T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSPLATİN TOKSİSİTESİNİN SIÇAN TESTİSİNDE YARATTIĞI HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERE ÇİNKONUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Burcu GÜLTEKİN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ veEMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Aydan CANBİLEN

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSPLATİN TOKSİSİTESİNİN SIÇAN TESTİSİNDE YARATTIĞI HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERE ÇİNKONUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Burcu GÜLTEKİN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Aydan CANBİLEN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10102041 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

ii. ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Selçuk Duman ve Prof. Dr. T. Murad Aktan'a, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ender Erdoğan'a

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Öğretim Üyesi Prof. Dr. Melek Öztürk ve Doç. Dr. Matem Tunçdemir'e,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk ve laboratuar teknisyeni arkadaşlarıma,

Biyofizik Ana Bilim Dalı Öğretim Görevlisi Seçkin Tuncer'e ve Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Görevlisi Gökhan Cüce'ye, doktora eğitimim boyunca birlikte çalıştığım yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Aslıhan Şaylan ve Seda Çetinkaya'ya şükranlarımı sunarım.

Eğitimim süresince maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana her zaman kuvvet veren eşime, biricik kızımla sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

ÖNSÖZ i

İÇİNDEKİLER ii

SİMGELER VE KISALTMALAR v

1. GİRİŞ 1

1.1. Testisin Embriyolojisi 2

1.2. Testisin Histolojisi 5

1.2.1. Seminifer Tübüller 7

1.2.2. Sertoli Hücreleri 8

1.2.3. Spermatogenik Hücreler 9

1.2.4. Spermatogenezis 9

1.2.5. Spermiyogenezis 10

1.2.6. Spermatogenezis'in Kontrolü 11

1.2.7. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri 12

1.2.8. Erkek Genital Yollar Histolojisi 16

1.2.8.1. Duktuli Efferentes 16

1.2.8.2. Duktus Epididimis 16

1.2.8.3. Duktus Deferens 17

1.2.8.4. Duktus Ejakulatoryus 17

1.3. Testisin Histofizyolojisi 18

1.4. Testisin Anatomisi 20

1.5. Kemoterapotikler 22

1.5.1. Sisplatin 23

1.5.2. Etki Mekanizması 24

1.6. Apoptozis 27

1.6.1. Apoptozis'in Başlatılması 27

1.6.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu 28

1.6.3. Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler 28
1.6.4. Fagositoz 29
1.6.5. Apoptozis'in Düzenlenmesi 29
1.6.6. Apoptozun Tespiti: TUNEL Metodu 31
1.6.7. Testiste Apoptozis'in Rolü 32
1. 7. Çinko 33
1.7.1. Çinkonun Tarihçesi 34
1.7.2. Kullanım Alanları 35
1.7.3. Gıda Kaynakları 37
1.7.4. Vücuttaki Görevleri 37
1.7.5. Çinkonun Metabolizması ve Toksisitesi 38
2. GEREÇ VE YÖNTEM 42
2. 1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği 42
2. 2. Deney Hayvanları 42
2.3. Deney Hayvan Grupları 42
2.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü 45
2.5. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) hesaplaması 46
2.6. Histolojik Uygulamalar 46
2.6.1. Nötral Formaldehid Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı 46
2.6.2. Dokuların Alınması 46
2.6.3. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması 46
2.6.4. Kesitlerin alınması ve boyanması 47
2.7. İmmünohistokimyasal Boyama 47
2.8. Apoptoz Tayini 49
2.8.1. TUNEL Yöntemi 49
2.8.2 Apoptotik İndeks 51
2.9. Plazma Testosteron seviyesinin ölçülmesi 51
2.10. İstatistiksel Yöntemler 52
3. BULGULAR 53

3.1. Vücut Ağırlığı Farkı 53
3.2. Testis Ağırlık İndeksi 53
3.3. Işık Mikroskobik Bulgular 54
3.4. Histopatolojik Bulgular 61
3.5. İmmunohistokimyasal Bulgular 61
3.5.1. BAX Boyanmasının Değerlendirilmesi 62
3.5.2. TUNEL Bulguları 66
3.6. Plazma Testosteron Seviyesi 72
4. TARTIŞMA 73
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 84
6.ÖZET 86
7. SUMMARY 88
8. KAYNAKLAR 89
9. EKLER 105
10. ÖZGEÇMİŞ 106

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC : Avidinbiyotin-peroksidaz metodu

