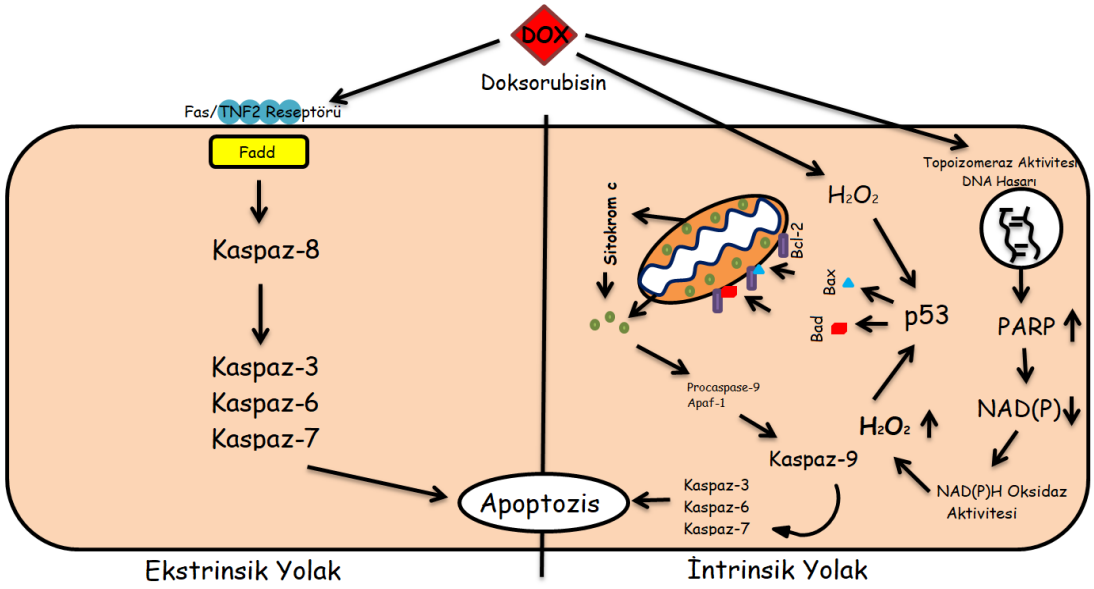
Antioksidanlar sahip oldukları hidroksil gruplarını kullanarak serbest radikallere bağlanır ve onları nötralize ederler. Antioksidanlar antioksidatif koruyuculuklarını üç farklı yol ile gösterebilirler. İlk yol, ROS oluşumunun önlenmesi ya da ROS miktarını minimum seviyede tutma esasına dayanır. Desferrioksamin, demir iyonuna bağlanabilme yeteneği ile ilk yolu izleyen antioksidanlara iyi bir örnektir. Flavanoid grubundan taksifolin, kuarsetin, kateşin ve narinjin de ROS temizleyici olarak bu gruba verilebilecek örnekler arasında yer almaktadırlar. İkinci etki mekanizmasında ise ROS etkisini durdurmak için katalitik ya da non-katalitik moleküllerin kullanılması esas alınır. Bu bağlamda askorbik asit ve alfa tokoferol bu yolu izleyen bazı antioksidanlardır. Üçüncü tip antioksidanlar ise hasar görmüş yapıları onaran antioksidanlardır. Bu tip antioksidanlara en iyi örnek ise glutatyon gösterilebilir. Glutatyon, plazma membranında aminoasit

taşınmasını sağlamak, Vitamin E ve Vitamin C gibi antioksidanların üretimine katkıda bulunmak gibi çeşitli işlevleri de yerine getirebilmektedir (Kohen ve Nyska 2002, Kunwar ve Priyadarsini 2011, Karabulut ve Gülay 2016, Öztürk ve Bucak 2019).

1.5. Doksorubisin ve Etki Mekanizması

Doksorubisin, ilk olarak 1967 yılında İtalyan Farmitalia Araştırma Laboratuvarları tarafından *Streptomyces peucetius var. caesius* türü bakterilerden elde edilen geniş spektrumlu bir antineoplastik ajandır. Hastalar tarafından kırmızı renginden dolayı Kırmızı Şeytan (Red Devil) olarak adlandırılan doksorubisin, tüm yaş grubundan hastalarda meme, mide, tiroid, prostat, testis, Wilms tümörü, Hodking lenfoma ve benzeri pek çok kanser türünde birinci basamak tedavide kullanılmaktadır (Speth ve ark 1988). Tüm bu hastalıkların tedavisinde kullanılan Doksorubisin'in yan etkileri seçici olmayan bir biçimde tüm hücreler üzerine sitotoksik etkilidir. Doksorubisin etkinliğini DNA ve RNA polimerazların fonksiyonunu baskılaması, DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu bozması ve topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA'nın onarılmasına engel olması yoluyla göstermektedir (Swift ve ark 2006). Topoizomeraz enzimleri, DNA zincirlerini kırıp birbirleri üzerinden geçirip tekrar birleştirerek DNA'nın topolojik yapısını değiştirmektedirler. Topoizomeraz I tek zincirlerin, Topoizomeraz II çift zincirlerin kırılmasını katalize etmektedirler. Doksorubisin ise bir topoizomeraz inhibitörü olarak DNA zincirlerinin kırılıp yeniden birleştirilmesini engellemekte ve DNA zincirlerinde geri dönüşümsüz kırıkların meydana gelmesine sebep olmaktadır. Bu etkisini topoizomeraz enzimlerinin DNA zincirlerini kırması ile oluşan Topoizomeraz-DNA komplekslerini stabilize ederek göstermektedir (Helvacıoğlu ve ark 2018).

Doksorubisin hücreler üzerine sitotoksik etkisini iki şekilde göstermektedir. Bunlardan ilki direkt kaspazlar aktivitesi ile (kaspaz-8) apoptoza sürükleyerek gerçekleşirken (ekstrinsik yolak), bir diğeri hücre içi ROS miktarının yükselmesine bağlı olarak oluşan apoptoz yoludur (İntrinsik yolak) (Mizutani ve ark 2005)(Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Doksorubisin'in hücre içi etki mekanizması.

Apoptozis, bir diğer deyişle programlı hücre ölümü, hücre içi kaspazların aktivasyonu ile meydana gelmektedir. Kaspazlar aktivatör (başlatıcı), efektör ve inflamatuvar kaspazlar olmak üzere başlıca 3 gruba ayrılırlar (Fan ve ark 2005) (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Primer antikorlara göre immunohistokimyasal boyama protokolleri

Kaspaz Türleri	Kaspazlar
Aktivatör Kaspazlar	Kaspaz 2,8,9,10
Efektör Kaspazlar	Kaspaz 3,6,7
İflamatuvar Kaspazlar	Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14,15

Kaspazlar hücrede varlıklarını zimojen granüller içerisindeki prokaspazlar olarak sürdürürler (Samali ve ark 1998). Aktivasyonları üç ana mekanizmayla gerçekleşir;

1. Başlatıcı bir kaspaz tarafından proteolitik kesim sonucu aktivasyon (granzim-B).

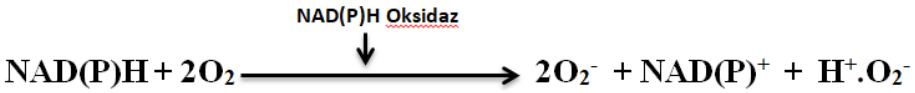
2. Yakın uyarılma ile aktivasyon (prokaspaz-8 aktivasyonu)

3. Holoenzimler aracılığı ile aktivasyon (prokaspaz-9 aktivasyonu) (Yıldırım ve ark 2007).

Kaspazlar çalışma prensibi bakımından birbirlerini aktifleştirerek etki ederler. Aktivatör kaspazlar çeşitli uyarımlar vasıtasıyla aldıkları apoptoz sinyallerini efektör kaspazlara ileten başlatıcı kaspazlardır. Efektör kaspazlar ise apoptozu, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimerazı (PARP) parçalayarak oluştururlar (Ulukaya ve ark 2003). Inflamatuar kaspazlar ise inflamasyon anında apoptozisi başlatan ve hücre içi savunma sistemini harekete geçiren kaspazlardır (Martinon ve Tschopp 2004).

Apoptoza sürüklenen yolda, kaspaz stimulasyonu için 2 ana metabolik yolak vardır. Bunlardan ilki ekstrinsik yolak olarak adlandırılmaktadır. Hücrelerin dış membranında lokalize olan Fas/TNF2 reseptörü aracılığı ile Fadd (Fas reseptörü ile ilişkili apoptoz yolağı) yolağının aktive olması ve bu yolak ile aktivatör (başlatıcı) kaspazlardan olan kaspaz-8'in aktivasyonu ile ortaya çıkmaktadır.

İkinci yolak olan intrinsik yolak ise hücre mitokondrisinden sitokrom-C salınımı ile apoptoz aktivatör faktör (Apaf-1) aktivasyonu ile başlayan ve bir diğer aktivatör kaspaz olan kaspaz-9'un aktivasyonu ile devam eden yolaktır. Bu yolak kendi içerisinde H_2O_2 in kaynağına göre iki kısıma ayrılmaktadır. İlk olarak Doksorubisinin oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan H_2O_2, yukarıda belirtildiği üzere, topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek direkt DNA kırıklarına yol açmaktadır. Meydana gelen DNA kırıklarının tamiri için hücre içerisinde kendiliğinden bulunan ve DNA hasarlarını tamir etmekle görevli bir enzim olan PARP'ın aktivasyonunu artırır (Hiperaktivasyon) (Agarwal ve ark 2009, Öztürk ve ark 2019). PARP hiperaktivasyonu ile ortamda bulunan NAD^+ ve $NADP^+$ yoğun bir biçimde tüketilmektedir. Tüketilen NAD^+ ve $NADP^+$ nin yerine konması için (hücresel redoks döngüsünün sağlanabilmesi için) NAD(P)H oksidaz enzimi aktivitesinde artış gözlenmektedir. Bu durum aşağıdaki reaksiyon ile açıklanmaktadır (Mizutani ve ark 2005) (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. NAD(P)H oksidaz enzimi aracılığı $NAD(P)^+$ üretimi.

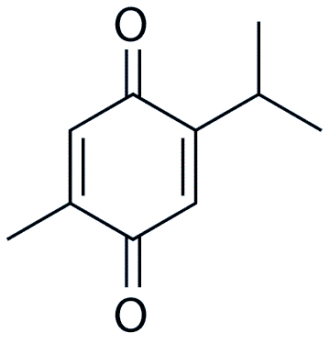
NAD(P)H oksidaz reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan $2O_2^-$ hücrede serbest halde dolaşan hidrojen atomları ile bağ kurarak ortamda daha fazla miktarda H_2O_2 oluşumuna neden olmaktadır (Mizutani ve ark 2005).

Açığa çıkan bu H_2O_2 hücrede çeşitli genlerin ve proteinlerin aktivasyonundan oluşan bir dizi reaksiyonun başlamasına sebep olur. Bu reaksiyonun en önemli ayağı Bcl-2 gen ailesidir. Bcl-2 gen ailesi hem apoptoz indükleyici proapoptotik genleri (Bid, Bax, Bad vb.) hem de apoptoz önleyici anti-apoptotik genleri (Bcl-2, BclXL vb.) içerisinde barındırır (Erdoğan ve Uzaslan 2003). NAD(P)H oksidaz reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan H_2O_2 hücre içerisinde kendiliğinden bulunan p53 genini indükler ve p53 geni Bax ve Bad genleri üzerinde bulunan kendine has reseptörlere bağlanarak proapoptotik faktör aktivasyonunu başlatır. Aktive olan bu iki gen (Bax ve Bad) mitokondrinin dış zarının sitozolik yüzeyinde bulunan Bcl-2 (β cell lymphocyte/leukemia-2 gene) proteinine tutunur. Bcl-2 proteini mitokondrial dış membranın stabilitesinden sorumlu proteindir (Gross ve ark 1999). Hem proapoptotik genleri (Bid, Bax, Bad vb.) baskılayarak apoptozisi inhibe eder hem de sitoplazmada bulunan Bad ve Bax, Bcl-2 ile heterodimerler oluşturarak mitokondri membranından sitokrom C salınımını kontrol altında tutarlar. P53 geni ile aktive olan Bad ve Bax, olağan dışı bir biçimde çok sayıda Bcl-2 genine bağlanır ve Bcl-2 genini translokasyona uğratır. Bu durum sonucunda mitokondrial membran stabilitesinin sağlanamamasına bağlı olarak membrandan sitokrom C kaçakları şekillenir (Kluck ve ark 1997, Kalyanaraman ve ark 2002).

Sağlıklı hücrelerde, Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör-1 (Apaf-1) kendiliğinden bulunan bir moleküldür. Apoptotik hücrelerde artan mitokondrial membran potansiyeli ($\Delta\Psi m$) nedeniyle sitokrom C mitokondrial membranöz boşluktan hücre sitoplazmasına çıkarak Apaf-1'e bağlanır ve apoptozom denen kompleks molekülleri açığa çıkarırlar (Kluck ve ark 1997, Shakeri ve ark 2017). Açığa çıkan apoptozom Prokaspaz-9'u aktive eder ve Prokaspaz-9 vasıtasıyla başlatıcı kaspazlardan Kaspaz-9 u aktive olur. Kaspaz-9 un aktive olması ile hücreyi apoptoza götürecek olan efektör kaspazlardan Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 tetiklenir (Mizutani ve ark 2005). Bu mekanizma Şekil 1.9 da açıkça belirtilmiştir.

1.6. Timokinon ve Koruyucu Etki

Pek çok tıbbi bitki çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve bu sayede çeşitli hastalıklara karşı yeni ilaçlar da geliştirilebilmektedir. Timokinon (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone), çörekotu (*Negilla Sativa*) bitkisi ekstraktı olup özellikle Akdeniz ve Batı Asya bölgelerinde yaygın kullanım alanına sahiptir (Lev ve Amar 2000, Gali-Muhtasib ve ark 2004) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Timokinon molekülünün kimyasal yapısı.

Timokinon, çörekotu bileşenlerinin %30-48 ini oluşturmaktadır ve bitkinin bulunduğu bölgeye bağlı olarak bitkiden elde edilen ekstrakt miktarı da değişmektedir (Burits ve Bucar 2000, Hajhashemi ve ark 2004). Ale-Saleh ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada çörekotu bitkisinin geliştiği bölgelere bağlı olarak timokinon ekstraktı miktarını ölçmüşlerdir. Sudan'da çıkan çörekotlarından 1,274.6 mg/kg timokinon ekstrakte edilirken, Etiyopya bölgesinde çıkan çörekotlarından 3,098.5 mg/kg miktarında timokinon elde etmişlerdir (Al-Saleh ve ark 2006). Timokinon, ROS oluşumunu baskılayarak ve buna bağlı lipid peroksidasyonunun şekillenmesini engelleyerek antioksidatif etki gösterir (Banerjee ve ark 2010, Woo ve ark 2012). Hücrede antioksidatif etkisinin yanı sıra, olasılıkla kemoterapötik ve kemopreventif (kemoterapötiklerin zararlı etkilerini engelleyici) etki de göstermektedir (Reindl ve ark 2008). Kemopreventif etkisini kemoterapötiklerin sitotoksik etkisini ortaya çıkaran ROS oluşumunu baskılayarak gösteren timokinon hücrede ROS temizleyici olarak görev almakta (Mansour ve ark 2002) ve hücre içinde katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon transferaz ve glutatyon (GSH) gibi enzimlerin etkisini de artırmaktadır (Khalife ve Lupidi 2007). Timokinon ve timohidrokinon, hipokampal homejanatlarda demir-askorbat ile indüklenmiş LPO hasarını önlemektedir (Al-Majed ve ark 2006). Abdel-

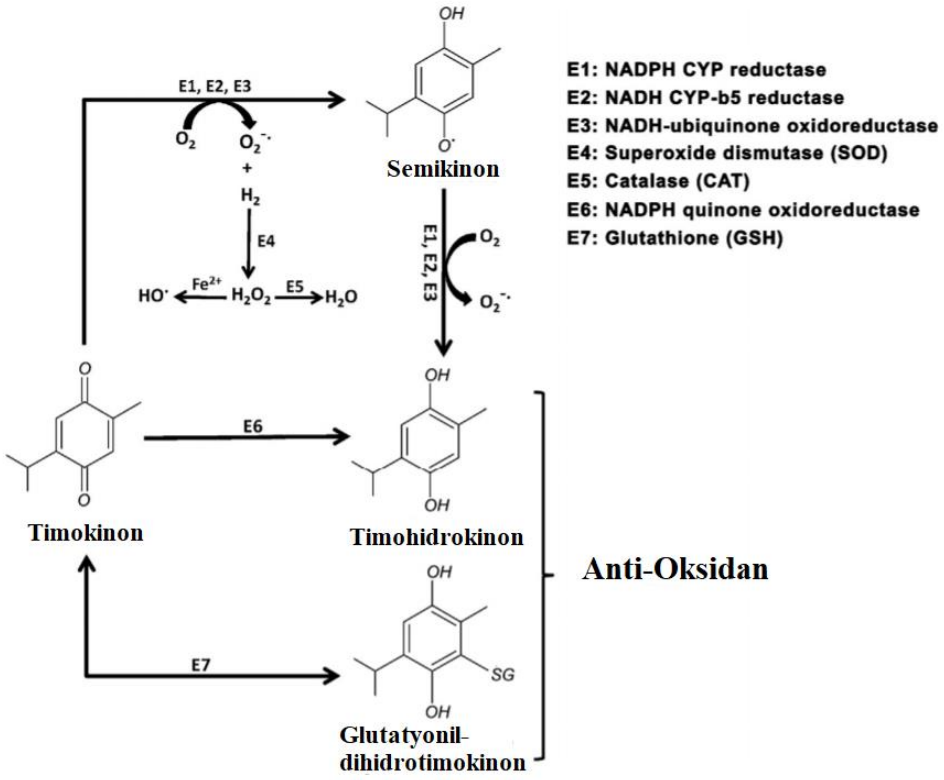
Wahab ve Aly, yaptıkları bir çalışmada timokinonun aflatoksinler ile beslenen ratlarda aflatoksini nötralize ettiğini ortaya koymuşlardır (Abdel-Wahhab ve Aly 2005).

Antikanser ilaçların yan etkileri nedeniyle son yıllarda bilim insanları kemoterapötik özellik gösteren doğal ilaçların peşine düşmüşlerdir. Sindirilebilir formda olması ve sağlıklı dokular üzerinde toksik etkisinin olmaması bakımından timokinon, doğal antikanserojen ekstraktlara güzel bir örnektir. Timokinon, kemoterapötik etkisini şekil 1.9 da bahsedilen intrinsik yolak içerisindeki p53 genini aktive ederek göstermektedir. Yine p53 geni hücredeki Bax ve Bcl-2 stabilitesini bozarak mitokondrial membrandan sitokrom C salınımına neden olur ve apoptoz medyatörü olan kaspaz 3 ve 8 in aktivasyonunu başlatır (El-Mahdy ve ark 2005). Timokinonun antikanserojenik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada Ulasli ve arkadaşları, Benzo(a)piren'e maruz bırakılan A549 (küçük olmayan) akciğer kanseri hücrelerinde timokinon ile tedavinin Bax proteinini artırdığını, Bcl-2 proteinini azalttığını ve Bax/Bcl-2 oranını artırdığını ortaya koymuşlardır (Ulasli ve ark 2013).

Daha önce yapılan çalışma sonuçları değerlendirildiğinde timokinonun hem antioksidatif hem de kemoterapötik etkilere sahip olduğu anlaşılmıştır. Tezde kemoterapötik olarak seçilen doksorubisinin sitotoksik etkisine karşın timokinonun koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmalardan birinde ratlarda doksorubisine bağlı nefrotoksisite olgularına karşı kullanılan 50 mg/kg dozundaki timokinonun 21 günlük oral uygulamalarında doksorubisine bağlı gelişen redoks dengesizliğini tersine çevirebildiği ve böbrek hücreleri üzerine koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur (Elsherbiny ve El-Sherbiny 2014). Ayan ve ark (2016) testis torsiyonu nedeni ile testislere kan gitmemesi sonucunda testikuler hücrelerde meydana gelen ROS oluşumunun timokinon ile azaltılabileceği fikrinden yola çıkarak, 50mg/kg dozunda timokinonun intraperitoneal uygulamalarının ROS oluşumunu baskıladığını belirtmişlerdir.

Timokinonun hem antioksidatif hem de kemoterapötik etkisi kafa karıştırıcı olabilir. Hücrede meydana gelen redoks döngüsü esnasındaki enzimatik aktivitelere bağlı olarak timokinonun yapısını değişebilmektedir. Timokinon, iki basamakta tek elektron redüksiyonu ile antioksidatif özellik kazandığı gibi tek seferde iki elektron redüksiyonu ile de antioksidatif özellik kazanabilmektedir (Khan 2018). NADPH-

CYP redüktaz (E1) , NADH-CYP-b5 redüktaz (E2) ve NADH-ubiquinone oksiredüktaz (E3) enzimlerinin enzimatik aktiviteleri sonucunda tek elektron kaybeden timokinon, sitotoksik bir madde olan semikinona dönüşmektedir. Semikinon, ihtiva ettiği O^- ile timokinonun antikanserojen (pro-oksidan) etkisini ortaya çıkardığı formudur. Semikinon yine yukarıda sayılan enzimlerin (E1, E2 ve E3) etkisi ile yine tek elektron redüksiyonuna uğrayarak ihtiva ettiği hidroksil ($OH^{\cdot}$) grupları ile antioksidatif özellik gösteren timohidrokinona dönüşebilmektedir. Buna ek olarak tek elektronlu redüksiyonun yanı sıra, süperoksit dismutaz (SOD, E4), katalaz (CAT, E5), NADPH quinone oksiredüktaz (E6) ve glutatyon (GSH, E7) enzimlerinin etkisi ile çift elektronlu redüksiyon ile direkt timohidrokinona ve glutatyonil-dihidrotimokinona dönüşebilmektedir. Bu fenomen sayesinde timokinon, semikinon formu ile antikanserojen, timohidrokinon ile de antioksidatif etkiye sahiptir. Bu durumu Darakhshan ve arkadaşları tarafından Şekil 1.12 deki gibi özetlenmiştir (Darakhshan ve ark 2015, Khan 2018).



Şekil 1.12. Timokinonun, NADPH-CYP redüktaz (E1) , NADH-CYP-b5 redüktaz (E2), NADH-ubiquinone oksiredüktaz (E3), süperoksit dismutaz (SOD, E4), katalaz (CAT,E5), NADPH quinone oksiredüktaz (E6) ve glutatyon (GSH,E7) enzimlerinin etkisi ile semikinon, timohidrokinon ve glutatyonil-dihidrotimokinona dönüşmesi (Darakhshan ve ark 2015).

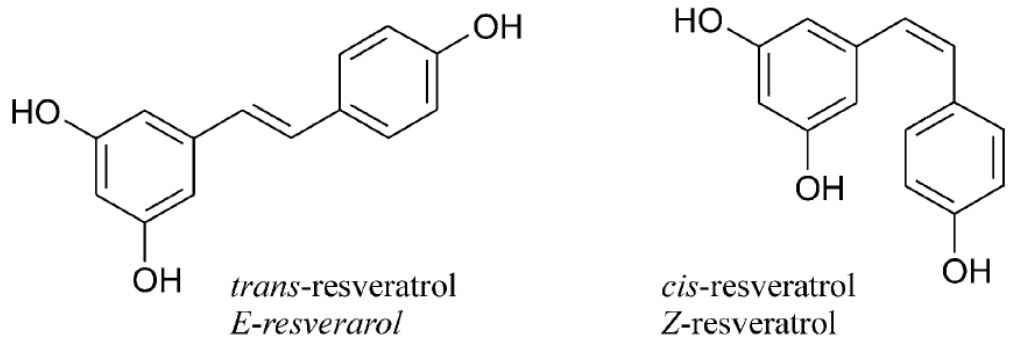
Mabrouk ve Ben (2015) yaptıkları çalışmada içme suyuna kattıkları 2000 ppm dozunda kurşun (Pb) ile oluşturdukları testis toksisitesinin etkilerini azaltmak için günlük 5 mg/kg timokinon kullanmışlardır. Beş hafta süren çalışma sonucunda testisler alınıp antioksidatif enzim aktivitelerine (SOD, GPX, CAT) bakıldığında, timokinon içeren grupların antioksidatif enzim aktivitelerinin en yüksek değerde çıktığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada timokinonun kurşun toksisitesini de azalttığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda timokinonun sodyum nitrit (Alyoussef ve Al-Gayyar 2016), kadmiyum (Sayed ve ark 2014), sodyum valporat (Hala 2011) ve titanyum dioksit (Hassanein ve El-Amir 2017) gibi pek çok kimyasal ile indüklenen testis toksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiği de vurgulanmıştır.

1.7. Resveratrol ve Koruyucu Etkisi

Yüksek miktarda doymuş yağ tüketimi, koroner kalp hastalıklarının (KKH) en önemli etkenidir. Ancak 1992 yılında Renaud ve De Lorgeril Güney Fransa bölgesinde yaşayan insanların KKH'na yakalanma oranının daha düşük olduğunu fark etmişler, Fransız paradoksu olarak adlandırdıkları bu durumun sebebinin ise o bölgede yüksek oranda üzüm ve üzümden yapılan içeceklerin tüketilmesine bağlamışlardır (Renaud ve de Lorgeril 1992). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda, CHD'e karşı koruyucu etki oluşturan asıl etmenin bu ürünlerin ihtiva ettiği Resveratrol olduğunu ortaya konulmuştur (Catalgol ve ark 2012).

Resveratrol (trans-3,5,4′-trihydroxystilbene) iki fenol halkasının birbirine etilen köprüsü ile bağlanmasından oluşan doğal bir fitoaleksindir (Frémont 2000). Üzüm kabuğu, fıstık, dut ve erikte yüksek oranda bulunmaktadır (De La Lastra ve Villegas 2007). Resveratrolün, trans (E-resveratrol) ve cis resveratrol (Z-resveratrol) olarak iki farklı formu bulunmaktadır (Filip ve ark 2003). Doğada yanlızca trans formunda bulunan resveratrol, sulu ortamlarda ya da ultraviyole (UV) ışınlara maruz bırakılarak cis formuna dönüşebilmektedir (Salehi ve ark 2018) (Şekil 1.13.). Trans-resveratrol kırmızı şarap, üzüm kabuğu ya da Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum*) gibi bitkilerden ekstrakte edilip tüketilebilir formda satılabilmektedir. Oral kullanıma uygun olan trans-resveratol karaciğer ve bağırsak metabolizması sayesinde hızlıca emilebilmektedir (Walle ve ark 2004, O'Neil ve ark 2006). Cis resveratrol ise üzüm kabuğundan ekstrakte edilememesine rağmen kırmızı şaraptan izole edilebilmiştir. Bunun sebebinin maya hücreleri tarafından trans resveratrolün

cis resveratrole dönüştürülmesi olduğu düşünülmektedir (Orallo 2006). Yapılan çalışmalarda trans ve cis resveratrolün antioksidatif etkisinin benzer olduğu gözlemlenirken, LPO'unu önleme bakımından trans resveratrolün, cis resveratrole oranla çok daha başarılı olduğu ortaya konmuştur (Fauconneau ve ark 1997, Waffo Teguo ve ark 1998, Orallo 2006).



Şekil 1.13. Resveratrol molekülünün 2 farklı formunun kimyasal yapısı.