ABP : Androjen bağlayıcı protein

AMH : Antimüllerian hormon

CP : Sisplatin

CP+Zn : Sisplatin+çinko

EDS : Dimetan sülfonat

FSH : Follikül uyarıcı hormon

GnRH : Gonadotropin salınım hormonu

Hcg : İnsan koryonik gonadotropin

IgG : İmmünglobülin G

Kg : Kilogram

Kon : Kontrol

LH : Luteinizan hormon

Mg : Miligram

µg : Mikrogram

ml : Mililitre

MIS : Müllerian inhibitör madde

Pt : Platin

SF : İzotonik salin solüsyon

SRY : Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyici yöre

TDF : Testis belirleyen faktör

TUNEL : Terminal-Deoksi Nükleotidil Transferaz Nick End-Labeling

1.GİRİŞ

Vücudun tüm dokularında ortaya çıkabilen çeşitli kanser türleri günümüzde önemini gittikçe arttırmaktadır. Dünya genelinde kanser türleri ile ilgili erken tanı, etiyolojinin ortaya çıkarılması, patogenezin açıklanması ve yeni tedaviler için ilaçların geliştirilmesi üzerine oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Bunun yanında günümüzde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanların etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için de yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Babu ve ark 1995, Seikh-Hamad ve ark 1997).

Sisplatin (CP) yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen organik platin türevi bir ilaçtır. Hücre siklusuna özgü değildir ve DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yapar (Kayaalp 1994). Özellikle testis, over, mesane karsinomaları CP temeline dayanan kemoterapiye duyarlıdır. Buna karşın nefrotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal irritabilite gibi yan etkilerinin yanında azospermi, oligospermi ve infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Kayaalp 1994, Erdemli ve ark 1999). Spermatogenik hücreler kemoterapotik ilaçların zararlı etkilerine çok duyarlıdır. Kök hücre topluluğunda onarılamayan hasara yol açarak kalıcı infertiliteye yol açabilir. En duyarlı hücreler aktif bölünen spermatogonyum ve preleptoten fazına kadar olan spermatositlerdir. CP spermatotoksiktir (Carter ve ark 1993, Meistrich ve ark 1997). CP temelli kemoterapide hastaların çoğu azoospermik olmakta, fakat bunların çoğunda spermatogenez 4 yıl içinde geri dönmektedir (Drasga ve ark 1983, Erol ve Kaan 2000).

Çinkonun testislerde ve aksesuar cinsiyet bezlerinde yüksek konsantrasyonda bulunması üreme fizyolojisinde önemli rolleri olduğunu göstermiştir (Liu ve ark 1997). Antioksidan işlevinin ve vücuttaki çok sayıdaki biyokimyasal süreçlere katılımının yanı sıra bir eser element olan çinko, sperm hücrelerinin yoğunluğunun iyileşmesini, hızlı hareket edebilen spermlerin artmasını ve sperm hücresinin olgunlaşması için önemli olan testosteron düzeyinin yükselmesini sağlamaktadır (Eindhalmer ve Eliasson 1972).

Bu kapsam çerçevesinde araştırma sonuçlarımızın toplum sağlığı açısından önemli olabileceği, literatüre katkı sağlayacağı ve bu konudaki araştırmalara ve farklı yorumlara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

1.1. Testisin Embriyolojisi

Bir canlının gelişimi, üreme hücrelerinin fertilizasyonla oluşturdukları seks kromozomlarının kombinasyonları (XX, XY) ile belirlense de erkek veya dişi gonadlarına ait morfolojik özellikler embriyonal gelişimin belirli bir evresine kadar ayırt edilemezler (Carlson 1996, Gürsoy ve Koptagel 1997, Hassa 2003). Bu sürece; 'farklılaşmamış safha', bu safhadaki gonadlara da: 'farklılaşmamış gonad' adı verilmektedir.

İlkel cinsiyet hücreleri; büyük, yuvarlak, ilkel üreme hücreleri olup; en erken 4. haftanın başında allantoisin çıkış noktasının yakınındaki vitellüs kesesinin endoderm hücreleri arasında görülür. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyonun içinde kalır. Bu olurken, ilkel cinsiyet hücreleri de arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. 6. haftada ilkel cinsiyet hücreleri alttaki mezenkime girer ve primer cinsiyet kordonlarına ulaşır. Burada germ kordanlarını yaparlar ve artık farklılaşmamış evre sona erer (Carlson 1996, Gürsoy ve Koptagel 1997, Sadler 2000, Hassa 2003).

Gonadlar, üç kaynaktan köken alırlar (Taylor ve ark 1999, Hassa 2003):

*Karın arka duvarını döşeyen mezotel (epitel)

*Alttaki mezenkim (bağ dokusu)

*Primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)

Gonadal gelişimin ilk belirtileri mezonefrozun medial bölgesi üzerindeki çölomik epitelin çoğalması ve alttaki mezenkimin yoğunlaşması ile meydana gelir. İnsanda 5. haftada ortaya çıkan bu çoğalma ürünü, 'genital kabartı' olarak bilinir. Parmağa benzer şekilde alt mezenkime doğru inen epiteloid kordonlar henüz yeni gelişen primer seks kordonlarını andırırlar. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe dönüşür, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise dönüşür, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (Kayalı ve ark 1992, Taylor ve ark 1999, Sadler 2000). Seks kromozom kompleksinde sadece Y kromozomu taşıyan embriyolarda, genellikle testisler gelişmektedir. Testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. Testis belirleyen faktör

(Testis determining factor= TDF) geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet-belirleyen yöre'de (Sex-determining Region of the Y kromozom= SRY) yerleşiktir. Bu faktör, farklanmamış gonadın ilkel cinsiyet kordonlarındaki ilkel cinsiyet hücrelerde sentezlendiğinde; taslak gonadlar, testislere farklanırlar. TDF, primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece ağsı görünümlü rete testis oluşur. Seks kordonlarının (seminifer kordonların) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. 12. haftada yoğun tunika albuginea'nın gelişimi, fetüste testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri olan mesorkium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklanırlar (Şeftalioğlu 1998, Hassa 2003).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitallerin erkek yönünde farklanmasını indükte ederler. Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık peryotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilaveten fötal testisler glikoprotein bir hormon olan anti-Müllerian hormon (AMH) veya Müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. AMH, sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salınması püberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (Müllerian) duktusların gelişimini baskılar (Kayalı ve ark 1992, Taylor ve ark 1999, Sadler 2000).

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar. Yani, lümenleri yoktur. Puberteden itibaren lümen gelişir ve seminifer tübülüsleri oluştururlar. Seminifer tübül duvarında 2 tip hücre bulunur: 1) Sertoli hücreleri 2) Spermatogenik seri hücreleri.

Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişirler. Spermatogonyum, primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklanırlar. Sertoli hücreleri, fötal testiste seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir

ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentesleri oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar.

28. haftada testisler arka karın duvarından ayrılarak inguinal halkanın derinliğine doğru yer değiştirirler. Sonuçta, genellikle doğumdan önce skrotuma inmiş olurlar. Erkek ve dişi embriyonların ikisinde de iki çift üreme kanalı vardır. Mezonefrik kanallar (Wolff), erkek üreme sisteminin gelişmesinde önemli rol üstlenirken; paramezonefrik kanallar (Müller) dişi üreme sisteminin gelişmesinde rol oynarlar. 5 ve 6. haftada üreme sistemi farklılaşmamış dönemde iken üreme kanal çiftleri vardır. Mezonefrik kanallar mezonefrik böbreklerden idrarı boşaltırlar ve erkek üreme sisteminin gelişmesinde önemli rol üstlenirler (Carlson 1996, Şeftalioğlu 1998, Claveria ve ark 2000). 8. haftada fetal testiste yapılan testosteronun etkisiyle mezonefrik kanalın proksimal kısmı oldukça kıvrılır ve edidimisi yapar. Kanalın geri kalan kısmı duktus deferensi ve ejakülatuar kanalı yapar. Dişi fetüslerde mezonefrik kanallar daima tamamen kaybolur, sadece birkaç işlevsel olmayan artık kalır. Paramezonefrik kanallar gonadların ve mezonefrik kanalların yanlarında gelişir ve dişi üreme sisteminin gelişiminde önemli rol üstlenirler. Paramezonefrik kanallar mezonefrozların yan taraflarındaki mezotelin longitudinal invajinasyonlarının her yanında meydana gelir. Bu invajinasyonların köşeleri birbirine yaklaşır ve kaynaşarak paramezonefrik kanalları oluşturur. Huni şeklindeki kranyal uçları periton boşluğuna açılır. Paramezonefrik kanallar embriyonun ilerideki pelvis bölgesine ulaşana kadar kaudal olarak mezonefrik kanallara paralel seyreder. Burada mezonefrik kanalları önden çaprazlar, orta hatta birbirlerine yaklaşır ve Y şeklindeki utero vajinal taslağı oluşturmak üzere kaynaşır. Bu tübüler yapı ürogenital sinüsün arka duvarına uzanır ve bir kabartı (sinüs=Müller tüberkülü) yapar. Sertoli hücreleri fetal testiste erkeklik hormonlarını (testosteron gibi) ve MIS denen bir maddeyi yapar. MIS yapımı 6-7. haftalarda başlar.

İnterstisyel hücreler ise testosteron yapımına 8. haftada başlar. Leydig hücreleri germ kordonları arasında kalan mezenkimden farklılaşır ve sayıları 4-6. aylarda en yüksek düzeydedir.

Yapımı hCG ile uyarılan testosteron da mezonefrik kanalları erkek üreme kanallarını oluşturması için uyarır. MIS ise epitelyal mezenkimal dönüşümle paramezonefrik kanalların yok olmasına neden olur.