Bilim insanları yaptıkları çalışmalar sonucunda resveratrolün antioksidatif, kardiyoprotektif, nöroprotektif, anti imflamatuvar ve antikanserojen özellik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Fan ve ark 2009). Pek çok alanda farklı etkilerinden faydalanılan resveratrolün en çok antioksidatif etkisi ile daha fazla öne çıkmaktadır (Malhotra ve ark 2015). Resveratrolün antioksidatif aktivitesi yapısında bulundurduğu OH· gruplarının molekül üzerindeki konumlarına bağlıdır. Serbest oksijen radikallerinin eliminasyonunda görev almakta olan resveratrol bu etkisini moleküler yapısında bulunan 3-4' ve 5. pozisyonlardaki OH· grupları sayesinde göstermektedir (Stivala ve ark 2001, Szekeres ve ark 2010).

Resveratrol, çeşitli antioksidatif enzimlerin aktivitelerini teşvik etme kabiliyeti sayesinde hem serbest radikal temizleyici hem de güçlü bir antioksidandır (De La Lastra ve Villegas 2007). Resveratrol gibi polifenolik bileşiklerin antioksidan görevi görebilmesi, fenolik hidroksil gruplarının redoks özelliklerine ve kimyasal yapı boyunca elektron delokalizasyon potansiyeline bağlıdır (Aggarwal ve Shishodia 2005).

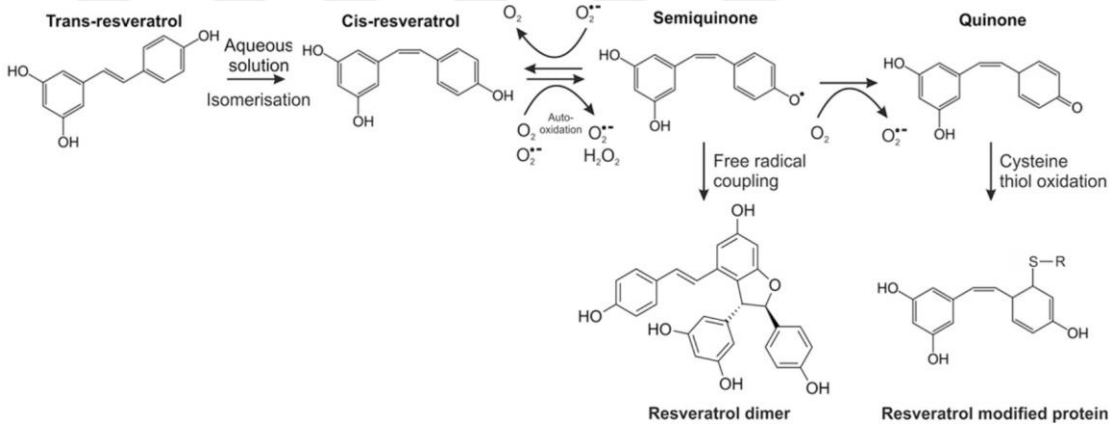
Zini ve arkadaşları resveratrolün antioksidatif etkisini;

i. Koenzim Q ile etkileşime geçerek oksidatif stres zincirinin başlamasını engellemesi

ii. Mitokondri oluşan O_2^- radikallerini süpürmesi

iii. LPO'ya neden olan Fenton reaksiyonu son ürünlerini inhibe ederek LPO'yu önlemesi vasıtası ile göstermektedir (Zini ve ark 1999).

Resveratrolün antioksidatif özellik kazanması tıpkı timokinonda olduğu gibidir. Sıvı ortamlarda izomerizasyona uğrayan trans-resveratrol cis-resveratrole dönüşür. Cis resveratrol tek basamaklı oksien redüksiyonu ile semikinona, çift basamaklı oksijen redüksiyonu ile kinona dönüşmektedir. Oksien redüksiyonu ile ortaya çıkan serbest oksijen radikali (O_2^-) yine cis-resveratrol ile tepkimeye girerek resveratrolü semikinona dönüştürürken son ürün olarak H_2O_2 açığa çıkmaktadır. Ortaya çıkan semikinon pro oksidan yapıda olup lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Semikinonun bir kez daha oksijen ile redüksiyonu sonucunda ise kararlı bir antioksidan olan kinon ortaya çıkmaktadır (Prysyazhna ve ark 2019) (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. Resveratrolün semikinon, kinon, resveratrol dimeri ve modifiye proteine dönüşmesi (Prysyazhna ve ark 2019).

Resveratrolün moleküler yapısı değerlendirildiğinde ortamdaki serbest oksijen radikalleri/resveratrol oranına bağlı olarak resveratrol, bir kez elektron redüksiyonuna uğrarsa prooksidan, iki kez elektron redüksiyonuna uğrarsa antioksidan özellik gösterebilmektedir (De La Lastra ve Villegas 2007).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada kullanılan hayvanların bakımı, beslenmesi, ilaç uygulamaları ve ötenazi işlemleri Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Ötenazi sonrası alınan doku örnekleri spermatolojik ve patolojik parametreler için ayrıştırıldı.

Spermatolojik parametreler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında, patolojik değerlendirmeler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

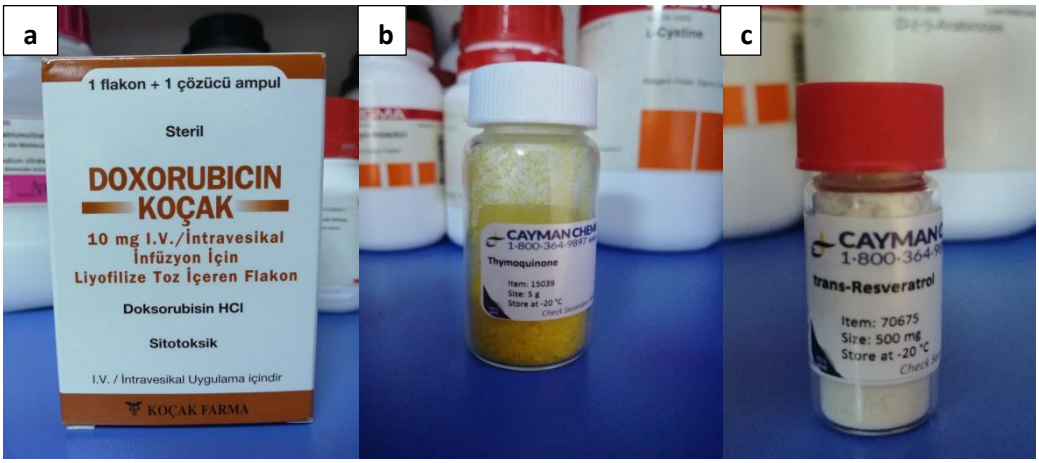
Hayvanlar üzerinde yapılacak tüm deneysel çalışmalar için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden 26.10.2018 tarihli 2018-38 sayılı karar ile etik kurul izni alındı.

2.1. Ratların Bakımı ve Beslenmesi

Çalışmada 8 haftalık yaşta 80 erkek Albino Wistar rat kullanıldı. Ratların bakım ve beslemesi 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 22±2 °C sıcaklık ve %60-65 nem olacak biçimde ayarlanan bir odada yapılmış olup erkek ratlar dörderli gruplar halinde paslanmaz çelikten kafeslerde ad libitum olarak beslendi. Dişi ratlar aynı kafeste beşerli gruplar halinde konuldu ve deneyin sonunda çiftleştirme kafeslerine alındı.

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyde kullanılan ratların ağırlığı ortalama 400 gram olarak hesaplandı. Toplamda 80 adet erkek rat kullanıldı. Kontrol grubuna oral yolla yalnızca serum fizyolojik uygulanırken, doksorubisin grubuna 10. Gün intraperitonal (i.p.) olarak 15 mg/kg dozda doksorubisin (Doxorubicin Koçak 10mg/IV, Koçak Farma) enjekte edildi ve oral yolla serum fizyolojik uygulandı. Diğer gruplara 5 ve 20 mg/kg dozda timokinon (Cayman Chem, 15039) ve 5 ve 20 mg/kg dozda resveratrol (Cayman Chem, 70675) uygulandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan Doksorubisin (a), timokinon (b) ve resveratrol (c) kimyasalları.

Her bir grupta 8 erkek rat kullanıldı ve deney grupları çizelge 2.1 deki gibi oluşturuldu. Uygulanan timokinon ve resveratrol Dimetilsülfoksit (DMSO) içersisinde çözdürüldü. İlaç uygulamaları 21 gün boyunca gün aşırı olacak şekilde toplamda 10 kez uygulandı ve uygulama sonunda ratlar anestezi altına alınarak ötenazi edildi.

Çizelge 2.1. Aşama 1'de oluşturulan gruplar ve uygulanan ilaç dozları.

Grup	Kullanılan Kemoterapötik ve Koruyucu Bileşikler	Kullanım Dozu	Hayvan Sayısı	Uygulama Sıklığı ve Yolu
Grup 1	Kontrol (K)	1 ml Fizyolojik tuzlu su	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj
Grup 2	Doksorubisin (D)	15 mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj, 10. gün i.p. doksorubisin
Grup 3	Timokinon (T5)	5 mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj
Grup 4	Timokinon (T20)	20 mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj
Grup 5	Resveratrol (R5)	5mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj
Grup 6	Resveratrol (R20)	20mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj
Grup 7	Timokinon (T5) + Doksorubisin (D)	5mg/kg + 15mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj (T5), 10. gün i.p. doksorubisin
Grup 8	Timokinon (T20) + Doksorubisin (D)	20mg/kg + 15mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj (T20), 10. gün i.p. doksorubisin
Grup 9	Resveratrol (R5) + Doksorubisin (D)	5mg/kg + 15 mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj (R5), 10. gün i.p. doksorubisin
Grup 10	Resveratrol (R20) + Doksorubisin (D)	20mg/kg + 15 mg/kg	8	21 gün, gün aşırı oral gavaj(R20), 10. gün i.p. doksorubisin

Uygulanan solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Kullanılan timokinon ve resveratrolden 5 mg/kg dozda hazılamak için 20 mg, 20 mg/kg dozda hazırlamak için ise 80mg tartıldı ve 1 ml DMSO içerisinde çözdürüldü. Oluşturulan çözeltilerden 200µL alınarak 5 farklı 1,5 ml lik eppendorf tüpe aktarıldı ve her bir tüpteki çözelti serum fizyolojik yardımı ile 1 ml ye tamamlandı. Hazırlanan son karışımdan her bir hayvan başına 0,5 ml olacak şekilde enjektörlere çekilerek gün aşırı oral gavaj yöntemi ile hayvanlara verildi. Antikanser ilaç olarak seçilen doksorubisin, 1 ml fizyolojik tuzlu su ile sulandırıldı ve 15 mg/kg dozu ayarlamak için 1 ml içinden 0,6 ml çekilerek çalışmanın 10. gününde i.p. olarak uygulandı. Kontrol grubu ve yanlızca doksorubisin içeren gruplara ise oral gavaj yöntemi ile sadece serum fizyolojik verildi. Koruyucu bileşik ve serum fizyolojik uygulamaları 21 gün boyunca gün aşırı olacak şekilde toplamda 10 kez uygulandı (Şekil 2.2).



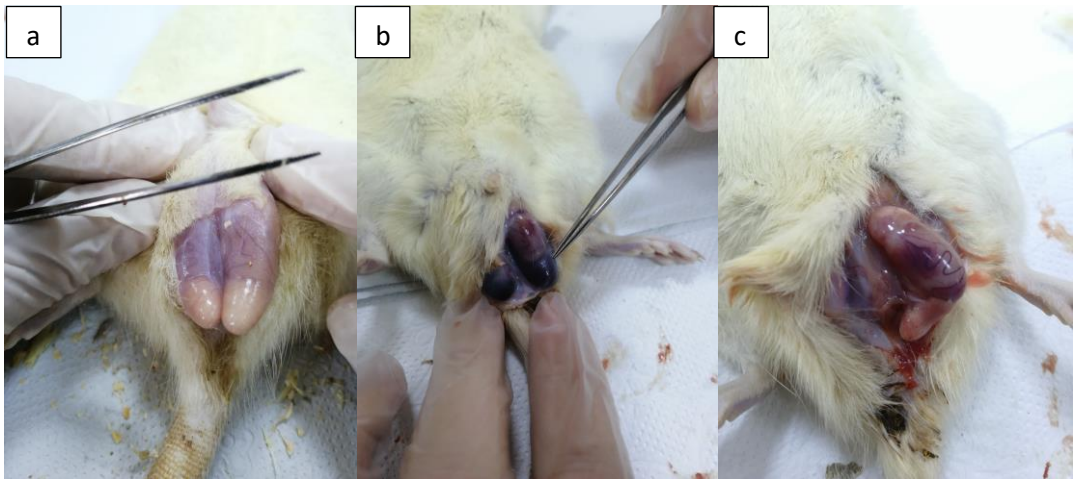
Şekil 2.2. Koruyucu bileşiklerin oral gavaj yöntemi ile uygulanması ve doksorubisin enjeksiyonu.

Yirmibirinci günün sonunda ratlar operasyon odasına alınıp canlı ağırlıkları tartıldı, 10 mg/kg ksilazin (Xylazinbio, Bioveta PLC./ Çekya) ve 90 mg/kg ketamin (Alfamine, Ata Fen / Türkiye) yapılarak sedasyona alındı ve teknik personel tarafından ötenazi edildi.



Şekil 2.3. Ölçümlerin yapıldığı ve örneklerin toplandığı çalışma masası.

Ötenazi işlemi sonrası spermatolojik ve patolojik parametreler için gerekli örnekler dikkatlice ayrıştırıldı. Spermatolojik parametreler için sol kauda epididimis petri kabına alınarak, 35±3°C' lik PBS (Sigma, P4417) solüsyonuyla yıkandı. Sonrasında yıkanan kauda epididiymis 2 ml PBS solüsyonunda cerrahi ince uçlu makaslar ile parçalanarak 10 dakika spermatozoonların PBS solüsyonuna geçmesi beklendi. 10 dakikanın sonunda epididimis dokusu uzaklaştırıldı ve spermatolojik parametrelere bakılmak üzere laboratuvara götürüldü. Sağ testis ve epididimis immunohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirilmeler yapılmak üzere patoloji laboratuvarına teslim edildi.



Şekil 2.4. Örneklerin toplanması sırasında kontrol grubu (a), doksorubisin grubu (b) ve doksorubisin ile kombine kullanılan resveratrol grubu (c) testislerinin görünümü.

2.3. Spermatolojik Parametreler

Spermatolojik muayene parametreleri olarak motilite muayenesi, yoğunluk tayini, anormal spermatozoon oranı, spermatozoon membran bütünlüğü, mitokondrial aktivite ve akrozom bütünlüğü tespiti yapıldı.

2.3.1. Motilite Muayenesi

Sakrifiye edilen ratların sol kauda epididimislerinden alınan spermatozoon örneği 1.5 ml lik eppendorf tüp içerisine kondu ve örnekler alınana kadar 37,5°C lik su banyosunda bekletildi. Motilite muayenesi için sperma örneğinden 7,5 µL alınarak ısıtma tablalı (35°C) faz kontrast mikroskop üzerinde bulunan lama damlatıldı ve lamel ile kapatılarak 20X'lik objektifte 5 farklı alana bakıldı. Farklı alanların ortalaması alınarak grupların ortalama motilite değerleri elde edildi (Evans ve Maxwell 1987).

2.3.2. Yoğunluk Tayini

Spermatozoon yoğunluğunun belirlenmesinde hemositometrik yöntemuygulandı. Hazırlanan ve su banyosunda bekletilen sperma örneğinden 5 µL alındı ve 995 µL Hayem eriyiği (5 g Na2SO4, 1 g NaCl, 0.5 g HgCl2, 200 ml bicine) ile 1:200 oranında sulandırıldı (Akalın ve ark 2015). Sulandırılmış spermadan 7,5 µL alınarak thoma lamı üzerine konuldu. Thoma lamında 10 büyük kare sayılarak elde edilen değerler aşağıdaki formülde yerine konularak hesaplandı (Evans ve Maxwell 1987) (Şekil 2.5).

$$\frac{\text{Sayılan Spermatozoon Miktarı}}{\text{Sulandırma Oranı (1/200)} \times \text{Bir Büyük Kare Hacmi (1/250)} \times \text{Sayılan Büyük Kare Sayısı (10)}} \times 1000\ (mm^3)$$

Şekil 2.5. Hemositometrik yöntem ile yoğunluk tayini belirleme formülü.

2.3.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal spermatozoon oranını belirlemek üzere Eosin-Nigrosin (1,67 g eosin, 10 g nigrosin ve 2,9 g sodyum sitrat/100 mL distile su) boyama yöntemi kullanıldı. PBS ile sulandırılmış taze spermadan alınan 7,5 µL örnek 1/2 oranında (15 µL) Eosin-Nigrosin boyası ile karıştırılarak, lam üzerinde frotiler hazırlandı. Faz-kontrast mikroskobunda hazırlanan frotilerde hücre morfolojilerine bakılarak anormal spermatozoon oranı saptandı (Evans ve Maxwell 1987).

2.3.4. Akrozomal Bütünlük Tayini

Akrozomal bütünlüğü tayin etmek için Fluorescein isothiocyanate (FITC/PNA, Sigma, L381) boyası kullanıldı. Önceden hazırlanan 600 µL lik PBS – spermatozoon karışımından 60 µL sperma alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Üzerine 10 µL FITC ve 2,5 µL PI boyaları eklendi. Karışım 37 °C lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Ardından 10 µL Hancock solüsyonu ile işlem sonlandırıldı. Hazırlanan örnekten 5 µL alınarak bir lam üzerine damlatılıp üzerine lamel kapatıldı. Floresan mikroskopta sayılan 300 spermatozoondan akrozomu yeşil boya alanlar dejenere, boya almayanlar ise hasarsız akrozom olarak değerlendirildi (Nagy ve ark 2003).

2.3.5. Spermatozoon Membran Bütünlüğü Tayini

Membran bütünlüğünün tayini için Sperm Viability Kit (SYBR-14/PI Molecular Probe: L 7011 Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanıldı. SYBR-14 boyası 1:10 oaranında DMSO (Applichem A3006) ile sulandırıldı. Propidium İyodür (PI), 2 mg/ml olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Sulandırılan kit, 100 µL'lik hacimlere bölünerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C de saklandı. PBS içerisinde bekletilen epididimislerden alınan spermanın 300 µL'si tekrar PBS ile 1/2 oranında sulandırıldı ve 600 µL lik bir örnek hazırlandı. Hazırlanan numune içerisinden 30 µL sperma alınarak 1,5 ml lik ependorf tüplere konuldu. Numunenin üzerine 6 µL SYBR-14 boyası ve 2,5 µL PI boyası eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan karışım 37°C lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda spermatozoonları fikse etmek

için karışım üzerine 10 µL Hancock solüsyonu eklendi ve son karışımdan 5 µL örnek alınarak lam üzerine damlatılarak üzerine lamel kapatıldı. Ölçümler floresan mikroskopta 40X büyütmeli objektifte 300 spermatozoon sayarak gerçekleştirildi. Spermatozoon baş kısmı yeşil boya alanlar membranı sağlam, kırmızı boya alanlar ise hasarlı olarak nitelendirildi (Garner ve Johnson 1995).

2.3.6. Mitokondrial Aktivitenin Belirlenmesi

Mitokondrial aktivitenin belirlenmesi için JC-1 (5, 5', 6, 6'-Tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iyodür, T3168 JC-1, Invitrogen, Carlsbad, CA) boyası kullanıldı. Spermatozoon membran bütünlüğü tayini için hazırlanan 600 µL'lik örnekten alınan 300 µL spermatozoon süspansiyonu 1,5 ml eppendorf tüplerde 2,5 µL JC-1 ve 2,5 µL PI boyaları ile karıştırıldı. Karışım 37°C lik su banyosunda 15 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda 10 µL Hancock solüsyonu ile işlem sonlandırıldı. Hazırlanan örnekten 5 µL alınarak bir lam üzerine kondu ve üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskopta 40X büyütmeli objektifte 300 spermatozoon sayıldı. Spermatozoonun orta kısmı boya almayanlar inaktif, açık yeşil boyananlar düşük mitokondrial aktiviteye sahip ve turuncu boyananlar yüksek mitokondrial aktiviteye sahip olanlar şeklinde sınıfandırıldı (Garner ve ark 1997).

2.4. Patolojik Değerlendirmeler

2.4.1. Makroskobik Muayeneler ve Relatif Testis Ağırlığının Belirlenmesi

Ratların sakrifikasyonundan önce vücut ağırlıkları belirlendi ve sistemik nekropsileri yapıldı. Testis ve epididiymisler uzaklaştırıldı. Relatif organ ağırlığının belirlenebilmesi için tüm testisler çevre dokulardan arındırıldıktan sonra tartıldı. Her bir rat canlı ağırlığına oranlanan testis relatif organ ağırlıkları % olarak (testis ağırlığı x 100/canlı ağırlık) hesaplandı.

2.4.2. Histopatolojik Değerlendirmeler

Makroskobik muayenenin ardından alınan örnekler %10'luk formoldehit ve Bouin's solüsyonunda 24-48 saat boyunca tespiti yapıldı. Ardından, dokular 24 saat süreyle akar suda yıkandıktan sonra doku takip cihazına (Leica TP 1020) alınarak rutin histopatolojik takibi yapıldı. Daha sonra parafinde bloklanan dokuların soğutulmasının ardından mikrotomla (Leica RM 2125RT) 5µm kalınlığında kesilerek alındı ve kesitler 37°C'lik etüvde 24 saat bekletildi. Bütün kesitler Hematoksilen Eozin (HE) ile boyandıktan sonra, 5 binoküler başlıklı ışık mikroskobunda (Olympus

BX51, Tokyo, Japan) incelendi (Luna 1968). Histopatolojik bulgular ayrı ayrı kaydedilerek karakteristik bulguların fotoğrafları (Olympus, DP12) çekildi. Tubulus seminiferus kontortus (TSC)'un çapının belirlenmesi için 20'lik büyütmede rastgele 10 adet TSC'nin iki farklı noktasından (en-boy) yapılan ölçümlerin µm cinsinden ortalaması alındı. Benzer şekilde seçilen TSC'ların germ hücre katmanının kalınlığı iki farklı noktasından yapılan ölçümlerin ortalaması (µm) alınarak belirlendi. Testiküler hasarı değerlendirmek için daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi her bir TSC için rakamsal olarak 1-10 arasında değişen skorlar verilerek ortalama Johnson skorları bulundu (Shokoohi ve ark 2018).

2.4.3. İmmunohistokimyasal Ölçümler

İmmunohistokimyasal boyama (İHK) için, testislerden 5 µm kalınlığında alınan kesitler, tam otomatik Leica Bondmax boyama cihazında, Bond™ Polymer Refine Detection (Leica DS9800) kit prosedürüne uygun olarak (Peroxidase Blok, Protein Blok, Post Primer, Polymer, DAB, Hematosilen) boyandı. Öncelikle tüm dokular ısı ve dewax solüsyonu (Bond™, Leica AR9222) ile deparafinize ve dereceli alkollerde (Merck) rehidre edildi. Cihaz tarafından, her bir aşama sonrası en az 3'er kez ayrı ayrı yıkama solüsyonu (Bond™, Leica, AR9590) ve de-iyonize su ile yıkamalar yapıldı. Daha sonra kullanılan primer antikor özelliğine göre kesitlere; ısı kaynaklı antijen retrieval (HIER 1, Citrate Buffer pH:6.0, Leica, AR9961 veya HIER 2, Edta buffer pH:9.0, Leica, AR9940) uygulandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için değişen sürelerde peroxidase blok ve takibine de ayrı ayrı primer antikorlar (2 adet; *anti- Bax antikor, Abcam, ab32503 ve anti-Bcl-2 antikor, Abcam, ab59348*) ile oda sıcaklığında reaksiyonun ardından post primer ve polimer uygulamaları yapıldı (Çizelge 2.2.). Sonrasında tüm kesitler, DAB ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek distile suyla yıkandı ve ardından Mayer's Hematoksileni ile çekirdek boyaması yapılarak, dehidre edildi ve kapatıldı. Kesitler ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğrafları çekildi (Olympus DP12, Tokyo, Japan).

İHK boyamaların değerlendirilmesinde incelenen alanlarda boyanmış hücre sayısı ve boyanma koyuluğu/yoğunluğu temel alınarak oluşturulan değerlendirme sistemleri esas alındı. Buna göre her bir kesitte belirlenen 10 farklı TSK seçilerek pozitif boyanan hücrelerin oranına göre skor belirlendi (0; boyanma yok, 1; < % 10, 2; % 10-50, 3; % 51-80, 4; >%80). Aynı şekilde boyama yaygınlığı/koyuluğu için de

1 den 4 e kadar değerler belirlendi (1; zayıf/az koyu, 2; orta, 3; yoğun/çok koyu). Belirlenen her iki değerin çarpımlarının ortalaması alındı (İşlem 1). Pozitif boyanan TSK'ların tüm kesite göre oranlanması ile elde edilen genel yaygınlık skoru (0; negatif, 1; % 1-25, 2; %26-50, 3; % 51-75, 4; >%75) ile işlem 1'in sonucu çarpıldı ve her bir olgunun değerlendirmeye esas skoru belirlendi [(pozitif boyanan hücre skor değeri x boyanma yoğunluğu /10) x genel yaygınlık skoru = Değerlendirmeye esas skor] (Ozer ve ark 2012).

Çizelge 2.2. Primer antikorlara göre immunohistokimyasal boyama protokolleri

Primer Antikor	Dilüsyon	Antigen Retriveal	Peroksidaz Blok (dk)	Protein Blok (dk)	Antikor İnkübasyon (dk)	Post Primer (dk)	Polymer (dk)	DAB (dk)	HEM. (dk)
Bax	1:250	HIER1-100°C 20 dk	30	30	60	10	10	3	2
Bcl-2	1:100	HIER2-100°C 20 dk	30	30	60	10	10	3	2

HEM.: Hematoksilen

2.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics 25 programı kullanıldı. Analizlerde, 21. günün sonundaki spematoloik parametreler, histopatolojik veriler, immunohistokimyasal parametrelerde ortaya çıkan sonuçların ortalamaları, her bir deney grubu için, varyans analizi One Way ANOVA yardımı ile belirlendi. Aynı parametreler içerisinde aralarında önemli farklılıkların bulunduğu grupların karşılaştırılması ise çoklu karşılaştırma testi Duncan ile yapıldı. Standart hata bakımından normal dağılım göstermeyen parametreler açı transformasyonu ile standardizasyona tabi tutuldu. $P<0,05$ düzeyinde farklılığın olması istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada elde edilen bulgular aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

3.1. Spermatolojik Parametreler

Yapılan çalışmada kontrol, doksorubisin, resveratrol ve timokinon içeren deney gruplarının motilite, yoğunluk, anormal spermatozoon oranları, membran bütünlüğü, mitokondrial aktivite ve akrozomal bütünlük değerleri Çizelge 3.1' de verildi.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubunun motilitesinin %65,83 olduğu ortaya çıkmaktadır. Buna karşın doksorubisin uygulanan grubun (D) motilitesinin hızlı bir düşüş göstererek %37,5'e düştüğü dikkat çekti. T20 (%76,66), R5 (%89,16) ve R20 (%90,83) gruplarında motilite, kontrol (%65,83) grubundan önemli oranda yüksekti ($P<0,05$).

Doksorubisin ile kombine uygulanan gruplardan, D+R5 (%54.16) ve D+R20 (%61.66) gruplarında yapılan uygulamalar, doksorubisin grubunda düşen motiliteye oranla, istatistiksel olarak önemli düzeyde iyi sonuçlar verdi ($p<0,05$).

Spermatozoon yoğunluğu bakımından, D ($66,66x10^6$), T5 ($126,66x10^6$) ve T20 ($106,66\ x10^6$) içeren grupların spermayoğunluğu kontrol grubuna ($181,66x10^6$) göre önemli oranda düştü. Doksorubisin ile kombine edilen tüm gruplardaysa (D+T5, D+T20, D+R5, D+R20) doksorubisinin neden olduğu spermatozoon yoğunluğundaki düşüş tersine çevrilerek, kontrol grubuna yakın değerler elde edildi($p<0,05$).

Anormal spermatozoa oranları değerlendirildiğinde, doksorubisin uygulaması anormal spermatozoa oranını (%5,16) diğer gruplara göre önemli derecede artırdı. D+T5 (%2,5), D+T20 (%2,16) ve D+R5 (%1,41) gruplarında yapılan uygulamalar doksorubisin grubuna oranla anormal spermatozoon oranlarını düşürmeyi başardı ($p<0,05$).

Spermatozoon membran bütünlüğü incelendiğinde, resveratrol (%68,65 ve 73,06) grupları hariç tüm gruplar kontrol (%72,05) grubuna oranla önemli derecede düşüş gösterdi. Doksorubisin uygulaması (%50,58) membran bütünlüğünde önemli oranda hasar oluşturdu ($p<0,05$). Kombine uygulamalar, spermatozoon membranında oluşan hasarı kontrol grubunun seviyesine getirmede başarısız olmakla birlikte, doksorubisin'in oluşturduğu hasarı önemli ölçüde azalttı ($p<0,05$).

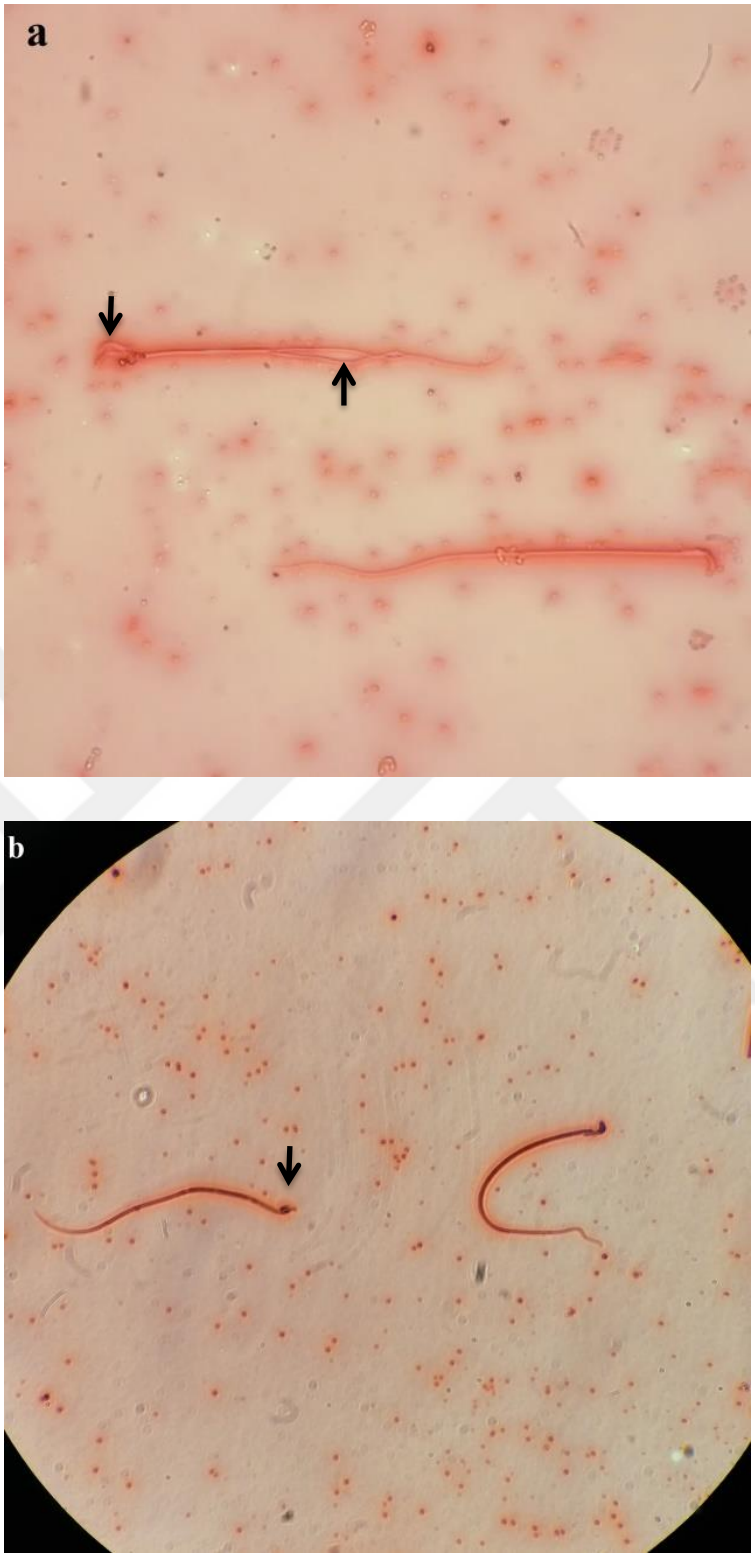
Mitokondrial aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, doksorubisin grubu (%46,66), diğer gruplara göre önemli oranda düşüşe neden oldu. Kombine uygulama yapılan gruplardan sadece D+R5 (%74,1) ve D+R20 (%78,61) gruplarında oluşan hasar yalnızca doksorubisin grubuna oranla düzeldi. Timokinon (T20, %80,40) ve resveratrol grupları (R5, %94,46; R20, %94,80), mitokondriyel aktiviteyi önemli derecede artırdı ($p<0,05$).

Akrozomal bütünlükte ise, doksorubsin (%76,05), timokinon (%80,66, %80,63) ve resveratrol (%78,46) uygulamaları (R20 hariç) kontrol grubuna (%86,41) oranla önemli oranda düşürdü ($p<0,05$). Kombine uygulama yapılan gruplar, doksorubisinin oluşturduğu akrozomal hasarı gidermede başarılı olamadı ($p>0,05$).

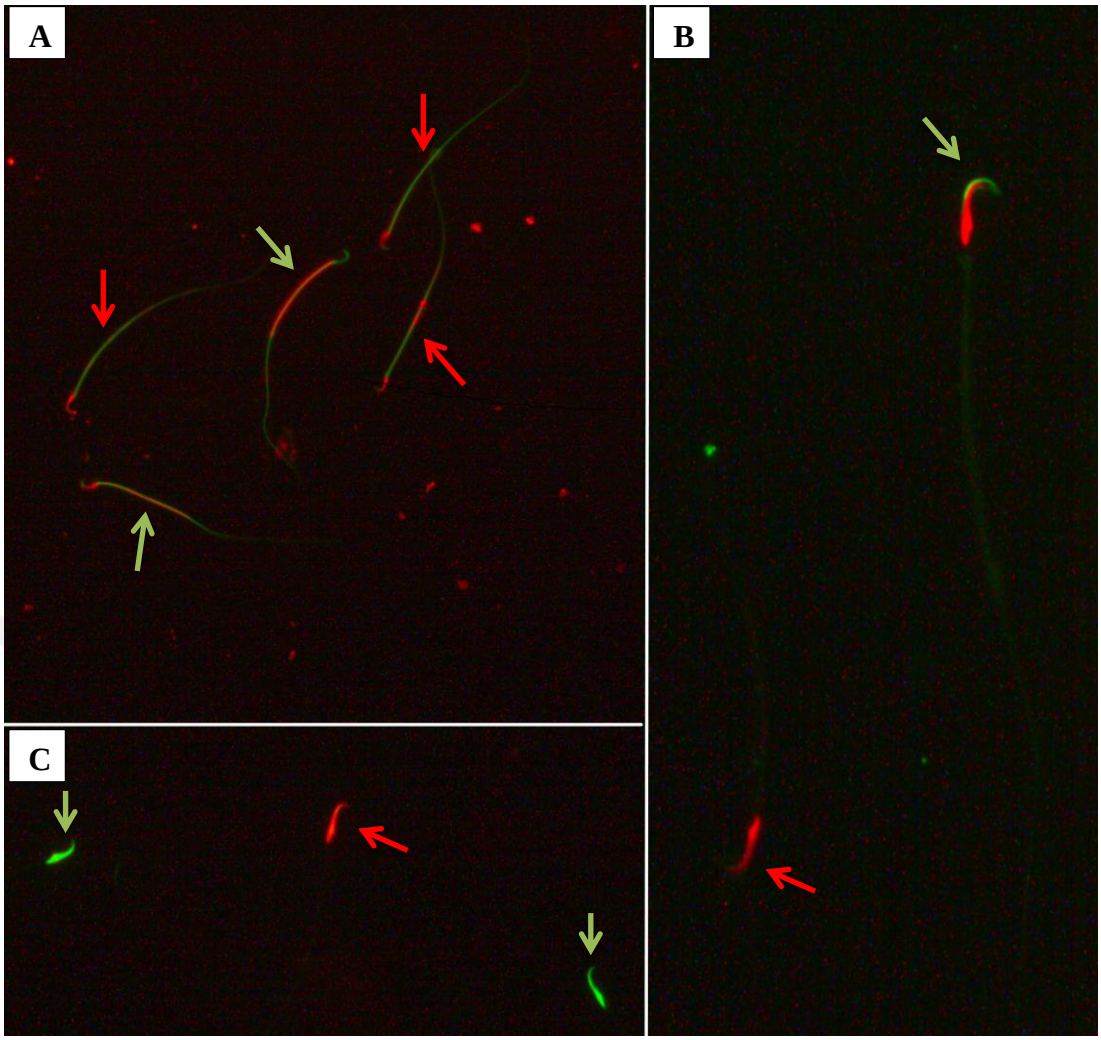
Çizelge 3.1. Deney gruplarının motilite, yoğunluk, anormal spermatozoa, membran bütünüğü, mitokondrial aktivite ve akrozomal bütünlük değerlerine (%) ait bulgular.

Gruplar	Motilite Oranı (%)	Epididimal Spermatozoa Yoğunluğu (x10^6)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Membran Bütünlüğü Oranı (%)	Mitokondrial Aktivite Oranı (%)	Akrozomal Bütünlük Oranı(%)
Kontrol	65,83±0,92^{c}	181,66± 5,86 ^{abc}	1,75± 0,21 ^{a}	72,05± 0,75 ^{ab}	73,86± 0,90 ^{c}	86,41±1,12 ^{a}
D	37,5±1,67^{e}	66,66± 8,22 ^{f}	5,16± 0,38 ^{c}	50,58± 1,08 ^{f}	46,66± 0,81 ^{e}	76,05±1,24 ^{c}
T5	53,33±1,61^{d}	126,66± 9,08 ^{de}	2,33± 0,35 ^{ab}	59,18± 0,53 ^{e}	71,03± 1,34 ^{c}	80,66±1,69 ^{bc}
T20	76,66±1,86^{b}	106,66± 7,29 ^{e}	1,75± 0,17 ^{a}	63,06± 0,70 ^{de}	80,40± 1,16 ^{b}	80,63±1,29 ^{bc}
R5	89,16±1,49^{a}	195 ± 5,37 ^{a}	1,33± 0,16 ^{a}	68,65± 0,71 ^{bc}	94,46± 1,32 ^{a}	78,46±1,64 ^{bc}
R20	90,83±2,20^{a}	203,33± 8,39^{a}	1,41± 0,15 ^{a}	73,06± 0,79 ^{a}	94,80± 0,53 ^{a}	82,75±1,41 ^{ab}
D + T5	31,66±2,41^{e}	153,33± 5,7 ^{bcd}	2,5± 0,34 ^{ab}	58,16± 0,87 ^{e}	58,61± 1,15 ^{d}	78,81±1,03 ^{bc}
D + T20	40±1,69^{e}	170± 9,95 ^{abc}	2,16± 0,21 ^{ab}	60,00± 0,54 ^{e}	62,00± 0,89 ^{d}	79,38±1,70 ^{bc}
D + R5	54,16±2,31^{d}	146,66± 3,83 ^{cd}	1,41± 0,15 ^{a}	61,28± 0,87 ^{de}	74,10± 1,03 ^{c}	78,41±1,51 ^{bc}
D + R20	61,66±3,70^{cd}	186,66± 8,69 ^{ab}	3,08± 0,35 ^{b}	65,03± 0,67 ^{cd}	78,61± 0,94 ^{b}	77,81±1,27 ^{bc}

Aynı sütundaki a,b,c,d,e,f harfleri istatistiki farkı ifade etmektedir. ($p<0,05$).



Şekil 3.1. Çift baş, tek orta kısım ve çift kuyruk (a) ile yuvarlak baş (b) anomalisine sahip spermatozoa.



Şekil 3.2. Mitokondrial aktivite (A), akrozomal bütünlük (B) ve membran bütünlüğünün (C) floresan mikroskop görüntüsü. A: Gövde kısmı JC-1/PI boyası ile turuncu ya da kırmızı renk alan spermatozoon mitokondrial aktivite yüksek (yeşil ok), yeşil ya da açık yeşil boya alan spermatozoon mitokondrial aktivite düşük (kırmızı ok), B: FITC/PI boyası ile boyanan spermadan akrozomu yeşil boya alan spermatozoon hasarlı akrozom (yeşil ok), boya almayan spermatozoon ise hasarsız akrozom (kırmızı ok), C: SYBR-14/PI ile boyanan spermada yeşil boyanan spermatozoon hasarsız (yeşil ok), kırmızı boyanan spermatozoon ise hasarlı (kırmızı ok) olarak işaretlenmiştir.

3.2. Patolojik Bulgular

Patolojik parametreler, makroskobik muayene ve relatif testis ağırlığı, histopatolojik değerlendirmeler ve immunohistokimyasal ölçümler olmak üzere 3 başlık altında incelendi.

3.2.1. Makroskobik Muayene ve Relatif Testis Ağırlığı

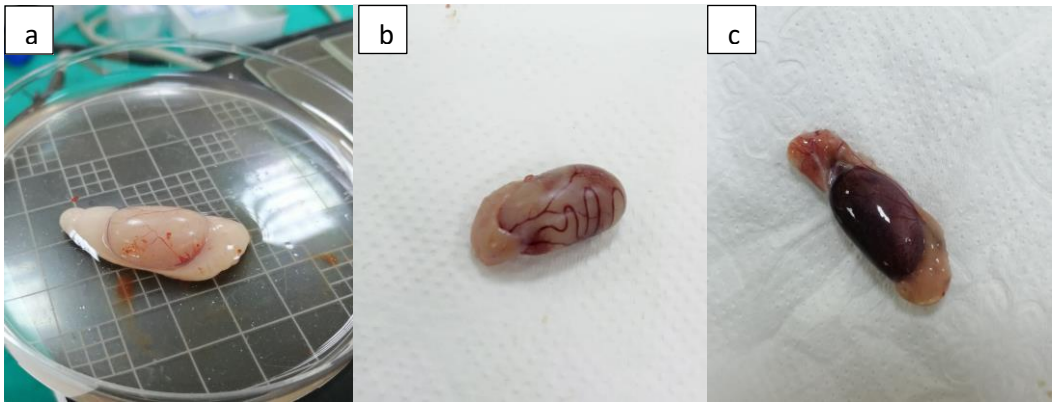
Yapılan ölçümler sonucunda grupların relatif testis ağırlık yüzdeleri Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Uygulama sonrası grup relatif testis ağırlık yüzdelerinin tablo olarak gösterimi.

Gruplar	Relatif Testis Ağırlığı (%)
Kontrol	$0,4371 \pm 0,008^{ab}$
D	$0,3672 \pm 0,007^{c}$
T5	$0,4042 \pm 0,022^{bc}$
T20	$0,4162 \pm 0,021^{bc}$
R5	$0,3957 \pm 0,003^{bc}$
R20	$0,4015 \pm 0,015^{bc}$
D + T5	$0,4559 \pm 0,014^{ab}$
D + T20	$0,4972 \pm 0,016^{a}$
D + R5	$0,4497 \pm 0,029^{ab}$
D + R20	$0,4845 \pm 0,030^{a}$

Aynı sütundaki a, b, c, d harfleri istatistiki farkı ifade etmektedir ($p<0,05$).

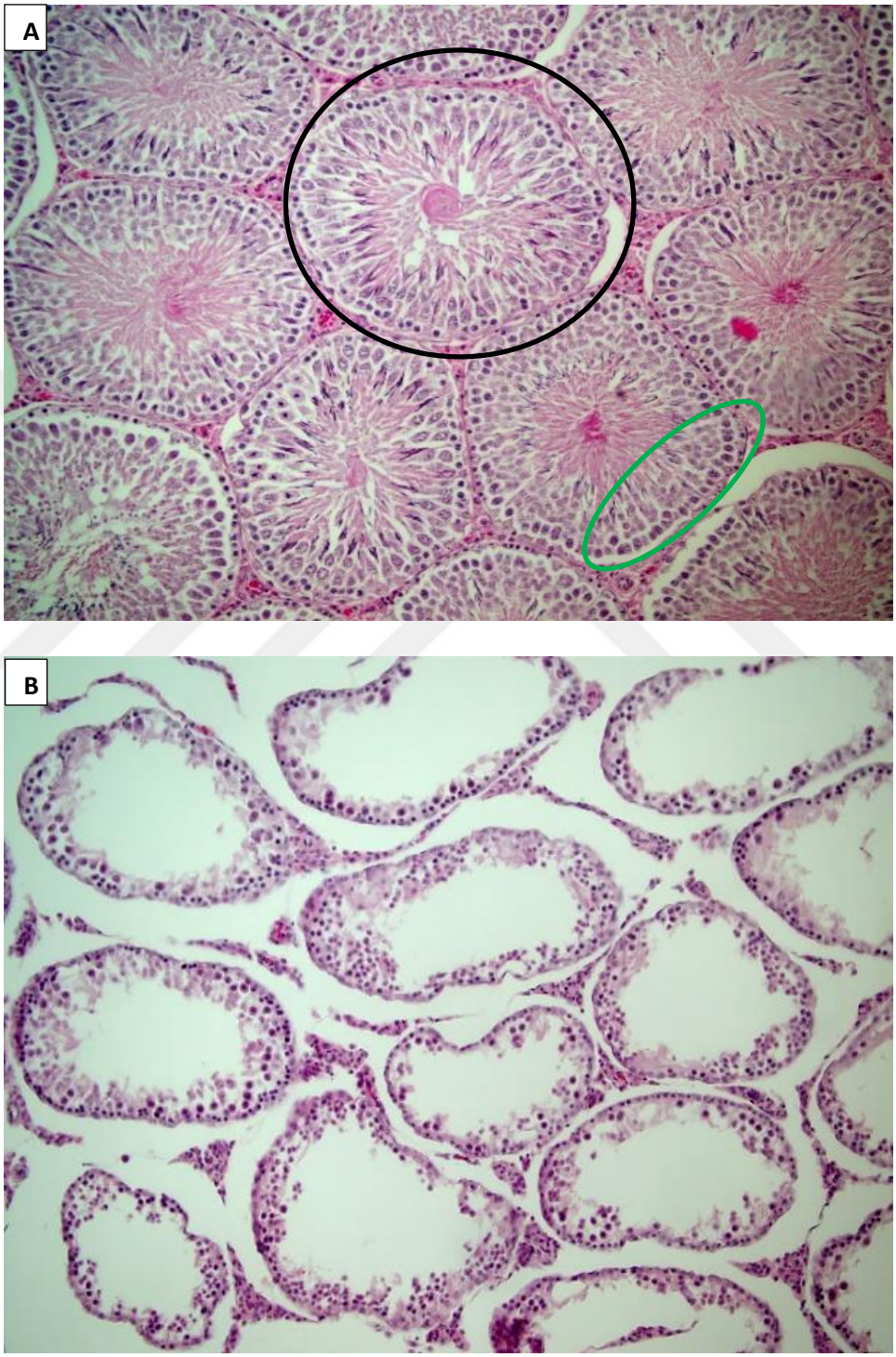
Relatif testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, doksorubisin (D) içeren grup (%0,3672) kontrol grubuna (%0,4371) göre önemli oranda düşüşe neden oldu. T5, T20, R5 ve R20 gruplarında, kontrol ve doksorubisin gruplarına göre istatistiksel bir fark görülmedi ($p>0,05$). Doksorubisin ile kombine kullanılan gruplar (D+T5 (%0,4559), D+T20 (%0,4972), D+R5 (%0,4497) ve D+R20 (0,4845 g) doksorubisin grubuna göre önemli bir fark oluşturdu; doksorubisinin neden olduğu testis ağırlık kaybını tersine çevirerek, kontrol grubuna göre benzer sonuçlar verdi ($p<0,05$).



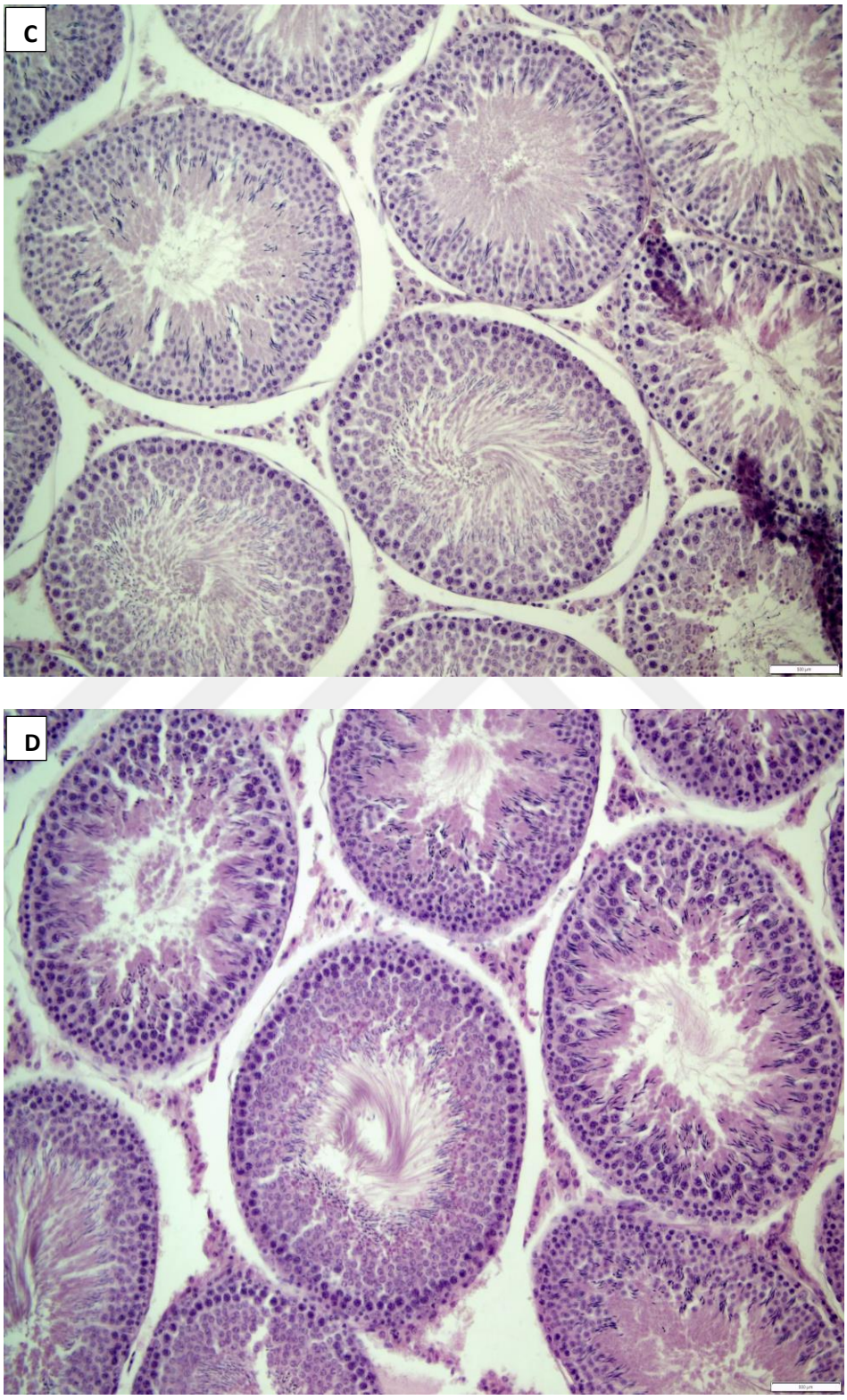
Şekil 3.3. Kontrol grubu (a), D+R5 grubundan (b) ve doksorubisin grubundan (c) ratların testislerinin makroskobik görünümü.

3.2.2. Histopatolojik Bulgular

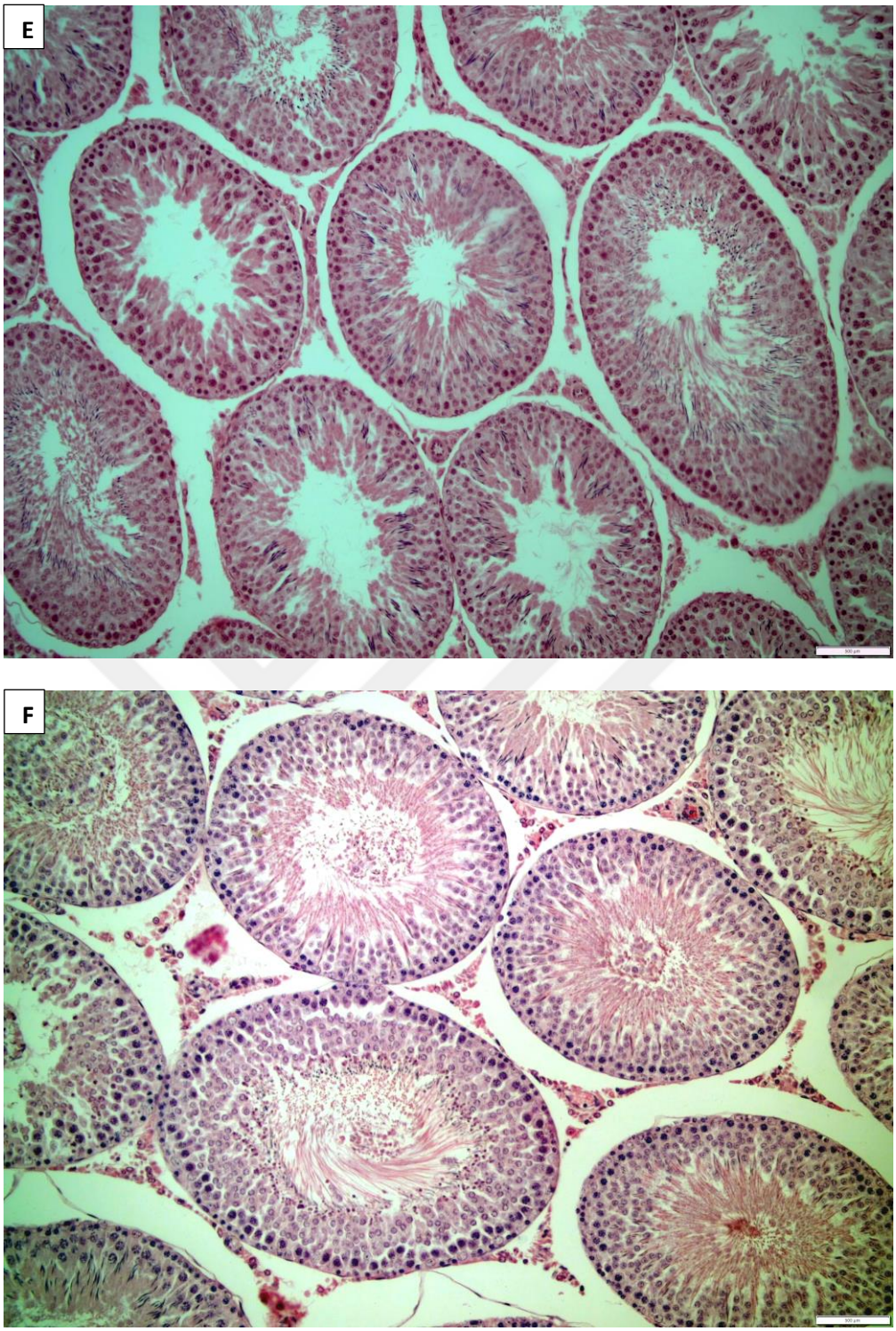
Bu başlık altında histopatolojik açıdan yapılan analizlerin sonuçları değerlendirilmektedir. Testis içi germinatif hücre katman kalınlığı, tubul çapları ve Johnson'un testiküler skorlaması Şekil 3.4' de ortaya konuldu.