Mezonefroz dejenere olduğunda bazı mezonefrik tübüller kalır ve duktus efferentese dönüşür. Bu duktuslar mezonefrik kanala açılır. Mezonefrik kanal bu bölgede duktus epididimise dönüşür. Epididimisin distalinde mezonefrik kanal kalın bir düz kas yapısı kazanır ve duktus deferense dönüşür. Her mezonefrik kanalın kaudal ucundan yanlara dışarı doğru büyüyen yapılar seminal vezikülleri oluşturur. Bu bez çifti spermleri besleyen bir salgı yapar. Mezonefrik kanalın vesiküla seminalisin kanalları ile üretra arasında kalan kısmı ejakülatuvar kanalı meydana getirir (Taylor ve ark 1999, Sadler 2000, Hassa 2003).

Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü fötal aydan itibaren skrotuma doğru inişe başlarlar. Hutson hipotezine göre testisin inişinin iki evresi vardır: İlki; transabdominal evredir. Bu evre androjenden bağımsızdır ve iniş anti Müllerian hormon etkisiyle olur. Testis karın arka duvarı boyunca inişe geçer; gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır. İkincisi; inguinoskrotal evre olarak adlandırılır. Testis bu dönemde inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçerek skrotuma iner. Testis gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır (Petorak 1986, Rozanski ve Bloom 1995).

Androjenler, gubernakulum, epididim, epidermal büyüme faktörü, desendin, kalsitonin genle ilişkili peptid (CGRP), genitofemoral sinir ve karın içi basıncının inguinoskrotal inişte rol oynadığı ileri sürülmektedir (Abe ve Hutson 1994, Tanyel 2000).

1.2. Testisin Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alan bir çift organdır. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3ºC derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34-35ºC gereklidir. Olgun testisin posterior yüzü epididimis ile ilişkilidir. Hem testis hemde epididimis skrotal kese içerisinde vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır.

Testisler rete testisin bulunduğu yerde kalınlaşarak mediastinumu oluşturan tunika albugina ile çevrelenir. Mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz

septumlar dokuyu 250-300 lobçuğa böler. Herbir lobçuk 1-4 seminifer tübülü içerir. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapta ve 80 cm uzunluktadır; iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır. Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümenden oluşur (Kazos ve ark 2007).

Testiküler kapsül 3 tabakadan meydana gelmiştir (Fawcett 1966).

1. Tunika vaginalis: mezotelyal hücrelerin oluşturduğu en dıştaki tabakadır. Peritondan köken alan bu seröz kesenin visseral tabakası testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyip yüzeyde skrotum üzerine uzanarak parietal tabakayı oluşturur.

2. Tunika albuginea: Düz kas hücreleri içeren yoğun fibroelastik bağ dokusundan meydana gelmiştir ve en belirgin tabakadır. Bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılmıştır. Tunika albuginea testisin posterior yüzeyinde kalınlaşır ve mediastinum testis olarak organ içerisine sokulur.

3. Tunika vasküloza: Areolar bağ dokusu ve içerisinde yer alan kan damarları ağından oluşan, kapsülün en iç tabakasıdır.

Tunika albugineanın testisin posteriorunda kalınlaşmasıyla oluşan mediastinum testisten kapsüle doğru uzanan fibröz septumlar testisin iç kısmını 250-300 lobüle böler. Her bir lobül, gevşek bağ dokusu tabiatındaki stroma içerisine gömülü olan ve sayıları 1-4 arasında değişen seminifer tübülleri içerir. Seminifer tübüller yaklaşık 0,2mm çapta, 20-80cm uzunlukta oldukça kıvrıntılı kanalcıklardır. Seminifer tübüller anastomoz gösteren kıvrıntılar şeklinde başlar, mediastinuma doğru birbirlerine yaklaşarak kısa boşaltma kanalı olan tubuli seminiferi rektiyi yaparlar. Seminifer tübül çok sıralı olan germinal ya da seminifer epitel ile döşelidir. Epitel ince bir bazal lamina üzerine oturmuştur ve dıştan özelleşmiş fibröz doku ile sarılıdır. Seminifer tübülleri çevreleyen fibröz dokuya peritübüler doku ya da membrana propria denir. Membrana propria, seminifer tübüllere desteklik yapar ve tübül hücrelerini dış etkenlerden korur (Fawcett 1966).

Seminifer tübül fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaşmış miyoid hücreler

içerir. Seminifer epitelde iki tip hücre vardır. Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan hücreler. Spermatogenik seri hücreler 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermatazoonları üretmektir. Spermatazoon üretimi, 'spermatogenez' olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (Junqueira ve Carneiro 2006).