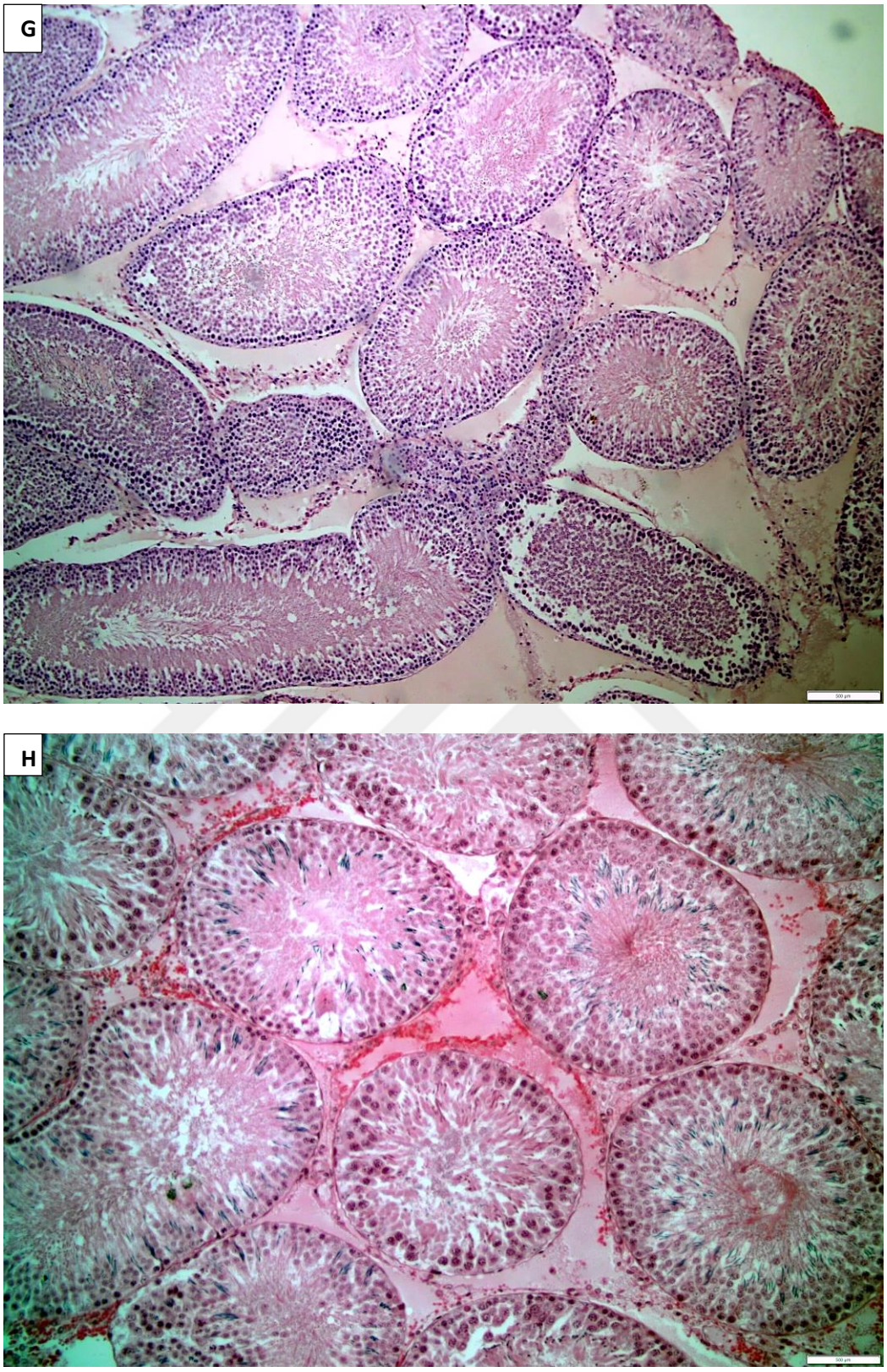
Şekil 3.4.(A, B): A: Seminifer tubullerde (siyah çerçeve) normal histolojik görünüm, kontrol grubu.
B: Seminifer tubullerde atrofi, dejenerasyon, desquamasyon ve kalınlığında önemli oranda azalma, doksorubisin grubu. Hematoksilen-Eozin Boyama, 20X.



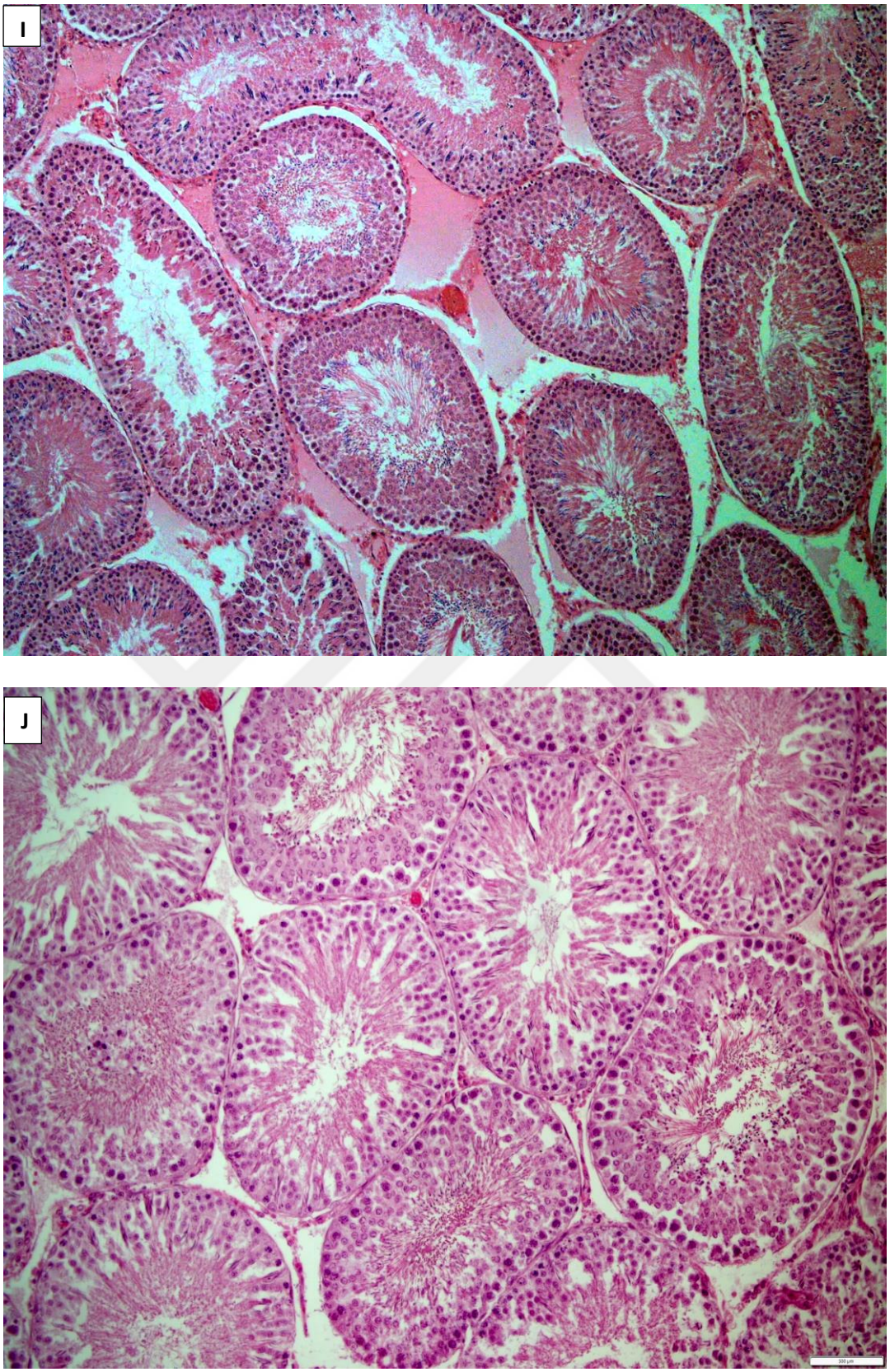
Şekil 3.4. (**C, D): C ve D:** Kontrol grubu ile benzer yapıda normal histolojik görünüm, Timokinon 5 grubu (C),Timokinon 20 grubu (D), Hematoksilen-Eozin Boyama, 20X.



Şekil 3.4. (E, F): E ve F: Seminifer tubullerde kontrol grubu ile benzer yapıda normal histolojik görünüm, Resveratrol 5 grubu (E), Resveratrol 20 grubu (F), Hematoksilen-Eozin Boyama, 20X.



Şekil 3.4. (G,H): G: Seminifer tubullerdeki histolojik görünümde doksorubisin grubuna kıyasla önemli oranda düzelme, Timokinon 5 + Doksorubisin grubu.
H: Seminifer tubullerin histolojik görünümünde doksorubisin grubuna kıyasla düzelme, Timokinon 20 + Doksorubisin grubu. Hematoksilen-Eozin Boyama, 20X.



Şekil 3.4. (I,J):, **I:** Seminifer tubullerin histolojik görünümünde doksorubisine kıyasla önemli oranda düzelme, kontrol grubu ile benzer katman kalınlığı, Resveratrol 5 + Doksorubisin grubu (I), **J:** Seminifer tubullerin histolojik görünümünde doksorubisine kıyasla düzelme (J), Resveratrol 20 + Doksorubisin grubu, Hematoksilen-Eozin Boyama, 20X.

Çizelge 3.3. Testis içi germinatif hücre katman kalınlığı, tubul çapları ve Johnson'un testiküler skorlaması.

Gruplar	Germinatif Hücre Katman Kalınlığı (µm)	Tubul Çapı (µm)	Johnson'un Testiküler Skorlaması (1-10)
Kontrol	59,91 ±0,85^{a}	308,6 ±3,72^{b}	9,08 ±0,19^{a}
D	32,9 ±1,16^{d}	232,33 ±7,06^{e}	4,08 ±0,69^{e}
T5	59,08 ±1,87^{a}	304,44 ±5,12^{b}	8,16 ±0,49^{ab}
T20	56,48 ±2,51^{a}	309,47 ±7,00^{b}	8 ±0,61^{abc}
R5	60,58 ±1,82^{a}	330,77 ±7,37^{a}	8,08 ±0,69^{abc}
R20	57,99 ±1,73^{a}	309,82 ±6,18^{b}	7,91 ±0,61^{abc}
D + T5	51,02 ±1,56^{c}	269,75 ±4,15^{d}	6 ±0,34^{d}
D + T20	53,11 ±1,85^{bc}	281,69 ±5,03^{cd}	6,16 ±0,36^{d}
D + R5	58,85 ±2,22^{a}	292,59 ±8,72^{b}	7,16 ±0,23^{bcd}
D + R20	53,31 ±1,78^{b}	292,55 ±4,56^{bc}	6,66 ±0,37^{cd}

Aynı sütundaki a, b, c, d harfleri istatistiki farkı ifade etmektedir ($p<0,05$).

Çizelge 3.3'de verilen germinatif hücre katman kalınlığı verileri değerlendirildiğinde, yalnızca doksorubisin (D) uygulanan hayvanlarda testis germinatif hücre katman kalınlığının 32,9±1,16 µm düzeyine kadar inceldiği dikkat çekti. Bu değer kontrol (59,91 µm) grubunun katman kalınlığından önemli derecede düşüktür ($p<0,05$). Timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) verilen grupların germinatif hücre katman kalınlıkları kontrol grubununkine oldukça yakındı ($p<0,05$). Doksorubisin ile kombine uygulanan timokinon (D+T5 ve D+T20) ve D+R20 uygulanan gruplarda (D+R5 grubu hariç), doksorubisinin oluşturduğu hasara karşı koruma sağladığı görülmekle birlikte, bu gruplarda katman kalınlıkları kontrol grubuna göre önemli bulunmadı ($p>0,05$). D+R5 grubundaysa (58,85 µm), germinatif hücre katman kalınlığı verileri kontrol grubuna yakındı ($p<0,05$).

Tubulus seminiferus kontortus çapları dikkate alındığında, kontrol grubunun ortalama tubulus çapı 308,6±3,72 µm iken, doksorubisin (D) uygulanan grubun ortalama tubulus çapının 232,33 µm'ye kadar düştüğü dikkat çekti ($p<0,05$). Doksorubisin ile kombine yapılan timokinon (D+T5 ve D+T20) uygulamaları, doksorubisinin hasar verici etkisine karşı bir miktar koruma sağlamakla birlikte tubulus çapı kontrol grubuna yaklaşamadı ($p>0,05$). Doksorubisin ile kombine uygulanan D+R5 (292,59 µm) ve D+R20 (292,55 µm) gruplarında ortalama tubulus çapı doksorubisinin hasarını engelleyici etki göstererek kontrol grubunun ortalamasına oldukça yaklaştırdı.

Johnson'un testiküler skorlaması ile 1'den 10'a kadar skorlanan testislerin ortalama değerleri incelendiğinde, en iyi sonucu 9,0833±0,20 ile kontrol grubundatespit edilmiştir. Yalnızca doksorubisin içeren grup (D, 4,0833) oldukça düşük bir skor alırken, timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) içeren gruplar kontrol grubuyla benzer sonuçları verdi ($p<0,05$). Doksorubisin ile kombine kullanılan timokinon (D+T5 ve D+T20) ve resveratrol (D+R5 ve D+R20) uygulamaları, doksorubisinin hasar verici etkisini tersine çevirerek karşı koruma sağladığı görülmesine rağmen, bu koruma kontrol grubuna göre önemli bulunmadı. ($p<0,05$).

3.2.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

Immunohistokimyasal değerlendirmeler başlığı altında Bax ve Bcl-2 ölçümlerinden ortaya çıkan sonuçlar ve testis dokusu boyamaları Çizelge 3.4, Şekil 3.5, ve Şekil 3.6 da verildi.

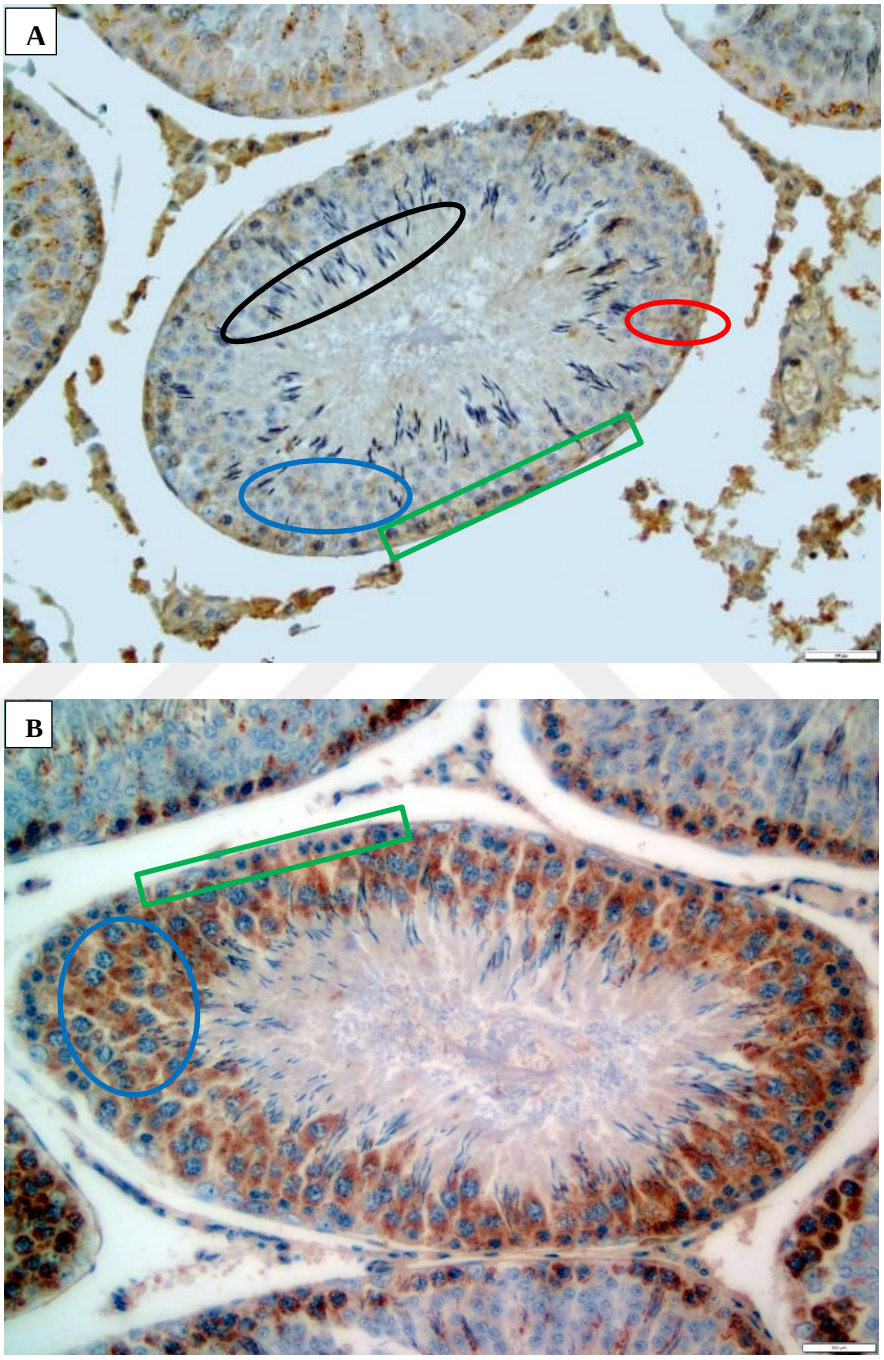
Çizelge 3.4. Gruplar arası Bax ve Bcl-2 değerleri karşılaştırması.

Gruplar	Bax	Bcl-2
Kontrol	$4,19±0,46^{a}$	$17,25±1,87^{ab}$
D	$12,37±0,46^{e}$	$2,86±1,55^{c}$
T5	$5,96±0,34^{ab}$	$13,86±0,47^{ab}$
T20	$6,66±0,54^{bc}$	$14,31±3,19^{ab}$
R5	$8,98±1,07^{d}$	$19,81±2,32^{a}$
R20	$9,25±0,67^{d}$	$21,16±2,81^{a}$
D + T5	$5,75±0,78^{ab}$	$18,57±2,61^{ab}$
D + T20	$8,51±0,73^{cd}$	$16,36±1,30^{ab}$
D + R5	$6,97±0,58^{bc}$	$10,81±2,29^{b}$
D + R20	$6,65±0,29^{bc}$	$18,98±1,37^{ab}$

Aynı sütundaki a, b, c, d harfleri istatistiki farkı ifade etmektedir ($p<0,05$).

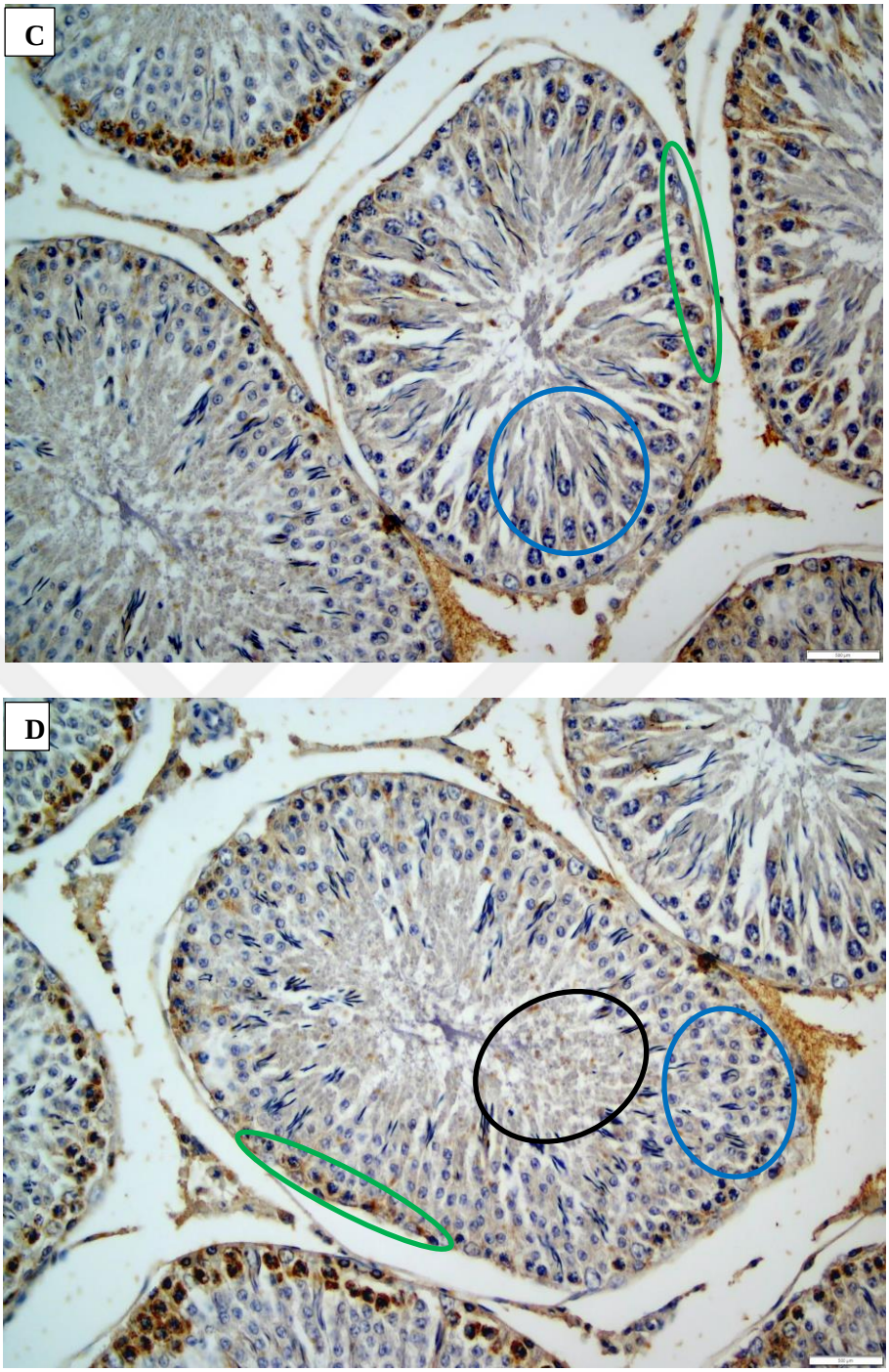
Çizelge 3.4. değerlendirildiğinde, en düşük Bax değerinin kontrol grubunda (4,19±0,46) olduğu gözlenmektedir. Doksorubisin verilen grupta (D) bax miktarı oldukça yüksek bir değere sahip olup (12,37±0,46), ilacın apoptozisi uyarıcı etkisi ortaya kondu ($p<0,05$). Timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) grupları incelendiğinde T5 grubu hariç diğer grupların hepsi Bax miktarında artışa neden olarak apoptotik bir etki gösterdi. Doksorubisin ile kombine gruplardan D+T5 grubu (5,75±0,78) Bax miktarı kontrol grubuyla istatistiksel olarak benzer sonuçlar vererek, koruyucu etkinliğini (antiapoptotik etki) gösterdi.

Diğer kombine gruplar (D + T20,D + R5, D + R20), doksorubisinin oluşturduğu hasarı tersine çevirmesine rağmen, kontrol grubu düzeyinde koruyucu bir etkinlik oluşturmadı (apoptotik etki).



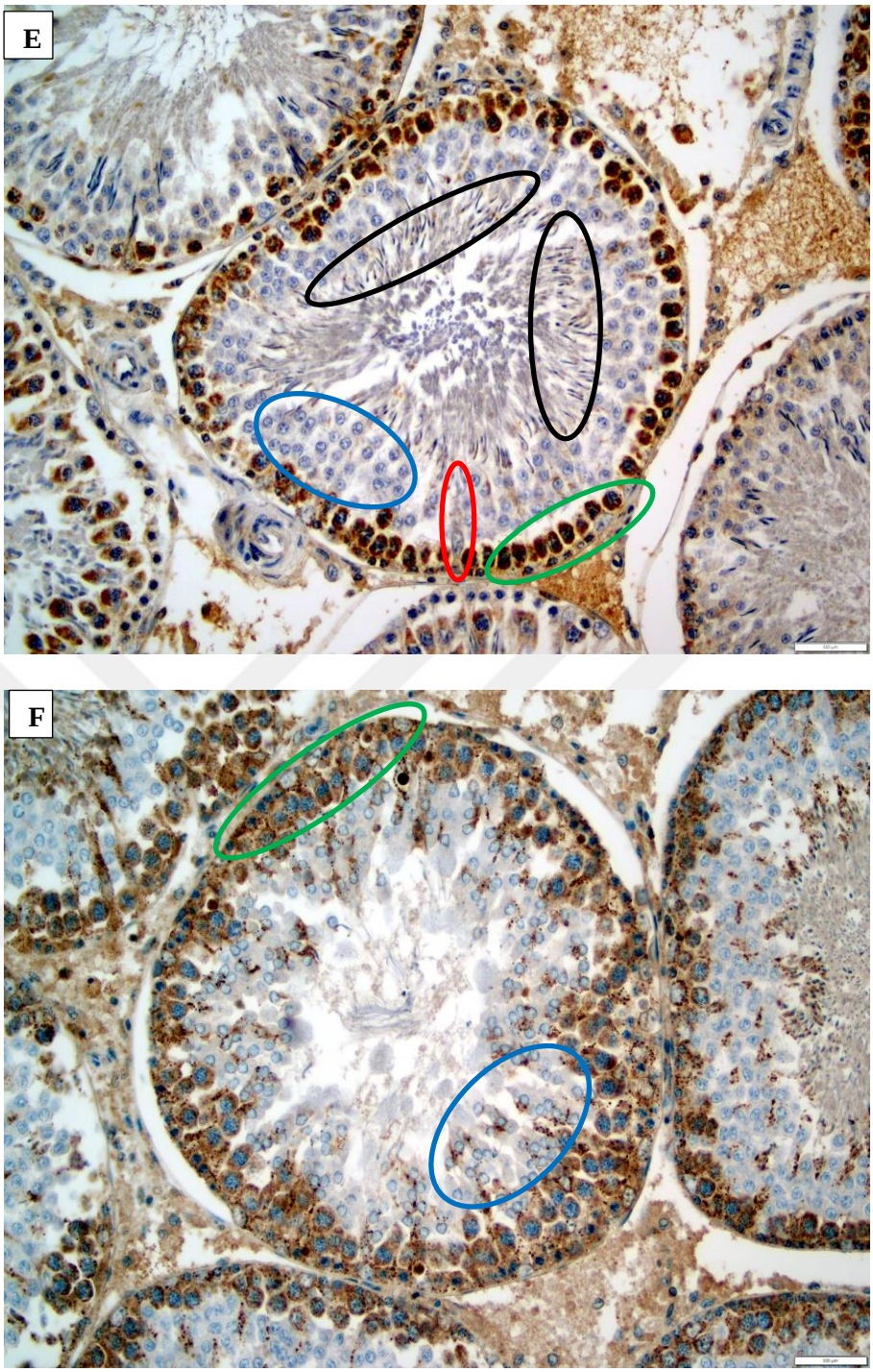
Şekil 3.5. (A,B): Seminifer tubullerde spermatogonyum (yeşil çerçeve), germinatif hücreler (mavi çerçeve), sertoli hücreleri (kırmızı çerçeve) ve spermatit (siyah çerçeve) Bax immunoreaktivitesi**. A:** Kontrol grubu.