1.2.1. Seminifer Tübüller

Testisin herbir lobülü birbirleri arasında ilişkileri olan 1-4 kadar seminifer tübül içerir. Bunlar, dışta miyoid hücreleri de içeren bağ dokunun çevrelediği, belirgin bir bazal membran ile interstisyumdan ayrılırlar. Seminifer tübüller yaklaşık 30-70 cm uzunlukta olup Sertoli hücreleri ile germ hücrelerini içerirler. Erişkin testisindeki Sertoli hücreleri, bölünme yeteneği olmayan, seminifer tübülün bazal kısmından lümene doğru uzanan destek hücreleridir. Seminifer tübüllerin hücresel yapısının %10-15'ini oluştururlar. Çekirdekleri düzensiz şekilli ve oldukça büklümlüdür. Sertoli hücreleri, belirgin çekirdekleri ile germ hücre elemanlarından ayrılır. Puberte çağında Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri oluşur. Kan testis bariyerini oluşturan bu kompleksler, kandan gelen maddelerin lümen içerisine geçişini önler. Fagositoz kapasiteleri dışında bu hücreler; spermatogenezin düzenlenmesinde rol alan androjen bağlayıcı protein, transferrin, büyüme hormonu, seruloplazmin ve inhibin gibi pek çok maddenin sentezini de yaparlar (Kayalı ve ark 1992).

Erkek germ hücreleri, insanda olgunlaşmasını yaklaşık 64 günde tamamlayan ve çoğalabilen hücrelerdir. Bazal membrana oturan spermatogonyumların bir kısmı (spermatogonyum A) kök hücreleri oluştururken, bir kısmı da (spermatogonyum B) mitoz ile bölünerek lümene doğru göç ederler ve primer spermatositlere dönüşürler. Bunlar mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri oluştururlar. Sekonder spermatositler ikinci bir mayoz bölünme daha geçirerek haploid spermatidlere dönüşürler. Haploid spermatidler ise olgunlaşarak, spermatozoonları oluştururlar (Sadler 1996).

1.2.2. Sertoli Hücreleri (Sustentaküler Hücreler = Destek Hücreleri)

Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri desteklemektedirler. Seminifer epitelin bazal laminasına dayanır ve buradan tubulus lumenine doğru uzanırlar. Sertoli hücresi ökromatik iri bir nükleus içerir (Johnson 1991). Bol miktarda granülsüz endoplazma retikulumu (GER), iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda lizozozom ve özellikle bazalde daha bol bulunan yassı mitokondriyomlar içerir. Bunların yanında glikojen, lipit damlacıkları ve albumin kristalleri gibi çeşitli sitoplazma inklüzyonlarına da sahiptir (Johnson 1991, Tanyolaç 1999).

Sertoli hücreleri spermatogenezis'te önemli görevlere sahiptir (Johnson 1991). Bunlar; spermatogenezisi düzenlemek ve kontrol etmek (Dalgaard ve ark 2002), gelişme aşamasındaki eşey hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek, dejenere olan eşey hücrelerini ve gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçacıklarını fagosite etmek, spermatozoon transportuna yarayan bir sekresyon yapmak (Johnson 1991, Tanyolaç 1999) olarak sayılabilir. Follikül uyarıcı hormon (Follicle Stimulating Hormone-FSH) ve testosteron, Sertoli hücrelerini uyararak bu hücrelerin androjen bağlayıcı protein (Androgen Binding Protein/ ABP) sentezlemesini sağlar. ABP'nin, seminifer epitelde testosteron ile oluşturduğu kompleks, spermatogonyumları etkileyerek çoğalma sürecini başlatır (Johnson 1991, Hassa ve Aştı 1997). Yüksek testosteron konsantrasyonları spermatogenik siklusu desteklemek için gereklidir (Johnson 1991). Sertoli hücreleri aynı zamanda inhibin hormonu da salgılarlar. İnhibin, adenohipofizden FSH üretimini inhibe eder (Johnson 1991, Krinke 2000). Bunu ya direkt olarak adenohipofiz'den gonadotropin hormon üretimini etkileyerek ya da hipotalamustan gonadotropin salınım hormonu (Gonadotropin Releasing Hormone/ GnRH) sekresyonunu etkileyerek gerçekleştirir (Johnson 1991). Sertoli hücreleri, potasyumdan zengin bol miktarda intrasellüler sıvı da salgılarlar. Bu özel sıvı yardımıyla spermatozoonlar, iyice gömülü oldukları Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma invaginasyonlarından kurtularak ileriye doğru sevk edilirler (Tanyolaç 1999). Sertoli hücreleri az miktarda östrojen hormonu da salgılamaktadırlar. Yetişkinlerde spermatid sayıları kısmi olarak perinatal gelişim boyunca üretilen Sertoli hücre sayılarına bağlıdır. Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodu tamamlandıktan sonra yaşam boyunca sayılarının sabit kaldığı varsayılır. Sertoli hücrelerinin spermatid sayısını sabitleyici bir özelliği vardır, bu hücrelerin

sayısı spermatogenezis ve günlük sperm üretimi için önemlidir (Dalgaard ve ark 2002).

Sertoli hücre proliferasyonu erkek çocuklarda perinatal olarak meydana gelir. Daha sonraki proliferasyon ve olgun hücrelere farklılaşma puberte döneminde tekrar başlar (Dalgaard ve ark 2002). Ratta Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodu gebeliğin 17-19. günlerinden başlar ve postnatal 15-20. günlere kadar devam eder (Orth 1982).