B: Bax immunoreaktivitesinde artışa bağlı yoğun kahverengi boyanma (apoptoziste yoğun artış), Doksorubisin grubu. İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.



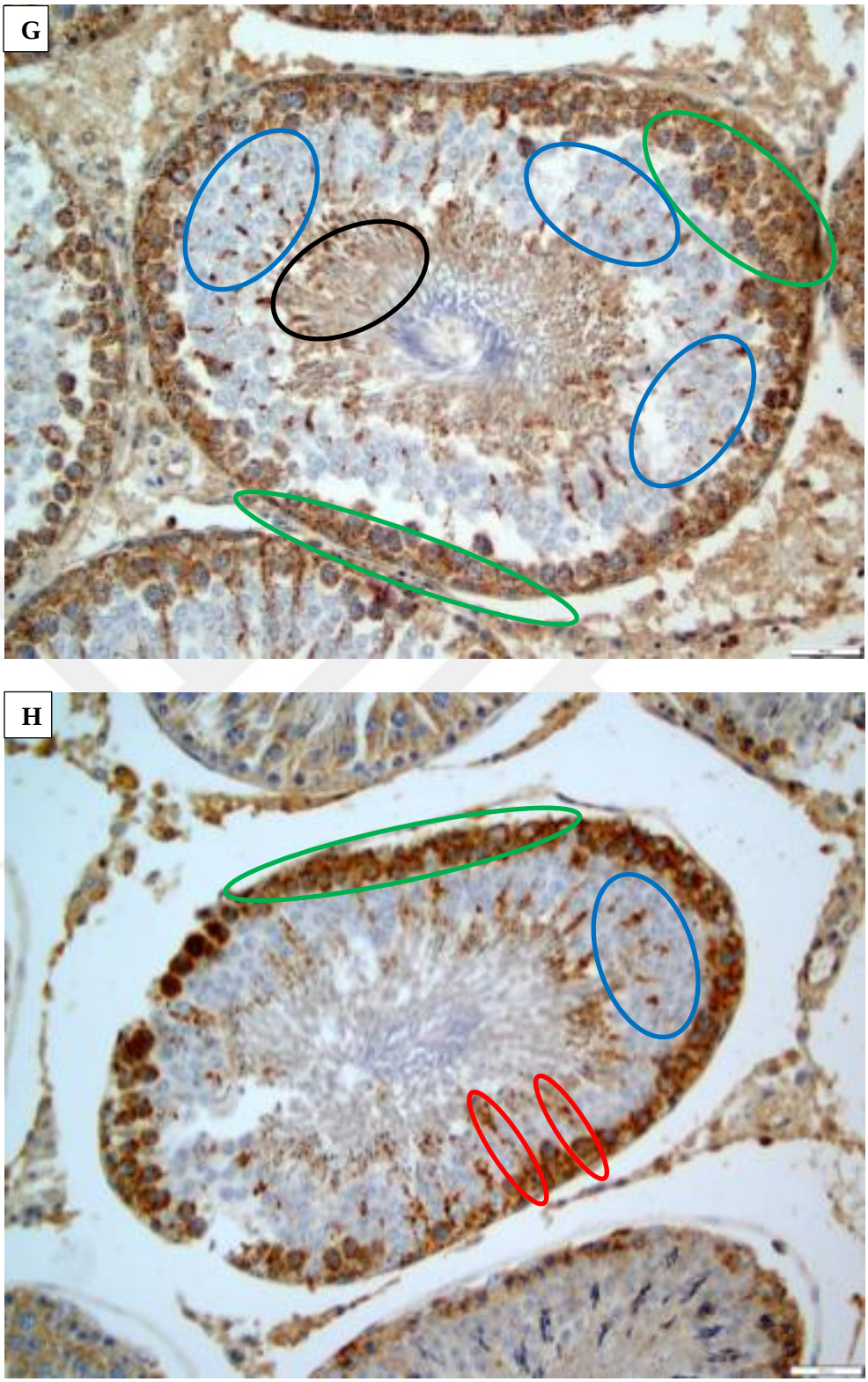
Şekil 3.5. (C,D): C: Kontrol grubu ile benzer Bax immunoreaktivitesi, T5 grubu,

D: Kontrol grubuna oranla bir miktar artmış Bax immunoreaktivitesi ve buna bağlı germinatif hücrelerde hafif kahverengi boyanma (apoptoziste hafif artış), T20 grubu. İmmunohistokimya, DAB-Hematoksilen, 40X, 500µm.



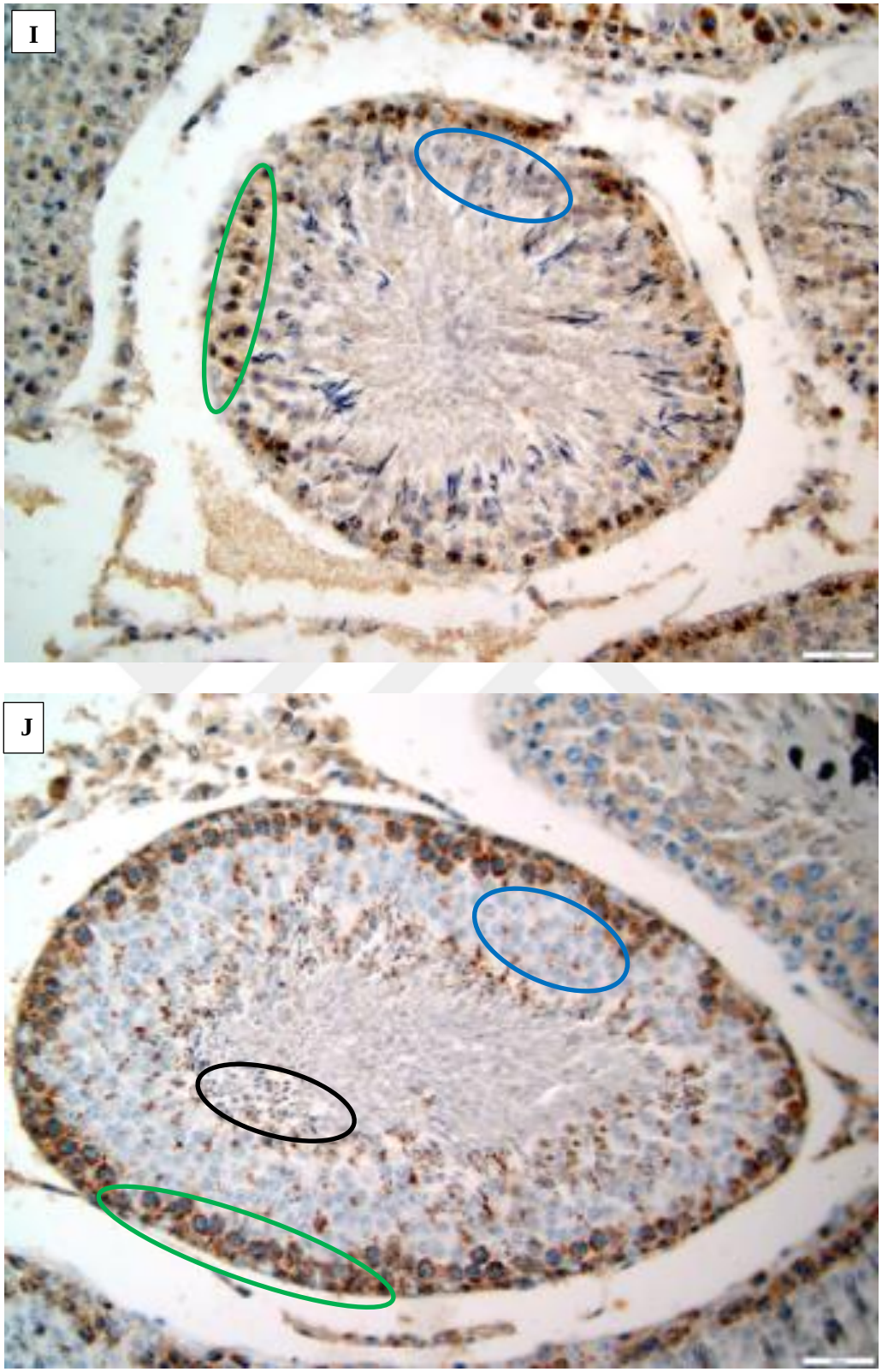
Şekil 3.5. (E,F): **E:** Kontrol gubuna oranla artmış Bax immunoreaktivitesi ve buna bağlı germinatif hücrelerde kahverengi boyanma (apoptoziste artış), R5 grubu.

F: Kontrol grubuna oranla önemi düzeyde artmış Bax immunoreaktivitesine bağlı oluşan kahverengi renk (apoptoziste artış), R20 grubu. İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.



Şekil 3.5. (G,H): G: Doksorubisin grubunda meydana gelen Bax immunoreaktivitesine kıyasla önemli düzeyde azalma, buna bağlı olarak kahverengi boya miktarında düşüş (doksorubisine oranla apoptoziste azalma), D+T5 grubu.

H: Doksorubisin grubuna kıyasla Bax immunoreaktivitesinde azalma, buna bağlı olarak görülen kahverengi alan (doksorubisine oranla apoptoziste azalma),D+T20 grubu. İmmunohistokimya, DAB-Hematoksilen, 40X, 500µm.

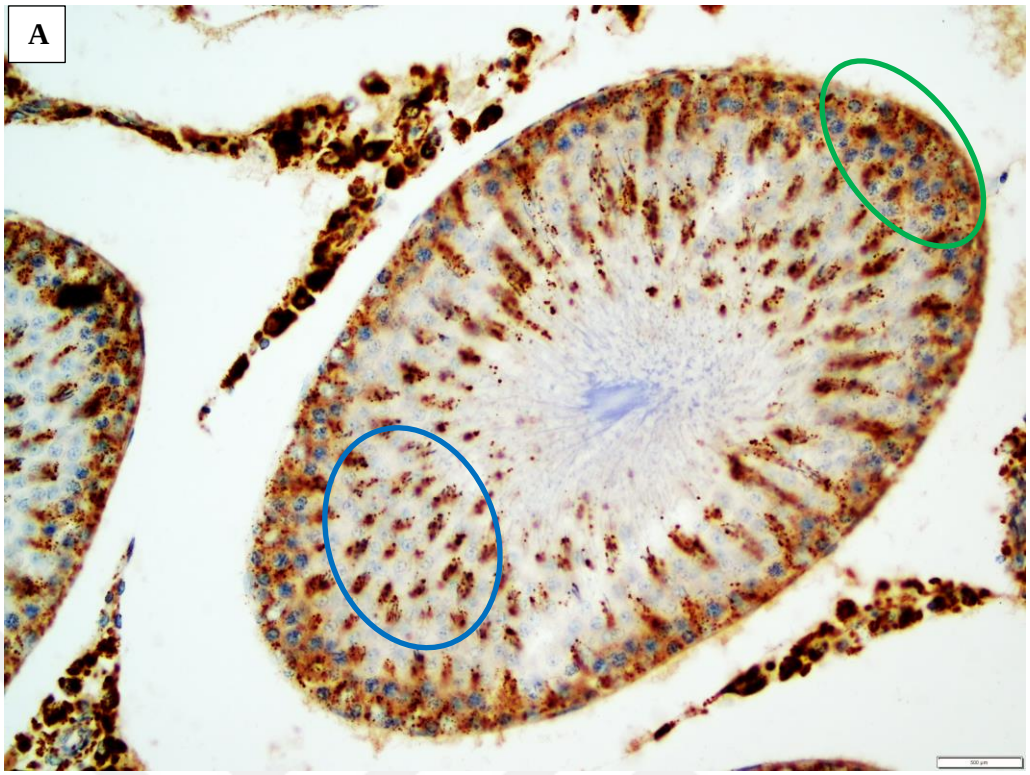


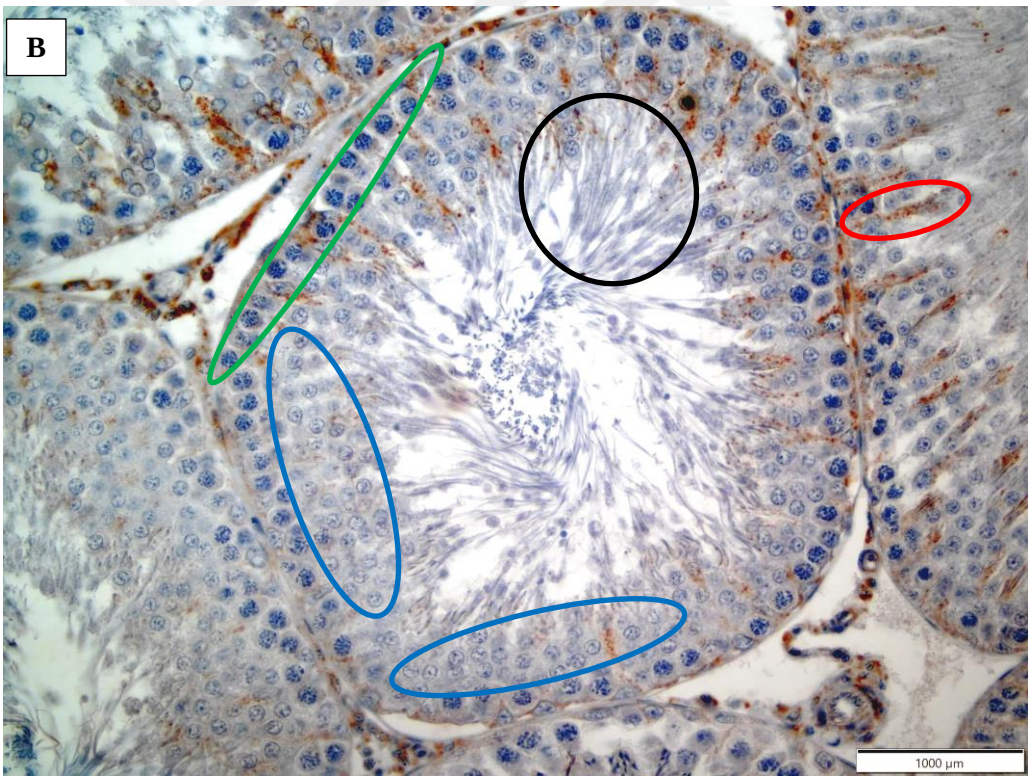
Şekil 3.5. (I,J) **I:** Doksorubisin grubuyla kıyaslandığında Bax immunoreaktivitesinde önemli oranda düşüş ve buna bağlı azalan kahverengi boyanma (doksorubisine oranla apoptoziste azalma), D+R5 grubu.

J: Doksorubisin grubuyla kıyaslandığında Bax immunoreaktivitesinde önemli oranda düşüş ve buna bağlı azalan kahverengi boyanma (doksorubisine oranla apoptoziste azalma), D+R20 grubu, İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.

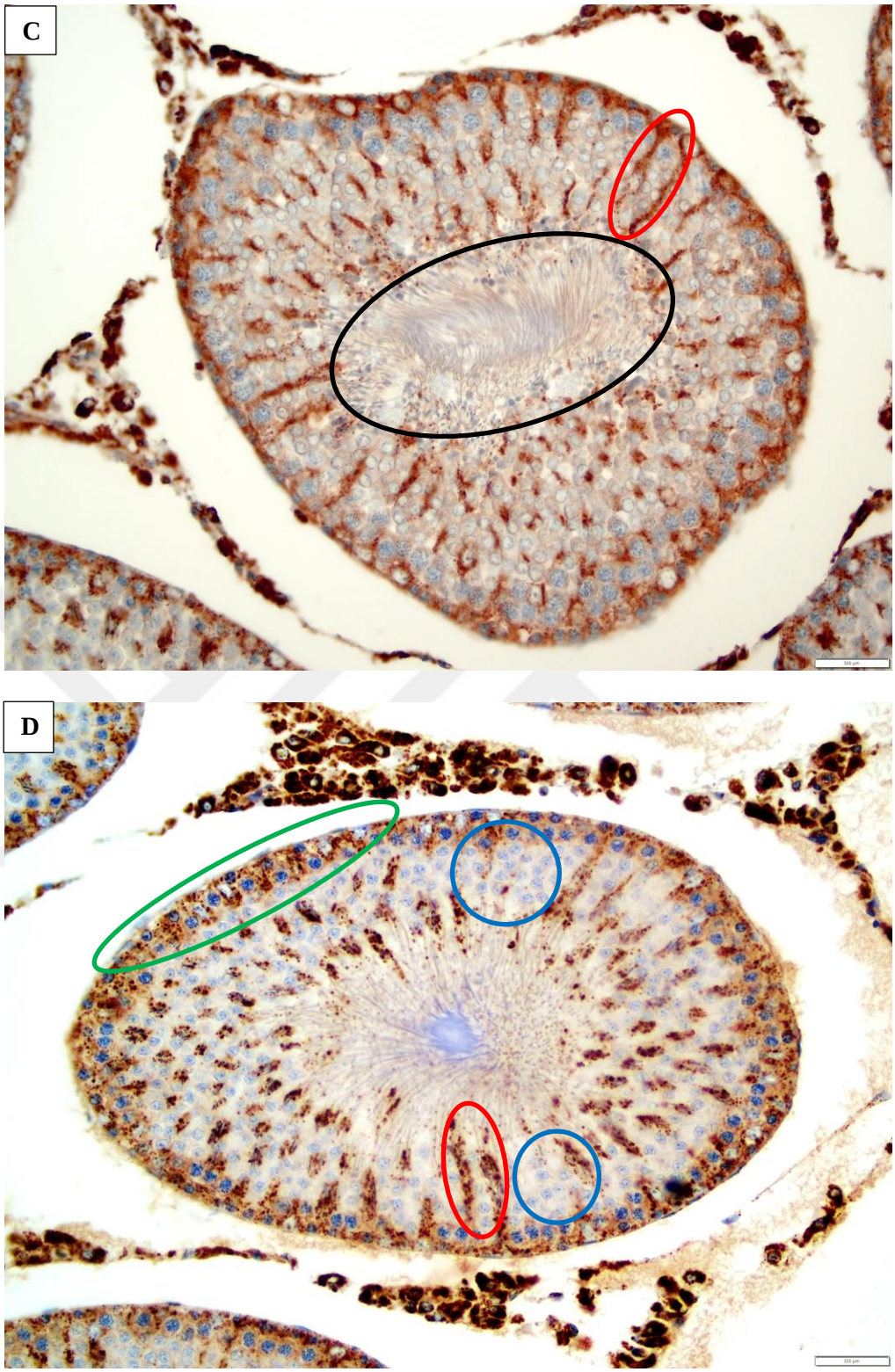
Şekil 3.5 değerlendirildiğinde, Bax aktivitesi yüksek kısımların kahverengi boyandığı Bax aktivitesi düşük dokuların ise mavi boyandığı görülmektedir. Dokularda kahverengi yoğunluğun artması Bax miktarında da bir artış olduğu ile ilişkilendirilmekteyken, mavi yoğunluğun artması Bax miktarının düşük olduğunu ifade etmektedir. Çizelge 3.4' deki verilere paralel olarak, kontrol grubunda mavi ağrlıklı bir boyama gözlenirken doksorubisin grubunda kahverengi boya yoğun bir şekilde görülmüştür. Aynı şekilde R5 ve R20 gruplarının T5 ve T20 gruplarına oranla çok daha fazla boyandığı ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 3.4 de Bcl-2 sonuçları değerlendirildiğinde, doksorubisin (D) içeren grubun Bcl-2 değerinin (2,86±1,03) diğer tüm gruplara oranla önemli ölçüde düşük çıkması, D grubunun apoptotik etkisini gösterdi ($p<0,05$). Timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) içeren gruplar, kontrol grubuna benzer sonuçlar verdi ($p<0,05$). Aynı şekilde, D+T5 (18,57±3,35), D+T20 (16,36±1,96), D+R5 (10,81±2,29) ve D+R20 (18,98±1,81) kontrol grubuyla benzer ya da D grubundan daha yüksek Bcl-2 skorları vererek, doksorubisin grubuna göre koruyucu etkinlik (antiapoptotik etki) gösterdiği görüldü ($p<0,05$).

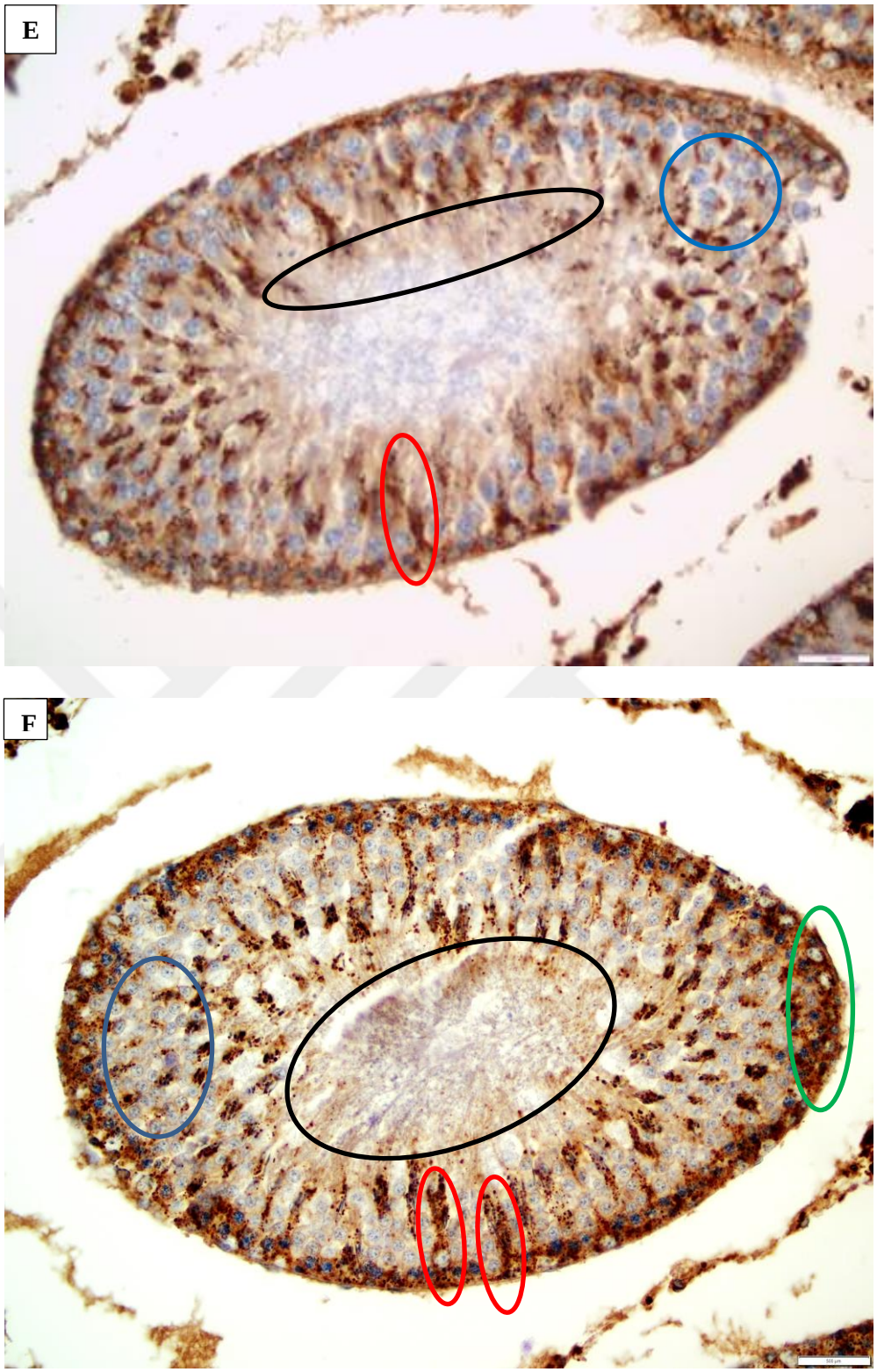




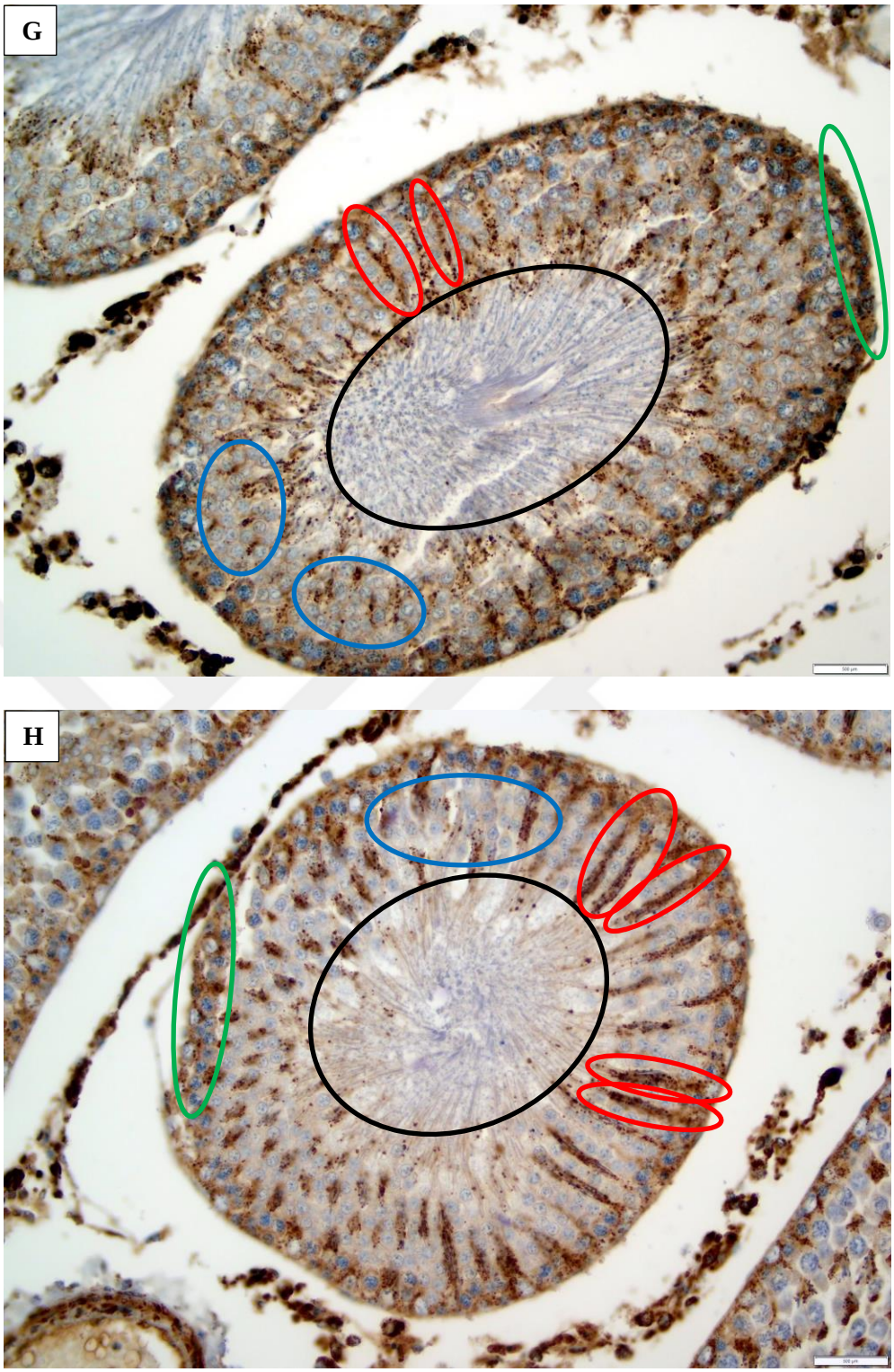
Şekil 3.6. (A,B): Seminifer tubullerde spermatogonyum (gri çerçeve), germinatif hücreler (mavi çerçeve), sertoli (kırmızı çerçeve) ve spermatit (siyah çerçeve) BCL-2 immunoreaktivitesi**.**
A: Bcl-2 immunoreaktivitesinde artış ve buna bağlı olarak yoğun kahverengi boyanma (normal antiapoptotik etki), kontrol grubu, 500µm.
B: Bcl-2 immunoreaktivitesinde kontrol grubuna oranla önemli düzeyde azalma, buna bağlı olarak kahverengi boyanmada azalma (antiapoptotik etkide azalma), doksorubisin grubu. İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X,1000µm.