1.2.3. Spermatogenik Hücreler

4 - 8 hücre tabakası halinde düzenlenerek seminifer tübülde çok katlı epitel oluştururlar. Bazalden lümene doğru hücre tipleri :

1. Spermatogonyumlar

a) Tip A koyu spermatogonyumlar

b) Tip A açık spermatogonyumlar

c) Tip B spermatogonyumlar

2. Spermatositler

a) Primer spermatosit

b) Sekonder spermatosit

3. Spermatidler

a) Golgi fazı

b) Akrozomal faz

c) Maturasyon fazı

4. Spermatozoon'lardır (Leeson ve Leeson1981).

1.2.4. Spermatogenezis

Spermatogonyum'dan olgun eşey hücrelerinin (spermatozoon-spermiyum-spermatosit) oluşması spermatogenezis olarak tanımlanır (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). Bu olayda; çoğalma (goniogenezis), büyüme,

olgunlaşma (spermatositogenezis) ve başkalaşım (spermiyogenezis) evreleri görülür (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997). Ratlarda, doğumdan sonraki yaklaşık 50 gün olan puberte öncesinde erkek gonositler inaktif olarak durur. Pubertede bölünmeye başlar ve spermatogonyumlar oluşturulur (Krinke 2000). Spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle sayıca artarlar (Hassa ve Aştı 1997). Spermatogonyumlar, hayvan spermatozoa üretme yeteneğini kaybedinceye kadar bölünmeye devam ederler (Krinke 2000).

Spermatogonyumlar tip A ve tip B olmak üzere kabaca 2 tip halinde sınıflandırılırlar. Tip A spermatogonyum, A0 tip, A1 ve A4 tiplerine tekrar ayrılır. Tip A0 spermatogonyum seminifer tübülün membranında kalır ve iki kardeş hücreye bölünme yeteneğine sahiptir. Tip A1 spermatogenezis sürecine devam ederken, diğer hücre de kök hücre olarak kalır. Ratlarda A1 tip spermatogonyum 6 mitotik bölünme geçirir ve büyüme evresine girerek primer spermatosit olur. Primer spermatositler mayoz bölünmenin I. evresine girer. Hücreler bu dönem boyunca sertoli hücresinin adluminal komponentinde sekonder spermatosit olur (Krinke 2000). Sekonder spermatositlerden de II. mayoz bölünme sonucu, haploid kromozom içeren spermatidler şekillenir (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997). Spermiyogenezis aşamasında, spermatidler çekirdek ve sitoplazmalarında görülen bir seri değişiklikler sonucu, o türe özgü biçimlerini kazanarak, spermatozoonlara dönüşürler (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997).

1.2.5. Spermiyogenezis

Spermiogenezis aşamasında spermatidler akrozom gelişimi için akrozomal faza girer. Daha sonra çekirdek yoğunlaşması ve uzaması meydana gelir, bunu sitoplazmik eliminasyon ve salınma takip ederek olgun spermatozoon oluşumu tamamlanır (Krinke 2000). Olgunlaşmanın ilk aşamasında Golgi kompleksi içinde birçok küçük granül belirir. Bu granüller (proakrozom granülleri) toplanarak akrozom keseciğini oluştururlar. Akrozom keseciği, spermatid çekirdeğinin ön kutbuna gider ve çekirdek zarına yapışır. Akrozom keseciği, çekirdek dış zarına yapıştığı yerde yayılır ve çekirdeğin ön yüzünü tümüyle kaplayan bir başlık oluşturur. Kesecik içinde yerleşik olan proakrozom granülleri de başlık içinde yayılır ve ikisi birlikte akrozomu meydana getirirler. Çekirdek bu dönemde uzar ve hücre

içinde eksentrik olarak yerleşir. Daha sonra baş kısmı tubulusun periferine doğru yönlenirken kuyruk kısmı da lumene doğru oluşmaya başlar. Kuyruk gelişimi tamamlandıktan sonra sitoplazma yavaş yavaş çekirdeğin biçimini alarak uzar. Sitoplazmanın büyük bir kısmı parçalanıp ayrıldıktan sonra hücreler lümen içinde serbest kalır ve spermatozoonlara dönüşürler (Dellmann ve Brown 1987).

1.2.6. Spermatogenezisin Kontrolü

Spermatogenezis puberte öncesi gonadotropin sekresyonunun artışıyla puberte zamanında başlar (Krinke 2000). Spermatogenezis'te testosteron ile FSH, Luteinizan Hormon (LH) ve ABP'lerin rolü vardır (Hassa ve Aştı 1997). Peptid hormonlar (FSH ve LH) kan-testis bariyerini geçerek spermatosit ve spermatidlere direkt olarak ulaşamadığı için spermatogeneziste FSH etkisi muhtemelen Sertoli hücreleriyle gerçekleşir. Kan-testis bariyeri ratlarda post partum 16-19. günlerde oluşur (Krinke 2000). FSH spermatogenezisin başlaması ve seminifer tubullerin uyarılması için gerekli bir hormondur (Krinke 2000). Hipofiz ön lobundan salgılanan FSH tubulus seminiferus kontortuslardaki Sertoli hücrelerini etkileyerek bu hücrelerden ABP'nin üretilmesini uyarır (Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). LH, intersitisyumdaki Leydig hücrelerinde androjenik etki oluşturmasından dolayı erkeklerde interstitial hücre uyarıcı hormon (ICSH) olarak adlandırılır (Krinke 2000). Cinsel olgunluğa ulaşıldığında, hipofiz ön lobundan salgılanan LH testisin intersitisyel dokusunda bulunan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteronun salgılanmasına neden olur (Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). Peptid hormonlarının tersine steroid yapıda olan testosteron difüzyonla kan-testis bariyerini kolaylıkla geçebilir.

Yetişkin ratlarda intersitisyel sıvıda bulunan testosteron seviyesinin (>50 ng/ml), testiküler sıvı (~30 ng/ml) veya dolaşımdakinden (<10 ng/ml) daha yüksek olması testosteronun spermatogeneziste parakrin ve otokrin bir etki gösterdiğini işaret eder (Krinke 2000). Testosteron düzeyindeki yükselme, LH'nın salgılanmasını inhibe eder. Böylece testosteron miktarı belirli bir düzeyde tutulur (Hassa ve Aştı 1997). Plazma testosteron konsantrasyonları sağlıklı erkek ratlarda yaklaşık 2-3 ng/ml'dir (Krinke 2000). Tubulus seminiferus kontortuslara gelen testosteronun ABP ile oluşturduğu kompleks, spermatogoniumları etkileyerek çoğalma sürecini başlatır

(Hassa ve Aştı 1997). FSH spermatogenezisin başlatılması, LH ve testosteron hormonu ise sürekliliği için gereklidir (Hassa ve Aştı 1997).

Sertoli hücreleri, ABP'nin dışında, inhibin hormonu ile az miktarda da östrojen hormonu salgılarlar. İnhibin, hipofiz ön lobundan FSH hormonunun salgılanmasını önler (Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). Östrojen hormonu da Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun, sertoli hücrelerinde östrojene çevrilmesiyle elde edilir (Hassa ve Aştı 1997).

1.2.7. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri

Testis dokusunun %25-30'unu oluşturur. Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testisler de seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarıyla doldurulmuştur. Bağ dokusu çeşitli tipte hücre içerir, bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte işlevsel olarak belirgin hale gelen Leydig hücreleri interstisyel dokuda bulunur. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gerçekleşmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (Junqueira ve Carneiro 2006).

Testisin mezenşimal stromasından köken alan bu hücreler, hem yuvarlak hem de poligonal olabilen merkezi yerleşimli belirgin bir çekirdeğe sahiplerdir (Fawcett 1966). Çekirdekte kaba kromatin granülleri görülür. Leydig hücrelerinin çekirdeğinde belirgin bir çekirdekçik bulunur. İki çekirdeğe sahip Leydig hücreleri de yaygın olarak görülmektedir. Işık mikroskobide vakuollü görünüme sahip olan sitoplazma, lipid damlacıkları yönünden zengindir (Kaya ve ark 2006). Sitoplazmada ayrıca protein tabiatında çubuk şekilli kristalloidler de görülebilir. Bu kristalloidlere Reinke kristalleri denmektedir (Leeson ve Leeson 1981).

Leydig hücrelerinde LH reseptörü bulunmaktadır (Teerds ve ark 1999). LH, leydig hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için temel faktördür (Ge ve ark 2005). LH leydig hücre proliferasyonunu, direkt olarak veya indirekt olarak büyümeyi destekleyen faktörlerin üretimini düzenleyerek uyarır. Yetişkin rat testislerinde ise leydig hücre proliferasyonu az miktardadır (Teerds ve ark 1999). Leydig hücreleri androjenler olarak adlandırılan erkek seks steroidlerinin (testosterone, androstenedione ve dehydroepiandrosterone) sentez ve sekresyonunu

sağlar (Nozu ve ark 1981, Johnson 1991). Androjenler Leydig hücrelerine yakın olan kapiller delikçiklerinden sistemik dolaşıma katılır. Testosteron sistemik dolaşıma girer girmez vücuttaki hedef organları etkiler (Johnson 1991). Üretilen testosteronun bir kısmı ise interstisyel sıvı içerisine verilir ve spermatogeneziste parakrin ve otokrin bir etki gösterir (Krinke 2000, Ge ve ark 2005). Puberte ile birlikte Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteronun (Dellmann ve Brown 1987, Johnson 1991, Krinke 2000) ana fonksiyonları arasında seksüel isteğin (libido) belirmesi, eklenik genital bezlerin fonksiyonunun sürdürülmesi, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, spermatogenezisin kontrolü, hipofiz ve hipotalamusta negatif geri tepki, genel anabolik etkiler sayılabilir (Dellmann ve Brown 1987, Johnson 1991, Hassa ve Aştı 1997).