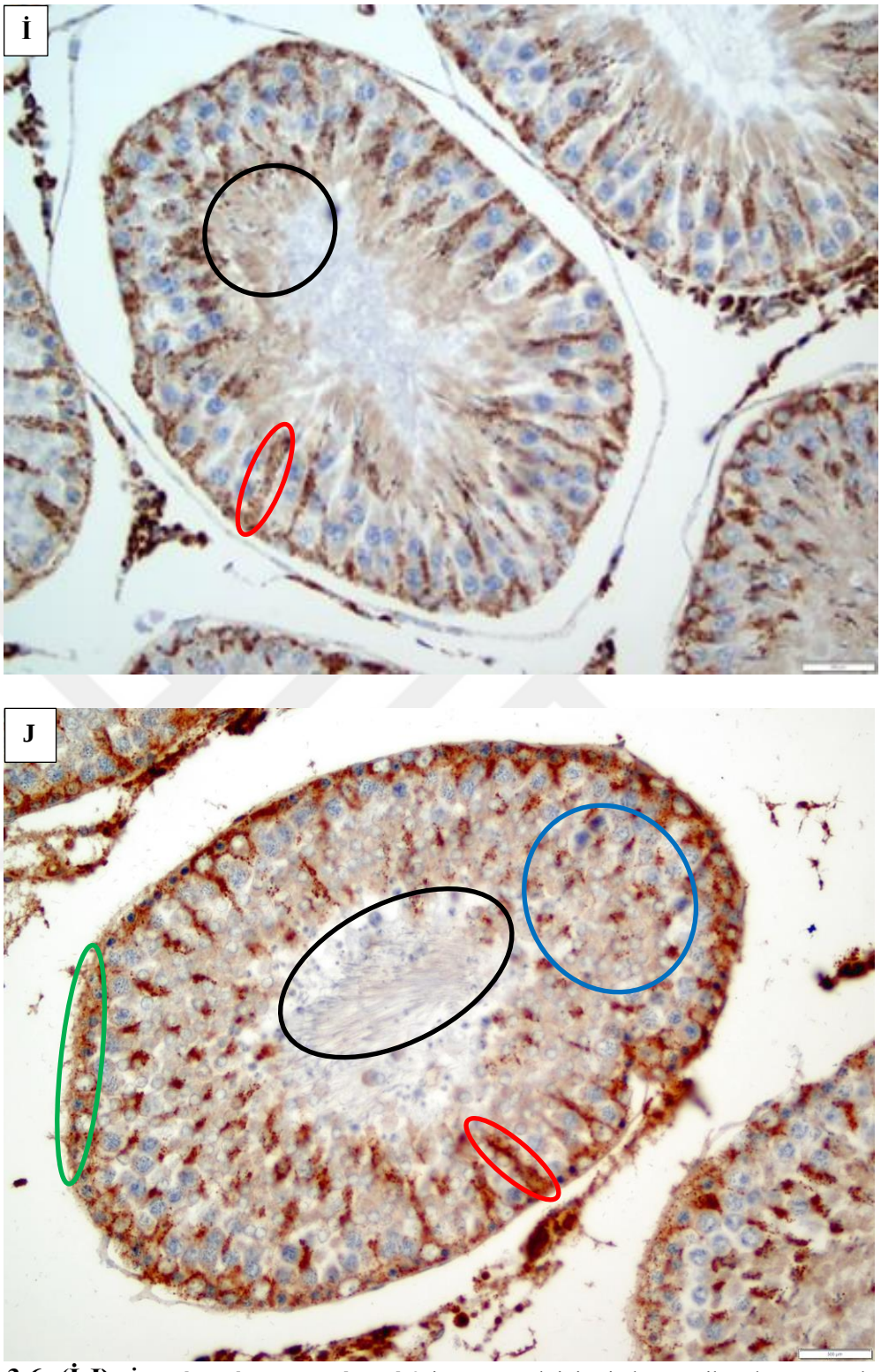
Şekil 3.6. (C,D): Kontrol grubu ile benzer Bcl-2 immunoreaktivitesi ve buna bağlı kahverengi boyanma (kontrol benzeri antiapoptotik etki), T5 grubu (C), T20 grubu (D). İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.



Şekil 3.6. (E,F): **E:** Kontrol grubu ile benzer Bcl-2 immunoreaktivitesi ve buna bağlı kahverengi boyanma (kontrol benzeri antiapoptotik etki), R5 grubu.
F: Kontrol grubuna oranla az da olsa daha yoğun Bcl-2 immunoreaktivitesi (antiapoptotik etkide artış), R20 grubu. İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.



Şekil 3.6. (G,H): G: Doksorubisine oranla Bcl-2 immunoreaktivitesinde kontrol grubuyla benzer olacak biçimde artış ve buna bağlı olarak kahverengi boyanma (doksorubisinin apoptotik etkisini önleme, antiapoptotik etkide artma), D+T5 grubu.
H: Doksorubisine oranla Bcl-2 immunoreaktivitesinde artış ve kahverengi boyanma (doksorubisinin apoptotik etkisini önleme, antiapoptotik etkide artma), D+T20 grubu. İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.



Şekil 3.6. (İ,J): İ: Doksorubisine oranla Bcl-2 immunoreaktivitesinde az miktarda artış ve hafif kahverengi boyanma (doksorubisinin apoptotik etkisini tam anlamıyla tersine çevirememe), D+R5 grubu.
J: Doksorubisine oranla Bcl-2 immunoreaktivitesinde kontrol grubuyla benzer olacak biçimde artış ve buna bağlı olarak kahverengi boyanma (doksorubisinin apoptotik etkisini önleme, antiapoptotik etkide artma), D+R20 grubu. İmmunohistokimya, DAB- Hematoksilen, 40X, 500µm.

Bax boyasına benzer bir biçimde Bcl-2 aktivitesinin yoğun olduğu dokularda kahverengi boya yoğunluğu gözlenirken, Bcl-2 aktivitesinin düşük olduğu dokularda mavi boya yoğunluktadır. Bu durum Şekil 3.6'da da gözlenmektedir. Kontrol, T5, T20, R5 ve R20 gruplarında oldukça yüksek Bcl-2 aktivitesi gözlenirken, doksorubisin grubunda Bcl-2 aktivitesi oldukça düşüktür. Kombine kullanılan gruplarda tüm gruplar yalnızca doksorubisin grubuna oranla bir miktar daha fazla Bcl-2 aktivitesi gösterirken, özellikle D+T5 ve D+R20 grubu oldukça yüksek oranda Bcl-2 aktivitesi göstermektedir. Alınan sonuçlar hem Şekil 3.5.'deki veriler ile örtüşmekte iken, aynı zaman Çizelge 3.4 ve Şekil 3.5'deki Bax verileri ile de birbirlerini doğrulamaktadır.

Sonuçlar bir bütün halinde değerlendirildiğinde, Doksorubisin beklenildiği şekilde hücreleri apoptoza sürüklemiş ve buna bağlı olarak Bax miktarında artış gözlenirken, Bcl-2 miktarında da azalma gözlenmiştir. Yalnızca timokinon içeren gruplarda T5 grubu Bax miktarını istatistiki öneme sahip olmayacak biçimde artırırken, T20 grubundaki artış daha fazladır. Aynı şekilde T5 ve T20 grupları Bcl-2 miktarında da bir miktar azalmaya neden olmuşlardır. R5 ve R20 grupları kontrol grubuna oranla Bax miktarında önemli ölçüde artışa sebep olmalarına karşın, Bcl-2 miktarında da artış göstererek hücrede hem apoptotik hem de antiapoptotik etki göstermişlerdir. Doksorubisin ile kombine kullanımlarda, D+T5 grubu yalnızca doksorubisin grubu ile kıyaslandığında Bax miktarında ciddi bir düşüşe sebep olurken, D+T20 grubu da Bax miktarında düşüş göstermesine karşın D+T5 grubu kadar iyi sonuçlar verememişlerdir. Bcl-2 sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, Doksorubisin ile aşırı miktarda düşen Bcl-2 miktarı D+T5 ve D+T20 gruplarında kontrol grubuna yakın bir sonuç elde edilmiştir. D+R5 ve D+R20 grupları incelendiğinde, her iki grup da yalnızca Doksorubisine oranla Bax miktarında kaydadeğer bir azalmaya neden olurken, Bcl-2 değerlendirildiğinde, D+R5 grubu yalnızca doksorubisin grubuna oranla daha yüksek bir Bcl-2 değeri gösterse de D+R20 grubu kontrol grubuna yakın bir değer alarak çok daha koruyucu özellik göstermiştir.

4. TARTIŞMA

Kanser, insanoğlunun varlığından beri en ölümcül hastalıklarından biri olsa da son yıllarda gelişen kemoterapi/radyoterapi uygulamaları sayesinde hastaların hayatta kalma oranları oldukça artımıştır. Mesotelyoma ve pankreas kanserlerinde sağ kalım oranları %6.5-%7.3 arasında iken bu oran Testis kanserinde %90'ın üzerine çıkmaktadır. Tüm kanser türleri değerlendirildiğinde ise 2012 yılında %43.9 olan sağ kalım oranı 2019 yılı itibarı ile %51.8 e kadar yükselmiştir (Blumenfeld 2012, NuffieldTrust 2020).

Giderek artan hayatta kalma oranları ile sağlığına kavuşan insanlar ilerleyen süreçte çocuk sahibi olmak istemektedir, ancak tedavi sürecinde kullanılan kemoterapötikler nedeni ile hem ovaryal hem de testiküler dokuda önemli dejenerasyonlar şekillenmektedir (Waxman 1983, Dohle 2010, Blumenfeld 2012). Buna bağlı olarak oluşan azoospermi vakaları bir yıldan daha uzun süre sürebilmektedir. Bu nedenle çocuk sahibi olmak isteyen hastalar ICSI gibi ileri üreme tekniklerine başvurmak zorunda kalmaktadır (Meseguer ve ark 2003, Lee ve ark 2006).

Yapılan bu çalışmada, pek çok kanser türünün tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik olan doksorubisinin erkek rat testis dokusunda meydana getirdiği hasarların belirlenmesi, koruyucu bileşik olarak seçilen timokinon ve resveratrolün testis dokusu ve spermatolojik parametreler üzerine etkileri araştırıldı.

Bu bağlamda geçmişten günümüze yapılan benzer çalışmalar derlendi ve tez çalışmasında incelenen parametreler daha önceki çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldı.

4.1. Spermatolojik Bulgular

Motilite sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda motilite değeri %65,83 olarak ortaya çıkarken, D grubunda motilite değeri %37,5 olarak bulundu. T20, R5 ve R20 grupları, kontrol grubuna göre önemli oranda motiliteyi iyileştirdi. Kombine gruplardan D+R5 ve D+R20 grupları D grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli oranda iyileşme sağladı ($p<0,05$).

Anormal spermatozoa oranları dikkate alındığında, doksorubisin uygulamasının anormal spermatozoa oranını (%5,16) önemli derecede artırdığı

görüldü. Kombine gruplardan D+T5, D+T20 ve D+R5 gruplarında doksorubisine bağlı oluşan hasarın engellenmesinde başarı sağladı ($p<0,05$).

Spermatozoa yoğunluğu bakımından, D, T5 ve T20 içeren gruplar kontrol grubundan önemli derecede düşükken ($p<0,05$), doksorubisin ile kombine edilen tüm gruplarda (D + T5, D + T20, D + R5, D + R20) spermatozoa yoğunluğu önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Jalali ve Hasanzadeh (2013) Wistar ratlarında yaptıkları çalışmada, haftalık 1 kez intraperitonal olarak uyguladıkları 4mg/kg doksorubisin ile 28 günün sonunda kontrol grubunda %82,35 olarak buldukları motilite değerlerini doksorubisin gruplarında %42,32 olarak ölçmüşlerdir. Anormal spermatozoa oranı ölçümlerinde ise kontrol grubunda %7,70 çıkan anormal spermatozoon oranı Doksorubisin grubunda %31,33 olarak belirlenmiştir. Spermatozoon yoğunluğu verileri incelendiğinde ise kontrol grubunda $77,66x10^6$/ml olan yoğunluk doksorubisin içeren gruplarda $14,50x10^6$/ml seviyelerine kadar azalmıştır. Bu bağlamda incelenen çalışmalar neticesinde, doksorubisinin motilite ve spermatozoa yoğunluğunu düşürdüğü, anormal spermatozoa oranını artırdığı görülmüştür. Bildirilen değerler tez çalışması ile benzer özelliktedir.

Doksorubisin enjeksiyonunu takiben farklı zamanlardaki etkisinin ölçüldüğü bir çalışmada Levi ve ark (2015), 5 mg/kg doksorubisin uyguladıkları fareleri 1, 3 ve 6 ay sonra sakrifiye etmiş ve motilite değerlerine bakmışlardır. Yapılan ölçümlerde 1. ayın sonunda kontrol grubunda ≈%70 motilite değeri gözlenirken, doksorubisin içeren gruplarda motil spermatozoon gözlenmemiştir. 3 ay sonra sakrifiye edilen hayvanlarda kontrol grubunda ≈%65 motilite gözlenirken, doksorubisin grubunda bu oran ≈%30 olarak gözlenmiştir. 6 aylık gruplarda ise kontrol grubu motilite oranı ≈%72 olarak çıkarken, doksorubisin uygulanan hayvanlarda ≈%35 olarak çıkmaktadır.

Türedi ve ark (2015), Sprague-Dawley ratlarında 10 mg/kg dozda doksorubisin ve günlük 20 mg/kg i.p. resveratrol enjekte etmişlerdir. Yirmi bir günlük çalışmanın sonucunda kontrol grubunda motilite değeri %73,1 çıkarken, doksorubisin grubunda bu oran %8,1 olmuştur. Yalnızca resveratrol uygulanan gruplarda %68,34 olarak belirlenen motilite oranı, doksorubisin ile kombine kullanımlarda %57,86 çıkmış ve yalnızca doksorubisine oranla iyileşme sağlamıştır.

Anormal spermatozoa oranları değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda total anormal spermatozoon oranı %2,48 iken, doksorubisin grubunda %5,80 olarak ölçülmüştür. Yalnızca resveratrol içeren grupta %2,31 oranında anormal spermatozoon gözlenirken, doksorubisin ile kombine kullanımlarda bu oran %3,89 olarak ölçülmüştür. Spermatozoa yoğunluğu değerlendirildiğinde ise, kontrol grubu yoğunluk değerleri 22,83x10^6/ml olarak ölçülürken, bu değer doksorubisin grubunda 4,5x10^6/ml düzeylerine kadar düşmüştür. Yalnızca resveratrol içeren gruplarda yoğunluk 20,17x10^6/ml olarak ölçülerek kontrol grubu ile istatistiki bir fark yaratmazken, doksorubisin ile kombine kullanılan resveratrol grubunda yoğunluk 15x10^6/ml olarak hesaplanmış ve doksorubisinin zararlı etkisini tersine çevirmiştir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, doksorubisin uygulanan gruplarda motilite ve yoğunluk oranlarında düşüş, anormal spermatozoa oranında artış saptanmıştır. Bu bağlamda elde edilen veriler tez çalışması ile benzer özelliktedir. Doksorubisin, sitotoksik bir ajan olması nedeniyle testiküler dokuda dejenerasyonlar meydana getirmekte ve buna bağlı olarak spermatozoanın üretiminde, olgunlaştırılmasında ve kapasitasyonunda gerekli hormonların üretilmesinde aksaklıklar ortaya çıkarmaktadır. Hem tez çalışmasında hem de literatür araştırmasında düşük motilite, yüksek anormalite ve düşük yoğunluğa rastlanması olağan karşılanmaktadır.

Resveratrolün koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada Archana ve ark (2018), wistar ratlarında farklı dozlarda polivinil klorit (100mg, 500mg, PVC) ile testis toksisitesi oluşturmuşlardır. Bununla birlikte 60 gün boyunca uygulanan 20mg/kg resveratrolün motilite oranı üzerine etkilerine bakılmıştır. Kontrol grubunda %76,4 oranında çıkan motilite oranı, 100mg PVC grubunda %67,8 olarak belirlenmiştir. 500mg PVC grubunda %33,6 olarak ölçülen motilite oranı, yalnızca resveratrol kullanılan grupta motilite oranı %79,2, 500mg PVC ile kombine resveratrol kullanılan grupta %60,2 olarak görülmüştür. Spermatozoa yoğunluğuna bakıldığında, resveratrol grubunda sperma yoğunluğu 73,2x10^6 olarak hesaplanmış ve kontrol grubu (67,6x10^6/ml) ile istatistiki açıdan benzer sonucu vermiştir. 500mg PVC uygulanan grubun spermatozoa yoğunluğu 23,2x10^6/ml olarak bulunurken, 500mg PVC+ 20mg/kg resveratrol kullanılan grupta spema yoğunluğu 36,1x10^6/ml olarak hesaplanmıştır. Buna bağlı olarak resveratrol PVC nin spermatozoa yoğunluğu üzerine zararlı etkisini geri döndürmeyi başarmıştır.

Ratlarda yapılan bir diğer çalışmada ise 3mg/kg cisplatin ile indüklenen testis toksisitesini önlemek maksadıyla 20 mg/kg dozunda resveratrol kullanılmış, kontrol grubunda %76,8 motilite değeri ortaya çıkarken, cisplatin grubunda motilite değeri %53,21 olarak bulunmuştur. Cisplatin ile kombine kullanılan resveratrol grubunda ise motilite oranı %68,83 olarak ölçülmüştür (Reddy ve ark 2016).

Resveratrolün koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar derlendiğinde, resveratrol, çeşitli ajanlar ile azalan motiliteyi korumuş, anormal spermatozoa oranının artmasını önlemiş ve yoğunlukta meydana gelen düşüşü tersine çevirmeyi başarmıştır. Çalışmalardan elde edilen veriler tez çalışmasından elde edilen veriler ile örtüşmektedir. Buna göre, resveratrol herhangi bir sitotoksik ajan ile kullanıldığında koruyucu özellik göstererek spermatolojik verilerde oluşan bozulmayı tersine çevirebilmektedir. Resveratrolün buradaki olumlu etkisinin nedeninin, peroksidize olarak sertleşmiş membran lipidlerine bağlanarak membranı yumuşatması ve bu sayede serbest radikallerlere daha güçlü etkiyerek radikalleri süpürmesi olduğu düşünülmektedir (Brittes ve ark 2010, Bucak ve ark 2015).

Bir diğer koruyucu bileşik olan timokinon ile yapılan çalışmalar derlendiğinde ise, Atta ve ark (2017) 65mg/kg streptozotosin ile indüklenmiş diyabetli Albino Wistar ratlara ek olarak 50mg/kg dozda oral gavaj yöntemi ile timokinon uygulamış ve motilite değerlerini ölçülmüşlerdir. Kontrol grubunda ≈%80 oranında motilite gözlenirken, diyabet oluşturulan ratlarda ≈%35 oranında motilite değeri elde edilmiştir. Yalnızca timokinon içeren grupta kontrol grubu ile benzer (≈%78) motilite oranı çıkarken, diyabetli ratlara uygulanan timokinon grubunda motilite değeri ≈%60 olarak ölçülmüştür. Spermatozoa yoğunluk verileri incelendiğinde ise, kontrol grubunda ≈220x10^6/ml sperma bulunurken, diyabetli ratlarda bu değer ≈150x10^6/ml'ye kadar düşmüştür. Yalnızca timokinon grubu, kontrol grubu ile benzer sonuçlar gösterirken, diyabetli ratlara uygulanan timokinon grubunda spermatozoa yoğunluğu ≈200 x10^6/ml oranına kadar yükselmiştir.

Hussein ve ark (2018) ratlarda 21,2 mg/kg imidaclopride (IMI) ile indüklenen testis toksisitesi üzerine yaptıkları çalışmada, IMI' in olumsuz etkisini kompanse etmek için 10 mg/kg timokinon kullanmışlardır. Motilite verileri değerlendirildiğinde, kontrol grubunda %43 motilite gözlenirken, yalnızca IMI kullanılan grupta bu oran %38 e düşmüş, yalnızca timokinon kullanılan grupta ise

%50’ ye çıkmıştır. IMI ve timokinonun kombine kullanıldığı grupta ise motilite değeri %39,49 olmuştur. Total anormal spermatozoon bakımından kontrol %10,6, IMI %20,7, timokinon %11,57 ve IMI+timokinon %16,71 değerlerini vermiştir. Sperma yoğunluğu verileri incelendiğinde IMI (124.70x106) ve kontrol grupları (130.96x106) arasında istatistiki bir fark bulunmazken yalnızca timokinon (187.22x106) ve IMI+timokinon grupları (144.40x106) sperma yoğunluğunu artırmıştır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile Hussein ve ark (2018) ve Atta ve ark (2017)’larının elde ettikleri veriler kıyaslandığında, tek başına kullanılan timokinonun sperm motilitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak çalışmamızda kullanılan 5mg/kg timokinon içeren grubun motilite verilerini düşürdüğü, 20mg/kg timokinon içeren grubun ise motilite verilerini yükselttiği görüldü. Yukarıdaki iki çalışmada timokinon sitotoksik ajanların motilite üzerine olumsuz etkisini tersine çevirirken, sunulan tez çalışmasında timokinon doksorubisin ile kombine kullanılan gruplarda doksorubisinin zararlı etkisini tersine dönüştürememiştir.

Bitkisel kökenli bir antioksidan olan timokinon, farklı dozlarda prooksidan ya da antioksidan etki göstermektedir (Zubair ve ark 2013, Khan 2018). Timokinonun düşen motilite değerlerini tersine çevirmede, her iki çalışmada gösterdiği başarısını tez çalışmasında görülmemesi (kullanılan doz farkına bağlı olarak), timokinonun antioksidan değil prooksidan olarak etki göstermiş olduğunu düşündürmektedir. Anormal spermatozoon oranı değerlendirildiğinde, her iki çalışmada kullanılan sitotoksik ajanların anormalite oranlarını artırdığı, timokinonun sitotoksik ajanlar ile kombine kullanımında ajanların olumsuz etkisini azalttığı görülmektedir. Tez çalışmasında da (anormal spermatozoon verileri bakımından) timokinon grubunun kontrol grubuna oranla istatistiki bir fark ortaya koymadığı görülmüş, doksorubisin ile kombine kullanımlarda doksorubisinin zararlı etkisini önlediği ortaya çıkmıştır.

Yoğunluk verileri değerlendirildiğinde hem Hussein ve ark (2018) hem de Atta ve ark (2017) kullandıkları sitotksik ajanların yoğunluk verilerini düşürdüğünü, timokinonun ise meydana gelen bu düşüşü tersine çevirdiğini belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasında da yoğunluk verileri bu iki çalışma ile benzer çıkmaktadır.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, tez çalışmasında kullanılan dozlardaki timokinon spermatozoon üzerinde prooksidan etki yaparak spermatozoadaki enerji ve hareket metabolizmasını bozmuş ve motilite verilerinde farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Ancak testiküler dokuyu koruyarak anormal spermatozoon ve sperma yoğunluğu verilerinde sitotoksik ajanların olumsuz etkisini kompanse etmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen sperma membran bütünlüğü verileri incelendiğinde, R5 ve R20 grupları hariç tüm gruplar kontrol grubuna oranla düşüş gösterdi. En fazla düşüş Doksorubisin uygulanan gruplarda meydana gelirken doksorubisin ile kombine uygulamalar (D+T5, D+T20, D+R5 ve D+R20) doksorubisin'in oluşturduğu hasarı önemli ölçüde azalttı ($p<0.05$).

Shafiei-Roudbari ve ark (2017) ratlarda yaptıkları çalışmada, 15mg/kg dozunda doksorubisin (i.p.) uyguladıkları grupta %44,5 canlılık bulurken bu oran kontrol grubunda %90,16 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde El-Maddawy ve Abd El Naby (2019) yaptıkları çalışmada günlük 6mg/kg dozda doksorubisini haftada 3 gün 8 hafta boyunca uygulamışlardır. Yapılan çalışmada kontrol grubunda canlılık %90,56 olarak çıkarken bu oran doksorubisin grubunda %55,20 olmuştur.

Sperm membran bütünlüğü bakımından yapılan ölçümler ve sonuçları karşılaştırıldığında, doksorubisin her iki çalışmada da membran bütünlüğünü oldukça düşürmüştür. Bu bakımdan tez çalışmasının sonuçları ile örtüşen sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Önemli bir kemoterapötik olan doksorubisinin hem diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda hem de tez çalışmasında sperm membran bütünlüğünü bozmasının nedeninin sitotoksik etki olduğu düşünülmektedir.

Resveratrol'ün koruyucu etkinliğinin denendiği bir çalışmada Ozturk ve Ataman (2018); Yeni Zelanda tavşanlarına paklitaksel 4 mg/kg dozda uygulanmış, oluşan hasar verici etkiler resveratrol ile gidermeye çalışılmıştır. Kontrol grubunda canlılık %72,19 olurken, paklitaksel canlılığı %62,42 oranlarına kadar düşürmüştür. 4 mg/kg resveratrol uygulanan grupta canlılık %75,33 olarak çıkarken paklitaksel ile kombine kullanımda canlılık oranı %69,59 olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak resveratrol istatistiki açıdan önemli oranda paklitakselin zararlı etkisini geri dönüştürmüştür ($p<0,05$).

Resveratrol ile ilgili çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde, Ozturk ve Ataman (2018) paklitaksel uygulanan gruplarda düşen canlılık oranını resveratrol ile geri dönüştürmeyi başarmışlardır. Bu bağlamda tez çalışmasındaki sonuçlar ile örtüşen değerler görülmektedir. Bucak ve ark (2015) yaptıkları çalışmada resveratrolün boğa spermasında plazma membran bütünlüğünü koruduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bakımdan tez çalışması ile kıyaslandığında ortaya çıkan farkın boğa sperması ile rat sperması arasındaki morfolojik farka, resveratrol dozuna ve spermanın dondurulup çözdürülmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmasının bir diğer bileşiği olan timokinon ile yapılan çalışmalarda, Salahshoor ve ark (2018) 20 mg/kg dozunda morfin ile farelerde indükledikleri reprodüktif hasarı timokinonun farklı dozları (2mg/kg, 10mg/kg ve 20mg/kg) ile gidermeye çalışmışlardır. Kontrol grubu sperma örneklerinde %76,93 canlılık gözlenirken, morfin canlılığı kötü etkileyerek %54,01'e kadar düşürmüştür. Morfin ile kombine kullanımlarda 2mg/kg timokinon içeren grupta %61,45, 10mg/kg timokinon içeren grupta %65,81 ve 20mg/kg timokinon içeren grupta %61,21 olarak bulunmuş ve morfinin zararlı etkilerini tersine çevirmiştir. Jalili ve ark (2020) ratlarda yaptıkları çalışmada 10mg/kg busulfan ile oluşturdukları testis toksisitesini 4,5 mg/kg, 9 mg/kg ve 18 mg/kg dozda timokinon ile kompanse etmeye çalışmışlardır. Kontrol grubunda %75,53 çıkan canlılık oranı, busulfan gruplarında istatistiki açıdan önemli ölçüde düşüş göstererek %40,83 olarak ölçülmüştür. Timokinon gruplarında sırasıyla %76,62 ,%76,55 ve %75,05 çıkan canlılık oranları busulfan ile kombine kullanımlarda %54,35, %56,37 ve %57,21 olarak ölçülmüş ve busulfanın zararlı etkisini tersine çevirmiştir.

Timokinon verileri değerlendirildiğinde ise Salahshoor ve ark (2018) timokinonun kontrol grubuna oranla daha yüksek bir canlılık oranına sahip olduğunu ifade ederken, Jalili ve ark (2020) yaptıkları çalışmada timokinon ve kontrol grupları arasında istatistiki bir farka neden olacak bir sonuç bulamamışlardır. Her iki çalışmada da testis toksisitesine neden olan ajanların sebep olduğu düşük canlılık oranı timokinon ile tersine çevrilmiştir. Sunulan tez çalışmasında ise T5 ve T20 gruplarında düşüş gözlenmektedir. Doksorubisin ile kombine kullanılan timokinon uygulamalarında timokinon, doksorubisinin membran bütünlüğünde neden olduğu hasarı istatistiki açıdan önemli düzeyde iyileştirmiştir.

Bu bakımdan tez çalışmasında T5 ve T20 grupları, yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı sonuçlar vermektedir. Tez çalışmasındaki D+T5 ve D+T20 grupları doksorubisinin zararlı etkisini tersine çevirerek Salahshoor ve ark (2018) ve Jalili ve ark (2020) ile benzer sonuçlar göstermiştir. Yalnızca timokinon içeren gruplarda verilerin tez çalışması ile farklı çıkmasının sebebinin kullanılan kimyasalların ve canlılık ölçüm metodunun farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Akrozomal bütünlük verileri incelendiğinde, yalnızca R20 grubu (%82,75) kontrol grubuna (%86,41) oranla herhangi bir değişikliğe neden olmazken, diğer tüm gruplar kontrol grubuna oranla akrozomal bütünlüğü önemli oranda düşürdü ($p<0.05$). Doksorubisin ile kombine kullanılan gruplar doksorubisinin oluşturduğu akrozomal hasarı gidermede başarılı olamadı.

Akrozomal bütünlük tayini ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, Cabral ve ark (2018) 5 mg/kg doksorubisinin rat testis dokusu üzerine zararlı etkilerini 250 mg/kg L-carnitin ile gidermeye çalıştıkları çalışmalarında doksorubisinin akrozomal bütünlük üzerine zararlı etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Doksorubisin hem sunulan tez çalışmasında hem de Cabral ve ark (2018)'larının yaptıkları çalışmada akrozomal bütünlüğe zarar vermiştir. Doksorubisin sperma membran bütünlüğü verilerinde olduğu gibi, akrozomal bütünlüğe de hasar vermesinin sebebinin sitotoksik etkisi olduğu düşünülmektedir.

Simas ve ark (2020) yaptıkları çalışmada, streptozotocin ile indüklenen diyabetli ratların spermatozoon akrozom bütünlük oranlarını ölçmüşlerdir. Yapılan çalışma sonucunda resveratrol içeren gruplar kontrol grubu ile benzer oranda akrozomal bütünlüğe sahipken, diyabetli ratlarda resveratrolün akrozomal hasarı azaltıcı etki gösterdiği görülmüştür.

Resveratrol açısından hem tez hem de Simas ve ark (2020)'larının yaptıkları çalışmada kontrol grubuyla benzer sonuçlar vermiştir. Doksorubisin ile kombine kullanılan gruplarda resveratrol doksorubisinin zararlı etkisini geri çevirmeyi başarsa da alınan sonuçlar istatistiki olarak önem arz etmemektedir. Bu durumun nedeninin Simas ve ark (2020)'larının çalışmalarında kullandıkları streptozotocinin akrozomal bütünlüğü yarı yarıya düşürmesi, buna karşın sunulan tez çalışmasında

doksorubisinin akrozomal bütünlüğü yalnızca %10 oranında düşürmesi olarak gösterilebilir. Doksorubisin akrozomal bütünlüğü önemli düzeyde düşürmediği için resveratrolün koruyucu etkinliği istatistiki açıdan bir fark yaratmamıştır.

Timokinon verileri göz önünde bulundurulduğunda ise Miah ve ark (2018), koç spermasında yaptıkları çalışmada timokinonun 1, 10 ve 20 μg/ml dozlarının kontrol grubuna (≈%35) oranla sperm akrozomal bütünlüğünü koruduğunu (tüm gruplar için ≈%30-40) ortaya koymuşlardır.

Sunulan tez çalışmasındaki veriler ile karşılaştırıldığında, timokinon grupları kontrol grubu ile benzer sonuçlar gösterirken doksorubisin grubu akrozom bütünlüğü oranında düşüş göstermiştir. Timokinon verileri doksorubisinin zararlı etkisini kompanse etse de bu koruyucu etki istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Bu durumun sebebinin resveratrol kısmında anlatılan sebep ile aynı olduğu düşünülmektedir.

Mitokondrial aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, doksorubisin grubu kontrol grubuna oranla düşüşe neden oldu. Kombine edilen gruplardan D+R5 ve D+R20 grupları oluşan hasarı düzeltmede başarılı oldu. Timokinon (T20) ve resveratrol grupları (R5, R20) mitokondriyel aktiviteyi kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artırdı ($p<0.05$).

Cabral ve ark (2018) yaptıkları çalışmada, rat spermasında kullanılan 5 mg/kg doksorubisinin mitokondrial aktiviteyi azalttığını ortaya koymuşlardır. Bu durum sunulan tez çalışmasında da aynı şekildedir. Doksorubisinin mitokondrial aktiviteyi düşürmesinin sebebinin, doksorubisinin hücre içi Bax ve Bcl-2 dengesini bozulmasına bağlı olarak mitokondride yer alan ve enerji üretim zincirinde anahtar rol oynayan sitokrom c nin delokalizasyonuna neden olduğunu akla getirmektedir.

Lv ve ark (2019), boğa spermasında yaptıkları çalışmada farklı dozlarda resveratrolün mitokondrial aktivite üzerine yaptığı etkiyi araştırmışlar; 10, 50 ve 100 μM dozların kontrol grubuna göre mitokondrial aktivitede iyileşme gözlenmiştir. Hem Lv ve ark (2019)'larının yaptıkları çalışmada, hem de sunulan tez çalışmasında resveratrolün mitokondriyal aktiviteyi artırdığı ortaya konmuştur. Bu durumun sebebi araştırıldığında ise resveratrolün mitokondrial aktiviteyi artırdığına dair çeşitli çalışmalar bulunmuştur. Bu çalışmalar incelendiğinde "5AMP-Activated Protein

Kinase" aktivasyonu yolu ile spermasında mitokondrial aktivitenin korunduğunu, SIRT1 ve PGC-1α yolakları ile mitokondrial aktivitenin artırıldığını belirtmişlerdir (Lagouge ve ark 2006, Hui ve ark 2017, Zhu ve ark 2019). Araştırmacılar resveratrolün mitokondrial aktiviteyi artırdığına dair hemfikir olsalar da, hangi etki ile mitokondrial aktivitenin artırıldığına dair çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Rosli ve ark (2019) yaptıkları çalışmada nikotinin erkek üreme sistemi üzerine etkilerini araştırmışlar; 5 mg/kg nikotin uygulanan ratlarda nikotin mitokondrial aktiviteyi önemli ölçüde azaltırken nikotine ek olarak 5 mg/kg timokinon uygulanan gruplarda mitokondrial aktivitenin korunduğu görülmüştür.

Tez çalışması verileri değerlendirildiğinde, timokinonun doksorubisinin zararlı etkisini tersine çevirmesi bakımından Rosli ve ark (2019) ile benzer sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu durumun sebebinin timokinonun doksorubisine bağlı oluşan ROS miktarını düşürerek mitokondrial sitokrom-c delokalizasyonunu engellemesi olduğu düşünülmektedir.

Spermatoloik parametreler düşünüldüğünde, doksorubisin uygulanan gruplarda tüm parametrelerde olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Doksorubisinin spermatolojik parametreler üzerine genel anlamdaki olumsuz etkisinin nedeni patolojik incelemelerde kendini göstermektedir. Doksorubisin uygulanan gruplarda immunohistokimyasal boyamalar sonucunda apoptozun bir belirteci olarak Bax miktarında artış ve Bcl-2 miktarında azalma meydana gelmiştir. Bu tablo histopatolojik görüntülemelerde de apaçık ortaya çıkmıştır. Doksorubisin uygulanan ratların testislerinde bulunan ve spermatogenezisin şekillendiği seminifer tubüllerde erimeler, tubul çaplarında daralmalar, relatif testis ağırlığında azalma ve Johnson'un testiküler skorlamasında düşüş meydana gelmiştir. Dokuda meydana gelen bu tahribatın sonucunda spermatozzon üretimi için gerekli olan ve yapısal özelliklerini (motilite, akrozomal bütünlük, membran bütünlüğü vb.) kazandıran ortam bozulmuştur. Bu durum yalnızca timokinon ve resveratrol içeren gruplar için de geçerlidir. Doksorubisin ile kombine kullanımda doksorubisinin zararlı etkisini önlemeyi başarsalar da, yalnız başına kullanıldıklarında apoptozu tetikleyerek (Bax miktarında artış, Bcl-2 miktarında azalma) seminifer tubullere az da olsa hasar verdikleri ortaya çıkmıştır. Bu hasar kendini membran bütünlüğü, sperma yoğunluğu, motilite ve akrozomal bütünlük verilerinde göstermiştir. Doksorubisin ile kombine

kullanılan koruyucu bileşiklerin dokuyu koruduğu görülse de yalnız başlarına kullanılmamaları gerektiği anlaşılmıştır.

4.2. Relatif Testis Ağırlığı Bulguları

Relatif testis ağırlıkları değerlendirildiğinde, doksorubisin (D) içeren grup kontrol grubuna göre önemli oranda bir düşüşe neden oldu ($p<0,05$). T5, T20, R5 ve R20 gruplarında, kontrol ve doksorubisin gruplarına göre istatistiksel bir fark görülmedi ($p>0,05$). Doksorubisin ile kombine kullanılan gruplar (D+T5, D+T20, D+R5 ve D+R20) doksorubisinin neden olduğu testis ağırlık kaybını tersine çevirerek, kontrol grubuna yakın sonuçlar verdi ($p<0,05$).

Kang ve ark (2002) farelerde doksorubisinin testis üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, relatif testis ağırlığı ölçümlerinde kontrol grubu 0,38 olurken, doksorubisin grubunda 0,21 olarak ölçülmüştür. Yine aynı şekilde Das ve ark (2012) ratlarda yaptıkları çalışmada relatif testis ağırlıkları kontrol grubunda 1,39 olarak ölçülürken bu ölçüm doksorubisin gruplarında 0,96' ya kadar düşmüştür.

Johnson ve ark (2011) ratlarda yaptıkları çalışmada 200, 400 ve 1000 mg/kg dozda verilen resveratrolün oral toksisitesini araştırmışlardır. Relatif testis ağırlıkları kontrol grubunda 0,66 olarak ölçülürken, resveratrol gruplarında sırasıyla 0,65, 0,69 ve 0,69 olarak bulunmuştur. Mendes ve ark (2016) prepubertal dönemde varikosel oluşturulan ratlarda yaptıkları çalışmada, relatif testis ağırlıkları bakımından kontrol grubunda 0,43 çıkarken, varikoselli grupta 0,42, resveratrol grubunda ise 0,46 olmuştur.

Relatif testis ağırlıkları karşılaştırıldığında, hem Johnson ve ark (2011) hem de Mendes ve ark (2016) resveratrol içeren grupların relatif testis ağırlığında herhangi bir değişime sebep olmadığını belirtmişlerdir. Her iki durum sunulan tez çalışmasında da aynıdır. Alınan sonuçlar histopatolojik görüntülemeler ile desteklenmekte ve resveratrol doksorubisinin sitotoksik etkisine karşı testiküler dokuları korumaktadır. Söz konusu doksorubisin ile kombine kullanımlar olduğunda ise resveratrol içeren gruplar yalnızca doksorubisin içeren gruplardan dahi düşük sonuç vermiştir. Bu durum, doksorubisinin vücut direncini düşürmesi ve uygulanan resveratrolün strese sebep olması ile açıklanabilmektedir.

Mabrouk ve Ben Cheikh (2016) rat testis dokusunda yaptıkları çalışmada kurşunun testis üzerine olan toksisitesini 5 mg/kg timokinon ile kompanse etmişler; relatif testis ağırlığı kontrol grubu için 1,01 çıkarken, timokinon kullanılan gruplarda bu oran 1.06 olmuştur.

İncelenen çalışmalarda timokinon relatif testis ağırlığı bakımından istatistiki bir fark ortaya koymamıştır. Bu durum sunulan tez çalışmasında da bu şekilde ortaya çıkmıştır. Histopatolojik veriler ile desteklendiğinde timokinon doksorubisinin sitotoksik etkisini testiküler dokuda durdurmayı başarmış ve relatif testis ağırlğını korumuştur.

4.3. Histopatolojik Bulgular

Germinatif hücre katman kalınlığı verileri değerlendirildiğinde, yalnızca doksorubisin (D) uygulanan hayvanlarda testis germinatif hücre katman kalınlığının 32,9±1,16 µm düzeyine kadar inceldiği gözlenerek, kontrol (59,91 µm) grubuyla önemli oranda fark verdi. Doksorubisin ile kombine kullanılan timokinon (D+T5 ve D+T20) ve resveratrol (D+R5 ve D+R20) uygulamaları doksorubisinin hasar verici etkisini tersine çevirerek koruma sağladı ($p<0,05$).

Testis tubul çapı ölçümleri değerlendirildiğinde, kontrol grubu tubul çapı ortalamalarının 308,6±3,72 µm olduğu görülürken, doksorubisin (D) uygulanan grubun tubul çapı ortalamasının 232,33 µm kalınlığına kadar düştüğü gözlendi ($p<0,05$). Doksorubisin ile kombine kullanılan timokinon (D+T5 ve D+T20) uygulamalarının doksorubisinin zararlı etkisini önlediği görüldü ($p<0,05$). D+R5 ve D+R20 grupları, kontrol grubu ile benzer sonuçlar göstererek doksorubisinin zararlı etkisini önlemede oldukça etkili bulundu.

Johnson'un testiküler skorlaması ile 1'den 10'a kadar skorlanan testislerin ortalama değerleri incelendiğinde, en iyi sonucu 9,0833±0,20 ile kontrol grubunun verdiği görülmektedir. Yalnızca doksorubisin içeren grup (D) oldukça düşük bir skor alırken, timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) içeren gruplar kontrol grubuyla benzer sonuçları verdi ($p>0,05$). Doksorubisin ile kombine kullanılan timokinon (D+T5 ve D+T20) ve resveratrol (D+R5 ve D+R20) uygulamaları, doksorubisinin hasar verici etkisini istatistiki açıdan fark edilecek düzeyde tersine çevirdi ($p<0,05$).

Yukarıdaki parametrelerin ölçüldüğü diğer çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, Çeribaşı ve ark (2012) ratlarda doksroubisinin zararlı etkilerinin elajik asit ile gidermeye çalışmışlardır. Tubul çapları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda 223,6 μm olan tubul çapı doksorubisin gruplarında 129,3 μm olarak ölçülmüştür. Elajik asit grubunda tubul çapı 224,5 μm olarak ölçülürken doksorubisin ile kombine kullanımlarda bu değer 140 μm olarak belirlenmiştir. Germinatif hücre katman kalınlığı ölçüldüğünde kontrol grubu 76,4 μm, elajik asit grubu 74,73 μm, doksorubisin grubu 17,8 μm ve doksorubisin ile kombine kullanılan elajik asit grubu 37,07 μm sonucunu vermiştir. Johnson'un testiküler skorlamasında kontrol grubu 9,67 olarak skorlanırken bu skor doksorubisin grubunda 2,17 olarak ölçülmüştür. Elajik asit grubu 10 olarak skorlanırken doksorubisin ile kombine kullanılan elajik asit grubu 5 olmuştur.

Türedi ve ark (2015) ise ratlarda yaptıkları çalışmada, 10mg/kg doksorubisinin yan etkilerini 20 mg/kg resveratrol ile gidermeye çalışmışlardır. Seminifer tubul çapı kontrol grubunda 259 μm olarak ölçülürken, doksorubisin grubunda 151,4 μm olarak hesaplanmıştır. Resveratrol kullanılan gruplarda bu değer 238 μm iken D+R grubunda 224 μm olarak ölçülmüştür. Germinatif hücre katman kalınlığı verileri incelendiğinde ise, kontrol grubu 90 μm iken bu oran doksorubisin grubunda 49,02 μm kalınığına kadar düşmüştür. Resveratrol grubu 87,5 μm ile kontrol grubundan istatistiki olarak farklı olmasa da, doksorubisin ile kombine kullanılan resveratrol grubunda katman kalınlığı 82,87 μm ile doksorubisin grubunun zararlı etkilerini kompanse etmiştir. Johnson'un testikular skor verileri incelendiğinde ise kontrol grubunda 9,73, yalnızca resveratrol grubunda 9,76, doksorubisin grubunda 5,68 ve doksorubisin + resveratrol grubunda 8,97 olarak görülmektedir.

Doksorubisin üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, hem Çeribaşı ve ark (2012) hem de Türedi ve ark (2015) doksorubisinin seminifer tubul çapını ve germinatif hücre katman kalınlığını önemli ölçüde azalttığını, buna bağlı olarak Johnson'un testiküler skorlamasını da önemli düzeyde düşürdüğünü ortaya koymuşlardır. Sunulan tez çalışması ile benzer sonuçların ortaya çıkmasının sebebinin doksorubisinin testiküler dokuda meydana getirdiği dejenerasyon olduğu düşünülmektedir. Germinatif hücrelerde meydana gelen apoptoza bağlı olarak tubul

çaplarının düşmesi, germinatif hücre katman kalınlığının azalması ve Johnson'un testiküler skorunun düşmesi beklenen bir sonuçtur.

Reddy ve ark (2016) yaptıkları çalışmada 3 mg/kg cisplatin ile indüklenen testis toksisitesi üzerine 20 mg/kg resveratrolün koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Seminifer tubul çapı verileri göz önünde bulundurulduğunda; kontrol grubunda 311,26 µm olarak çıkan değerler cisplatin uygulanan gruplarda 241,85 µm ye kadar düşmektedir. Yalnızca resveratrol grubunda 329,89 µm olan tubul çapı cisplatin ile birlikte kullanılan resveratrol grubunda 275,83 µm olarak görülmektedir. Germinal hücre katman kalınlığı verileri değerlendirildiğinde; sonuçlar sırasıyla 107,5 µm (Kontrol), 116,6 µm (Resveratrol), 66,8 µm (Cisplatin), 92,8 µm (C+R) olarak ölçülmüştür.

Resveratrolün tubul çapı, germ hücre katman kalınlığı ve Johnson'un testiküler skorlaması üzerine etkilerin incelendiği her iki çalışmada da (Türedi ve ark 2015, Reddy ve ark 2016), resveratrol çeşitli ajanlar vasıtasıyla oluşturulan testiküler hasarı hem germinatif hücre katman kalınlığı, hem tubul çapı hem de Johnson'un testiküler skoru bakımından tersine çevirmeyi başarmıştır. Bu durum sunulan tez çalışmasında da bu şekildedir. Resveratrolün koruyucu etkisinin nedeni, doksorubisinin yol açtığı ROS oluşumu ara ürünlerinin (H_2O_2) etkisini kısıtlayarak apoptoza bağlı dokusal dejenerasyonların önüne geçmesi olduğu düşünülmektedir.

Jalili ve ark (2020) ratlarda yaptıkları çalışmada busulfanın testis toksisitesi üzerine yaptıkları çalışmada, timokinonu 4.5, 9 ve 18 mg/kg dozda uygulamışlardır. Germinatif hücre katman kalınlığının ölçüldüğü çalışmada kontrol grubunda 51,87 µm olan kalınlık, busulfan grubunda 24,5 µm'ye kadar düşmüştür. Yalnızca timokinon uygulanan gruplarda katman kalınlığı sırasıyla 52,62 µm, 53,27 µm ve 51,25 µm ölçülürken, busulfan ile kombine kullanılan gruplarda sırasıyla 36,87 µm, 37,87 µm ve 37,35 µm kalınlıklar ortaya çıkmıştır. Al-Sa'aidi ve ark (2009) yüksek dozda timokinonun rat testis dokusu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada; kontrol grubu tubul çapını 213,98 µm olarak ölçerken, 0,5 g/kg timokinon uygulanan gruplarda bu oran 246,32 µm, 1,5g/kg timokinon uygulanan gruplarda ise 275,08 µm olmuştur.

Atta ve ark (2017), 65 mg/kg streptozotocin ile oluşturulan diyabet olgusunun testis üzerine hasarını inceledikleri çalışmada; 50 mg/kg dozda timokinon

uygulamışlardır. Johnson'un testiküler skorlaması ile skorlanan testisin skorları sırasıyla 9,86 (Kontrol), 4,97 (Diyabetik), 9,77 (Timokinon) ve 8,71 (D+T) olarak ölçülmüştür.

Timokinon ile yapılan çalışmalar incelendiğinde kullanılan sitotoksik ajanlar, germinatif hücre katman kalınlığı, tubul çapı ve Johnson'un testiküler skorlaması verilerinde oldukça düşüşe neden olurken, çeşitli dozlarda kullanılan timokinon meydana gelen bu hasarı tersine çevirmede başarılı olmuştur. Sunulan tez çalışmasında da doksorubisinin zararlı etkisini tersine çevirmeyi başaran timokinon, yalnız başına kullanıldığında ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar göstermektedir. Tüm çalışmalarda meydana gelen bu koruyucu etkinin nedeninin, timokinonun antiapoptotik etkisi olduğu düşünülmektedir.

Histopatolojik veriler göz önünde bulundurulduğunda, tıpkı spermatolojik parametrelerde olduğu gibi doksorubisin uygulanan gruplarda oldukça yüksek bir tahribatın meydana geldiği saptanmıştır. İmmunohistokimyasal görüntülemeler ile elde edilen sonuçlar değerlendiğirildiğinde, doksorubisin içeren gruplarda yüksek Bax immunoreaktivitesi ve düşük Bcl-2 immunoreaktivitesi olduğu ve buna bağlı olarak dokuların apoptoza sürüklendiği düşünülmüştür. Bu düşüncenin doğruluğu histopatolojik görüntülemelere bakıldığında bir kez daha anlaşılmıştır. Doksorubisin uygulanan gruplarda germinatif hücre katman kalınlığı diğer tüm gruplara kıyasla önemli oranda düşmüş, aynı şekilde tubul çapında azalma görülmüş ve bu dokular Johnson'un testiküler skorlamasında da oldukça düşük bir skor almıştır. Meydana gelen bu hücresel yıkımlanma doksorubisin uygulanan gruplarda relatif testis ağırlığının da düşmesine neden olmuştur. Yalnızca timokinon ve resveratrol uygulanan gruplar, Bax immunoreaktivitesi bakımından kontrol grubuna oranla az da olsa olumsuz sonuçlar gösterseler de bu durum histopatolojik değerlendirmelerde önemsenecek bir zarara yol açmamıştır. Doksorubisin ile kombine kullanıldıklarında ise doksorubisinin zararlı etkisini önemli ölçüde geri çevirerek doksorubisine kıyasla histopatolojik açıdan koruyucu özellik göstemişlerdir.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Bax verileri değerlendirildiğinde en düşük bax değerinin kontrol grubunda (4,19±0,46) olduğu gözlendi. Doksorubisin içeren grupta (D) bax miktarı oldukça yükselerek, hasar verici etkisi (apoptotik etki) ortaya kondu ($p<0,05$). Timokinon

(T5, T20) ve resveratrol (R5 ve R20) grupları incelendiğinde, T5 grubu hariç diğer grupların hepsi bax miktarında artışa neden olarak apoptotik bir etki gösterdi. D+T5 grubunun bax miktarı, kontrol grubuyla istatistiksel olarak benzer sonuçlar vererek koruyucu etkinlik (antiapoptotik etki) gösterdi. Diğer kombine gruplar (D + T20, D + R5, D + R20) doksorubisinin oluşturduğu hasarı tersine çevirmesine rağmen, kontrol grubu düzeyinde koruyucu bir etkinlik oluşturmadı.

Bcl-2 sonuçları değerlendirildiğinde, doksorubisin (D) grubuna ait Bcl-2 değeri (2,86±1,03) diğer tüm gruplara oranla önemli ölçüde düşük çıkarak apoptotik etki gösterdi. Timokinon (T5 ve T20) ve resveratrol (R5 ve R20) içeren gruplar, kontrol grubuna benzer sonuçlar verdi ($p<0,05$). Aynı şekilde; D+T5, D+T20, D+R5, D+R20 kontrol grubuyla benzer ya da D grubundan daha yüksek Bcl-2 skorları vererek, doksorubisinin hasar verici etkisini tersine çevirerek antiapoptotik etki gösterdi ($p<0,05$).

Khames ve ark (2019) ratlarda yaptıkları çalışmada 2,62 mg/kg dozda doksorubisin uygulamışlar, doksorubisinin kontrol grubuna oranla bax miktarını 6 kat artırdığını, aynı şekilde Bcl-2 miktarını da oldukça düşürdüğünü ortaya koymuşlardır.

Fahim ve ark (2019) ise yine ratlarda yaptıkları çalışmada, stres faktörlerinin testis dokusunda Bax miktarını oldukça artırdığını, buna bağlı olarak resveratrolün 80 mg/kg dozda kullanıldığında ise kontrol grubuyla benzer şeklide Bax miktarı verdiğini, strese bağlı Bax oluşumunu ise azalttığını ifade etmişlerdir. Aynı şekilde strese bağlı testis toksisitesinde Bcl-2 miktarı düşüş göstermiştir. Yalnızca resveratrol içeren gruplarda kontrol grubuna oranla bir değişiklik gözlenmezken, strese maruz bırakılan gruplarda uygulanan resveratrol strese bağlı Bcl-2 miktarını azaltmayarak, antiapoptotik etki göstermiştir.

Sheikhbahaei ve ark (2016) farelerde 20 mg/kg Methotrexate (MTX) uygulayarak Bax miktarının arttığını, Bcl-2 miktarının ise azaldığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, MTX e bağlı şekillenen toksisitenin engellenmesi için 2, 10 ve 20mg/kg timokinon uygulanmış ve timokinon uygulanan gruplarda Bax ve Bcl-2 miktarları MTX gruplarına oranla sırasıyla düşerek ve artarak kontrol grubuna benzer sonuçlar oluşturmuştur.

Yapılan çalışmalar ve tez çalışmasında çeşitli yollar ile indüklenmiş testis toksisitesi olgularının timokinon ve resveratrol ile kombine kullanılan uygulamalarda korunduğu saptanmuştur. Tez çalışmasında ise yalnız başlarına kullanılan timokinon ve resveratrol, Bax miktarında artış ve Bcl-2 miktarlarında düşüşe neden olmuştur. Bu durumun nedeni, hem timokinonun hem de resveratrolün serbest oksijen ile elektron redüksiyonuna uğrayarak antioksidan değil prooksidan fromuna dönüşmeleridir. Prooksidan formundaki timokinon ve resveratrol LPO'a neden olup H_2O_2 açığa çıkararak kemoterapötik benzeri etki göstermektedir. Bax miktarında meydana gelen artış ve Bcl-2 miktarında meydana gelen düşüş bu fenomen ile açıklanabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemoterapi, uzun yıllardır kanser tedavisinde kullanılan en yaygın tedavi şeklidir. Tedavi tekniklerindeki değişimler ve yeni kemoterapötikler ile son yıllarda kanser hastalığının sağ kalım oranı da oldukça yükselmiştir. Her ne kadar sağ kalım oranı yükselse de doku/organ spesifik olmayan kemoterapötikler erkeklerde testiküler dokuya zarar vererek kısırlığa neden olabilmektedir. Kemoterapötik ilaç kullanılan insanlarda ve hayvanlarda bir yıldan üzün süren azospermi olguları bildirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında kemoterapötik olarak kullanılan doksorubisinin testis üzerine sitotoksik etkisinin olduğu literatür verilerini destekler şekilde ortaya konmuştur.

Doksorubisinin meydana getiridiği testis toksisitesi 5 mg/kg ve 20 mg/kg dozda kullanılan timokinon ve resveratrol ile engellenmeye çalışılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Her iki antioksidan da spermatolojik parametreler, morfolojik bulgular, histopatolojik değerlendirmeler ve immunohistokimyasal değerlendirmeler bakımından testis dokusunu korumuştur.

Tüm bu veriler ışığında kullanılan timokinon ve resveratrolün testis dokusunu koruduğu ortaya çıkmakta, uzun süreli gözlem ile azospermi süresinin kısalıp kısalmadığı araştırılmalıdır.

Her ne kadar doksorubisin ile kombine kullanımlarda önemli düzeyde koruma sağlasalar da, yalnız başına kullanılan timokinon ve resveratrol hücreleri az da olsa apoptoza sürüklemiş, buna bağlı olarak tubulus seminiferus contortuslarda meydana gelen hafif dejenerasyon kimi spermatolojik parametreleri olumsuz etkilemiştir. Bu nedenle timokinon ve resveratrolün yalnız başlarına kullanılmaları olumlu etkisinden ziyade hasara neden olduğu ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

Abdel-Wahhab M, Aly S, 2005. Antioxidant property of Nigella sativa (black cumin) and Syzygium aromaticum (clove) in rats during aflatoxicosis. J Appl Toxicol, 25, 3, 218-23.

Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D, Mathur PP, 2009. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. Reproductive Biology and Endocrinology, 7, 1, 1-20.

Agca Y, 2020. Assisted reproductive technologies and genetic modifications in rats. In: The laboratory rat. Eds: Suckow MA, Wilson RP, Hankenson FC, Foley PL: Elsevier, p. 181-213.

Aggarwal BB, Shishodia S, 2005. Resveratrol in health and disease. In. Eds: Aggarwal BB, Shishodia S, 1: CRC Press, p. 1-643.

Akalın PP, Bülbül B, Çoyan K, Başpınar N, Kırbaş M, Bucak MN, Güngör Ş, Öztürk C, 2015. Relationship of blood and seminal plasma ceruloplasmin, copper, iron and cadmium concentrations with sperm quality in Merino rams. Small Rum Res, 133, 135-9.

Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN, 2006. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol, 543, 1-3, 40-7.

Al-Sa'aidi J, Al-Khuzai A, Al-Zobaydi N, 2009. Effect of alcoholic extract of Nigella sativa on fertility in male rats. Iraqi J Vet Sci, 23, 123-8.

Al-Saleh IA, Billedo G, El-Doush II, 2006. Levels of selenium, dl-α-tocopherol, dl-γ-tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of Nigella sativa seeds. J Food Compos Anal, 19, 2-3, 167-75.

Alyoussef A, Al-Gayyar M, 2016. Thymoquinone ameliorates testicular tissue inflammation induced by chronic administration of oral sodium nitrite. Andrologia, 48, 5, 501-8.

Archana D, Supriya C, Girish B, Kishori B, Reddy PS, 2018. Alleviative effect of resveratrol on polyvinyl chloride-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. Food Chem Toxicol, 116, 173-81.

Atıcı E, 2007. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. Türk Onkoloji Dergisi, 22, 4, 197-204.

Atta MS, Almadaly EA, El-Far AH, Saleh RM, Assar DH, Al Jaouni SK, Mousa SA, 2017. Thymoquinone defeats diabetes-induced testicular damage in rats targeting antioxidant, inflammatory and aromatase expression. Int J Mol Sci, 18, 5, 919.

Ayan M, Tas U, Sogut E, Caylı S, Kaya H, Esen M, Erdemir F, Uysal M, 2016. Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury. Andrologia, 48, 2, 143-51.

Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH, Mohammad RM, 2010. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. Nutr Cancer, 62, 7, 938-46.

Blake D, Allen R, Lunec J, 1987. Free radicals in biological systems—a review orientated to inflammatory processes. Br Med Bull, 43, 2, 371-85.

Blumenfeld Z, 2012. Chemotherapy and fertility. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 26, 3, 379-90.

Brilhante O, Stumpp T, Miraglia S, 2011. Long-term testicular toxicity caused by doxorubicin treatment during pre-pubertal phase. Int J Med Sci, 3, 2, 52-60.

Brittes J, Lucio M, Nunes C, Lima J, Reis y, 2010. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. Chemi Phys Lipids, 163, 8, 747-54.

Brown DI, Griendling KK, 2015. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. Circ Res, 116, 3, 531-49.

Bucak M, Ataman M, Başpınar N, Uysal O, Taşpınar M, Bilgili A, Öztürk C, Güngör Ş, Inanc M, Akal E, 2015. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. Andrologia, 47, 5, 545-52.

Burits M, Bucar F, 2000. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytother Res, 14, 5, 323-8.

Cabral R, Mendes T, Vendramini V, Miraglia S, 2018. Carnitine partially improves oxidative stress, acrosome integrity, and reproductive competence in doxorubicin-treated rats. Andrology, 6, 1, 236-46.

Carballada R, Esponda P, 1992. Role of fluid from seminal vesicles and coagulating glands in sperm transport into the uterus and fertility in rats. Reproduction, 95, 3, 639-48.

Carballada R, Esponda P, 1993. Structure of the vaginal plugs generated by normal rats and by rats with partially removed seminal vesicles. J Exp Zool, 265, 1, 61-8.

Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK, 2012. Resveratrol: French paradox revisited. Front Pharmacol, 3, 141.

Cheeseman K, Slater T, 1993. An introduction to free radical biochemistry. British medical bulletin, 49, 3, 481-93.

Conklin KA, 2004. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. Integr Cancer Ther, 3, 4, 294-300.

Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A, 2012. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. Exp Toxicol Pathol, 64, 7-8, 717-24.

Darakhshan S, Pour AB, Colagar AH, Sisakhtnezhad S, 2015. Thymoquinone and its therapeutic potentials. Pharmacol Res, 95, 138-58.

Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC, 2012. Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. Amino acids, 42, 5, 1839-55.

De La Lastra CA, Villegas I, 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. Biochem Soc Trans, 35, 5, 1156-60.

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C, 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Reprod, 2, 1, 48-54.

Dohle GR, 2010. Male infertility in cancer patients: review of the literature. Int J Urol, 17, 4, 327-31.

Dupré-Crochet S, Erard M, Nüβe O, 2013. ROS production in phagocytes: why, when, and where? J Leukoc Biol, 94, 4, 657-70.

Ďuračková Z, Gvozdjáková A, 2008. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Mitochondrial medicine. Eds: Gvozdjáková A: Springer, p. 19-54.

Dwinell MR, 2010. Online tools for understanding rat physiology. Brief Bioinformatics, 11, 4, 431-9.

El-Maddawy ZK, Abd El Naby WSH, 2019. Protective effects of zinc oxide nanoparticles against doxorubicin induced testicular toxicity and DNA damage in male rats. Toxicology Research, 8, 5, 654-62.

El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA, 2005. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. Int J Cancer, 117, 3, 409-17.

Elsherbiny NM, El-Sherbiny M, 2014. Thymoquinone attenuates Doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: Role of Nrf2 and NOX4. Chem-Biol Interact, 223, 102-8.

Erdoğan BB, Uzaslan EK, 2003. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. Turkiye Klinikleri Arch Lung, 4, 3, 165-74.

Evans G, Maxwell WC, 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Ed. 2, Butterworths, p. 1-194.

Fahim AT, Abd El-Fattah AA, Sadik NAH, Ali BM, 2019. Resveratrol and dimethyl fumarate ameliorate testicular dysfunction caused by chronic unpredictable mild stress-induced depression in rats. Arch Biochem Biophys, 665, 152-65.

Fan P, Marston A, Hay AE, Hostettmann K, 2009. Rapid separation of three glucosylated resveratrol analogues from the invasive plant Polygonum cuspidatum by high-speed countercurrent chromatography. J Sep Sci, 32, 17, 2979-84.

Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J, 2005. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin, 37, 11, 719-27.

Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon J-M, 1997. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. Life Sci, 61, 21, 2103-10.

Filip V, Plockova M, Šmidrkal J, Špičková Z, Melzoch K, Schmidt Š, 2003. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. Food Chem, 83, 4, 585-93.

Florence T, 1984. The production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide. J Inorg Biochem, 22, 4, 221-30.

Frémont L, 2000. Biological effects of resveratrol. Life Sci, 66, 8, 663-73.

Gali-Muhtasib HU, Kheir WGA, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA, 2004. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. Anti-Cancer Drugs, 15, 4, 389-99.

Garner DL, Johnson LA, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol Reprod, 53, 2, 276-84.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE, 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol Reprod, 57, 6, 1401-6.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev, 13, 15, 1899-911.

Gutteridge JM, 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. Chem-Biol İnteract, 91, 2-3, 133-40.

Hajdu SI, 2004. Greco-Roman thought about cancer. Cancer, 100, 10, 2048-51.
Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H, 2004. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytother Res, 18, 3, 195-9.
Hala M, 2011. Protective effect of Nigella sativa, linseed and celery oils against testicular toxicity induced by sodium valproate in male rats. Am J Sci, 7, 5, 687-93.
Halliwell B, Gutteridge JM, 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys, 246, 2, 501-14.
Halliwell B, Gutteridge JM, 1990. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Methods in enzymology. Eds: Packer L, Glazer AN: Elsevier, p. 1-85.
Halliwell B, Gutteridge JM, 2015. Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, USA, p. 1-823.
Hassanein KM, El-Amir YO, 2017. Protective effects of thymoquinone and avenanthramides on titanium dioxide nanoparticles induced toxicity in Sprague-Dawley rats. Pathol Res Pract, 213, 1, 13-22.
Helvacıoğlu S, Charesaz M, Aydın A, 2018. Doksorubisine Bağlı Genotoksik Etkiler ve Fitokimyasalların Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi. J Lit Pharm Sci, 7, 3, 237-25.
Henkel RR, 2011. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. Asian J Androl, 13, 1, 43.
Hou M, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O, Jahnukainen K, 2005. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. Cancer Res, 65, 21, 9999-10005.
Hubscher C, Brooks D, Johnson J, 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. Biotech Histochem, 80, 2, 79-87.
Hui Y, Lu M, Han Y, Zhou H, Liu W, Li L, Jin R, 2017. Resveratrol improves mitochondrial function in the remnant kidney from 5/6 nephrectomized rats. Acta Histochem, 119, 4, 392-9.
Hussein SA, Khalaf-Allah SS, Tag El-Din HA, Amin A, Khallaf RM, 2018. Potential Role of Thymoquinone in Imidaclopride Induced Testicular Toxicity in Male Albino Rats. Benha Veterinary Medical Journal, 34, 3, 64-82.
Jalali AS, Hasanzadeh S, 2013. Crataegus monogyna fruit aqueous extract as a protective agent against doxorubicin-induced reproductive toxicity in male rats. Avicenna J Phytomed, 3, 2, 159.
Jalili C, Abdolmaleki A, Faramarzi A, Salahshoor MR, 2020. Effects of Thymoquinone and Busulfan on Reproductive Parameters in Male Rats: An Experimental Study. J Clin Diagn Res, 14, 1.
Johnson W, Morrissey R, Usborne A, Kapetanovic I, Crowell J, Muzzio M, McCormick D, 2011. Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. Food Chem Toxicol, 49, 12, 3319-27.
Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S, 2002. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. Mol Cell Biochem, 234, 1, 119-24.
Kang J-K, Lee Y-J, No K-O, Jung E-Y, Sung J-H, Kim Y-B, Nam S-Y, 2002. Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. Reprod Toxicol, 16, 3, 291-8.

Karabulut H, Gülay MŞ, 2016. Antioksidanlar. MAE Vet Fak Derg, 1, 1, 65-76.
Kasapçopur Özel GS, Birdane YO, 2014. Antioksidanlar. Kocatepe Vet J, 7, 2, 41-52.
Khalife K, Lupidi G, 2007. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. Free Radic Res, 41, 2, 153-61.
Khames A, Khalaf MM, Gad AM, Abd El-raouf OM, Kandeil MA, 2019. Nicorandil combats doxorubicin–induced nephrotoxicity via amendment of TLR4/P38 MAPK/NFκ-B signaling pathway. Chem Biol Interact, 311, 108777.
Khan A, 2018. Antioxidant and anti-inflammatory action of thymoquinone. In: Molecular and Therapeutic Actions of Thymoquinone. Eds: Younus H: Springer, p. 41-56.
Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD, 1997. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science, 275, 5303, 1132-6.
Kohen R, Nyska A, 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol, 30, 6, 620-50.
Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS, 2010. Free Radicals: Their Beneficial and Detrimental Effects on Sperm Function. Ind J Exp Biol, 48, 5, 425-35.
Kunwar A, Priyadarsini K, 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. J Med Allied Sci, 1, 2, 53.
Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1α. Cell, 127, 6, 1109-22.
Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K, 2006. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. J Clin Oncol, 24, 18, 2917-31.
Lev E, Amar Z, 2000. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. J Ethnopharmacol, 72, 1-2, 191-205.
Levi M, Tzabari M, Savion N, Stemmer SM, Shalgi R, Ben-Aharon I, 2015. Dexrazoxane exacerbates doxorubicin-induced testicular toxicity. Reproduction, 150, 4, 357-66.
Liu Y, Fiskum G, Schubert D, 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J Neurochem, 80, 5, 780-7.
Lohmiller JJ, Swing SP, Hanson MM, 2020. Reproduction and breeding. In: The laboratory rat. Eds: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL: Elsevier, p. 157-79.
Lumen, Electron Transport Chain, 2016. Erişim tarihi 30.12.2016. Erişim adresi, https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-electron-transport-chain/.
Luna L, 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, McGraw-Hill, New York, NY, USA, Blakiston Division, p. 1-258.
Lv C, Larbi A, Wu G, Hong Q, Quan G, 2019. Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. Animal Reprod Sci, 208, 106127.

Mabrouk A, Ben Cheikh H, 2016. Thymoquinone supplementation ameliorates lead-induced testis function impairment in adult rats. Toxicol Ind Health, 32, 6, 1114-21.
Mabrouk A, Ben HC, 2015. Thymoquinone supplementation reverses lead-induced oxidative stress in adult rat testes. Gen Physiol Biophys, 34, 1, 65-72.
Maeda K-I, Ohkura S, Tsukamura H, 2000. Physiology of reproduction. In: The laboratory rat. Eds: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL: Elsevier, p. 145-76.
Malhotra A, Bath S, Elbarbry F, 2015. An organ system approach to explore the antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective actions of resveratrol. Oxid Med Cell Longev, 2015.
Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM, 2002. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. Cell Biochem Funct, 20, 2, 143-51.
Martinon F, Tschopp J, 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. Cell, 117, 5, 561-74.
Matthews Jr MK, Adler NT, 1978. Systematic interrelationship of mating, vaginal plug position, and sperm transport in the rat. Physiol Behav, 20, 3, 303-9.
McCord JM, Fridovich I, 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. J Biol Chem, 243, 21, 5753-60.
Mello Filho A, Hoffmann M, Meneghini R, 1984. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem J, 218, 1, 273-5.
Mendes TB, Paccola CC, de Oliveira Neves FM, Simas JN, da Costa Vaz A, Cabral R, Vendramini V, Miraglia SM, 2016. Resveratrol improves reproductive parameters of adult rats varicocelized in peripuberty. Reproduction, 152, 1, 23-35.
Meseguer M, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Martinez-Jabaloyas J, Gil-Salom M, 2003. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. Hum Reprod, 18, 6.
Miah AG, Bathgate R, Hamano Ki, Salma U, 2018. Effects of pre-freeze Nigella sativa oil supplementation on cryosurvival of ovine spermatozoa. Reprod Domest Anim, 53, 6, 1424-33.
Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S, 2005. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. Life Sci, 76, 13, 1439-53.
Mohr U, Dungworth DL, Capen CC, 1992. Pathobiology of the aging rat, International Life Sciences Institute, p.
Morrison WB, 2002. Cancer in dogs and cats: Medical and Surgical Management, Teton NewMedia, p. 1-760.
Nagatani S, Guthikonda P, Foster DL, 2000. Appearance of a nocturnal peak of leptin secretion in the pubertal rat. Horm Behav, 37, 4, 345-52.
Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM, 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biology of reproduction, 68, 5, 1828-35.
NuffieldTrust, Cancer Survival Rates, 2020. Erişim tarihi 15.11.2020. Erişim adresi, https://www.nuffieldtrust.org.uk/resource/cancer-survival-rates.

O'Neil MJ, Heckelman P, Koch C, Roman K, 2006. The Merck Index 14th. Whitehouse Station, NJ: Merck, 811.

Orallo F, 2006. Comparative studies of the antioxidant effects of cis-and trans-resveratrol. Curr Med Chem, 13, 1, 87-98.

Ozer H, Yenicesu G, Arici S, Cetin M, Tuncer E, Cetin A, 2012. Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors. Diagn Pathol, 7, 1, 124.

Ozturk C, Ataman MB, 2018. Effect of paclitaxel and resveratrol on New Zealand rabbit semen. Asian Pacific J Reprod, 7, 6, 266.

Öztürk AE, Bucak MN, 2019. Embriyo Transfer Manipülasyonlarında Antioksidan Kullanımı. Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics, 5, 1, 26-33.

Öztürk AE, Bucak MN, Bodu M, Başpınar N, Çelik İ, Shu Z, Keskin N, Gao D, 2019. Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. In: Cryopreservation. Eds: IntechOpen, p. 1-42.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V, 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. Int J Androl, 35, 2, 109-24.

Prates C, Sousa S, Oliveira C, Ikram S, 2011. Prostate metastatic bone cancer in an Egyptian Ptolemaic mummy, a proposed radiological diagnosis. Int J Androl, 1, 2, 98-103.

Prysyazhna O, Wolhuter K, Switzer C, Santos C, Yang X, Lynham S, Shah AM, Eaton P, Burgoyne JR, 2019. Blood pressure–lowering by the antioxidant resveratrol is counterintuitively mediated by oxidation of cGMP-dependent protein kinase. Circulation, 140, 2, 126-37.

Reddy KP, Madhu P, Reddy PS, 2016. Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. Food Chem Toxicol, 91, 65-72.

Reindl W, Yuan J, Krämer A, Strebhardt K, Berg T, 2008. Inhibition of polo-like kinase 1 by blocking polo-box domain-dependent protein-protein interactions. Chem Biol, 15, 5, 459-66.

Renaud Sd, de Lorgeril M, 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. The Lancet, 339, 8808, 1523-6.

Rosli FD, Hashim NH, Osman K, Ibrahim SF, Kabir N, 2019. Ameliorative Effects of Thymoquinone on Sperm Parameters and Testosterone Level of Nicotine-Treated Sprague Dawley Rats. Braz Arch Biol, 62.

Salahshoor MR, Haghjoo M, Roshankhah S, Makalani F, Jalili C, 2018. Effect of thymoquinone on reproductive parameter in morphine-treated male mice. Adv Biomed Res, 7.

Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Martins N, Sharifi-Rad J, 2018. Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. Biomedicines, 6, 3, 91.

Samali A, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S, 1998. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. FEBS letters, 431, 2, 167-9.

Sayed MM, Hassanein KM, Senosy W, 2014. Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. Toxicol Rep, 1, 612-20.

Schieber M, Chandel NS, 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current Biol, 24, 10, R453-R62.
Shafiei-Roudbari SK, Malekinejad H, Janbaz-Aciabar H, Razi M, 2017. Crosstalk between E2F1 and P53 transcription factors in doxorubicin-induced DNA damage: Evidence for preventive/protective effects of silymarin. J Pharm Pharmacol, 69, 9, 1116-24.
Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J, 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. Biochimie, 135, 111-25.
Sharp P, Villano JS, 2012. The laboratory rat, CRC press, p. 1-378.
Sheikhbahaei F, Khazaei M, Rabzia A, Mansouri K, Ghanbari A, 2016. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced germ cell apoptosis in male mice. Int J Fertil Steril, 9, 4, 541.
Shinoda K, Mitsumori K, Yasuhara K, Uneyama C, Onodera H, Hirose M, Uehara M, 1999. Doxorubicin induces male germ cell apoptosis in rats. Arch Toxicol, 73, 4-5, 274-81.
Shokoohi M, Shoorei H, Soltani M, Abtahi-Eivari SH, Salimnejad R, Moghimian M, 2018. Protective effects of the hydroalcoholic extract of Fumaria parviflora on testicular injury induced by torsion/detorsion in adult rats. Andrologia, 50, 7, e13047.
Simas JN, Mendes TB, Fischer LW, Vendramini V, Miraglia SM, 2020. Resveratrol improves sperm DNA quality and reproductive capacity in type 1 diabetes. Andrology, 9, 1, 384-99.
Simic MG, Bergtold DS, Karam LR, 1989. Generation of oxy radicals in biosystems. Mutat Res-Fund Mol M, 214, 1, 3-12.
Sofikitis N, Takahashi C, Kadowaki H, Shimamoto T, Nakamura I, Miyagawa I, 1992. The role of the seminal vesicles and coagulating glands in fertilization in the rat. Int J Androl, 15, 1, 54-61.
Soylu SM, 2010. Rat fizyolojisi. J Clin Anal Med, 23, 22-5.
Speth P, Van Hoesel Q, Haanen C, 1988. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. Clin Pharmacokinet, 15, 1, 15-31.
Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, 2001. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. J Biol Chem, 276, 25, 22586-94.
Suckow MA, Hankenson FC, Wilson RP, Foley PL, 2019. The laboratory rat, Academic Press, p. 1-1162.
Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM, 2006. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II–mediated form of cell death. Cancer res, 66, 9, 4863-71.
Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Saiko P, Jäger W, 2010. Resveratrol and resveratrol analogues—structure—activity relationship. Pharm Res, 27, 6, 1042-8.
TÜİK, Ölüm Nedeni İstatistikleri 2018, 2019. Erişim tarihi 21.06.2020. Erişim adresi, https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710.
Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Kutlu Ö, Kahraman C, 2015. Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. Exp Toxicol Pathol, 67, 3, 229-35.
Ulasli SS, Celik S, Gunay E, Ozdemir M, Hazman O, Ozyurek A, Koyuncu T, Unlu M, 2013. Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester

and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo (a) pyrene. Asian Pac J Cancer Prev, 14, 10, 6159-64.

Ulukaya E, Pirianov G, Kurt M, Wood E, Mehmet H, 2003. Fenretinide induces cytochrome c release, caspase 9 activation and apoptosis in the absence of mitochondrial membrane depolarisation. Cell Death Differ, 10, 7, 856-9.

Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem-Biol Interact, 160, 1, 1-40.

Waffo Teguo P, Fauconneau B, Deffieux G, Huguet F, Vercauteren J, Mérillon J-M, 1998. Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from Vitis vinifera cell cultures. J Nat Prod, 61, 5, 655-7.

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK, 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metab Dispos, 32, 12, 1377-82.

Waxman J, 1983. Chemotherapy and the adult gonad: a review. J R Soc Med, 76, 2, 144-8.

WHO, Cancer, 2019. Erişim tarihi 20.12.2020. Erişim adresi, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=Key%20facts,%2D%20and%20middle%2Dincome%20countries.

Wikipedia, Edwin Smith Papyrus, 2020. Wikipedia, Erişim tarihi 25.09.2020. Erişim adresi, https://en.wikipedia.org/wiki/Edwin_Smith_Papyrus.

Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB, 2012. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem Pharmacol, 83, 4, 443-51.

Yarsan E, 2014. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. Van Vet J, 9, 1, 89-95.

Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç T, 2007. Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, p. 1-300.

Zhu Z, Li R, Fan X, Lv Y, Zheng Y, Hoque S, Wu D, Zeng W, 2019. Resveratrol Improves Boar Sperm Quality via 5AMP-Activated Protein Kinase Activation during Cryopreservation. Oxid Med Cell Longev, 2019.

Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli Aa, Tillement J, 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. Drugs Exp Clin Res, 25, 2-3, 87-97.

Zubair H, Khan H, Sohail A, Azim S, Ullah M, Ahmad A, Sarkar F, Hadi S, 2013. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. Cell Death Dis, 4, 6, e660-e.

7. EKLER

7.1. EK (ETİK KURUL)

7.2. TURNİTİN RAPORU

DOKSORUBİSİNİN RAT TESTİS DOKUSUNDA MEYDANA GETİRDİĞİ HASARLARIN BELİRLENMESİ VE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİLERİ

ORIJINALLIK RAPORU

%5	%4	%2	%2
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	www.jcam.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	celljournal.org İnternet Kaynağı	<%1
5	Sinem HELVACIOĞLU, Mohammad CHAREHSAZ, Ahmet AYDIN. "A Review on Doxorubicin Related Genotoxicity and Protective Effects of Phytochemicals", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2018 Yayın	<%1
6	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

7	tanjuyildon.tr.gg İnternet Kaynağı	<%1
8	ÖNDER, Feyyaz, ÇENESİZ, Metin, KAYA, Mehmet, UZUN, Metehan and KARADEMİR, Güler. "Japon bıldırcınlarında (Coturnix coturnix japonica) rasyona yüksek düzeylerde bakır ilavesinin tiroit hormonları ve bazı kan değerleri üzerine etkisi", TUBITAK, 2011. Yayın	<%1
9	ALTUNTAŞ, Elif, TURGUT, Tevfik, İLHAN, Necip, DEVECİ, Figen, MUZ, M. Hamdi and ÇELİK, İlhami. "KOAH'lı hastalarda oksidan-antioksidan düzeyleri", TUBITAK, 2003. Yayın	<%1
10	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
11	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	www.bilimvetekno.com İnternet Kaynağı	<%1
13	acikerisim.ikc.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
14	123dok.com İnternet Kaynağı	<%1
15	studentsrepo.um.edu.my	

	İnternet Kaynağı	<%1
16	Submitted to Munzur Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
17	vetdergi.kafkas.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
18	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
19	text-id.123dok.com İnternet Kaynağı	<%1
20	Submitted to University of Westminster Öğrenci Ödevi	<%1
21	www.europeanreview.org İnternet Kaynağı	<%1
22	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
23	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
24	Submitted to Kafkas Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
25	Hsu, C.c.. "Preventive effect of Ganoderma amboinense on acetaminophen-induced acute liver injury", Phytomedicine, 200811 Yayın	<%1

26	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
27	www.mertalkac.com İnternet Kaynağı	<%1
28	www.ijkd.org İnternet Kaynağı	<%1
29	www.erpacongress.com İnternet Kaynağı	<%1
30	es.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
31	www.the-scientist.com İnternet Kaynağı	<%1
32	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
33	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
34	issuu.com İnternet Kaynağı	<%1
35	www.izmir-vho.org İnternet Kaynağı	<%1
36	studylibtr.com İnternet Kaynağı	<%1
37	turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<%1

38	Sahar Rahman, Sarwat Sultana. " Glycyrrhizin exhibits potential chemopreventive activity on 12- -tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion in swiss albino mice ", Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2008 Yayın	<%1
39	vfdergi.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
40	veteriner.fusabil.org İnternet Kaynağı	<%1
41	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
42	doczz.net İnternet Kaynağı	<%1
43	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1
44	fliphtml5.com İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart	üzerinde	Eşleşmeleri çıkar	< 5 words
Bibliyografyayı Çıkart	üzerinde		

7.3. ÖZGEÇMİŞ