Dolaşımdaki testosteron seviyeleri, Leydig hücrelerinin hem steroidojenik kapasitesi hem de testisteki total sayıları ile ilişkilidir (Ge ve ark 2005). Leydig hücrelerinin testosteron üretimi ilerleyen yaş ile birlikte azalır. Bu mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Olası nedenleri; Leydig hücre sayısında azalma, düşük LH uyarımı, leydig hücrelerinin testosteron üretme yeteneğinin azalması ve önemli germ hücre kayıplarıdır (Chen ve ark 1994).

Ratlarda Leydig hücre gelişimi postnatal 10. günde başlar. Bu hücre gelişiminde beş hücre tipi bulunur; bunlar:

a) Mezenşimal prekürsör hücreler (Mesenchymal Precursor Cells)

b) Progenitör hücreler (Progenitor Leydig Cells/ PLC)

c) Yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri (Newly Formed Adult Leydig Cells/ NFALC)

d) Genç erişkin Leydig hücreleri (Immature Adult Leydig Cells/ IALC)

e) Olgun erişkin Leydig hücreleri (Mature Adult Leydig Cells/ MALC)'dir.

Mezenşimal prekürsör hücrelerin progenitör hücrelere farklılaşmasının başlaması LH'dan bağımsızdır. Bundan sonraki gelişme dönemlerinde LH, progenitör hücrelerin proliferasyonu ve bu hücrelerin sırasıyla yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri, genç erişkin Leydig hücreleri ve olgun erişkin leydig hücrelerine farklılaşmasını ve farklılaşmayı takiben Leydig hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. Mezenşimal prekürsör hücre farklılaşması ile Leydig

hücrelerinde mitoz aynı zamanda meydana gelir. Gelişim boyunca mezenşimal ve Leydig hücre sayıları doğrusal olarak 1:2 oranında artar. Gelişimini tamamlamış Leydig hücrelerinin boyutu önemli derecede artmıştır. Steroid üretimi için gerekli tüm organelleri kazandığı için hücrelerin testosteron salgılama kapasitesi artar. Bu süreçte Leydig hücreleri fazla sayıda LH reseptörüne sahip olmuştur. Dolayısıyla Leydig hücresinin LH uyarımına karşı duyarlılığı artmıştır (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Hardly ve ark (1989) postnatal rat testisinde Leydig hücrelerinin farklılaşmasında iki farklı fazın olduğunu ileri sürmüşlerdir. İlk faz mezenşimal preküsör hücrelerin progenitör Leydig hücrelerine dönüştüğü postnatal 14. ve 28. günler arasındadır. İkinci faz ise 28. günde başlar ve Leydig hücre sayısı mitoz ile artar.

Yapılan başka bir çalışmada ise (Ge ve ark 2005), Leydig hücrelerinin postnatal gelişimi üç ayrı döneme ayrılmıştır. İlk olarak 14-21 günlük testislerde progenitör hücreler bulunur. Sonrasında 35. güne kadar hücreler steroidojenik organel yapısı ve enzim aktivitesi kazanarak genç Leydig hücrelerine (Immature Leydig Cells/ ILC) dönüşür. Fakat bu hücrelerin ürettikleri testosteronun çoğu metabolize olmaktadır. Son olarak bu dönemden sonra 90 günlük yaşa kadar erişkin Leydig hücreleri (Adult Leydig Cells/ ALC) oluşur. Oluşan bu hücreler aktif olarak testosteron üretir.

Leydig hücre gelişimi, insan ve diğer memeli türleri için de ratlarda tanımlandığı şekle benzerdir. Ratlarda progenitör Leydig hücreleri gelişim sırasında ilk tanımlanan oldukça yüksek proliferatif hücrelerdir. Birkaç steroidojenik enzim barındıran AGER içerir. Bundan sonraki gelişim ile ILC oluşur. Çoğunlukla postpartum 28-56. günlerde görülür. ILC, PLC'e göre daha fazla AGER'a sahiptir ve ilaveten yüksek bir steroidojenik kapasiteyi destekleyen sitoplazmik yağ damlacıkları (3 alfa-androstanediol, 5 alfa-androstanediol) içerir (Ge ve Hardly 1998). Bu hücreler ratlarda 20-40 günlük yaşlarda 3 alfa-androstanediol ve 5 alfa-androstanedioltestosteron metaboliti- üretmektedir (Chase ve Payne 1983). ILC, 56. günde ALC'e dönüşmeden önce son kez bölünmeye uğrar. ALC iri hücrelerdir ve çok miktarda AGER ile az miktarda yağ damlacığı içerir. Yüksek steroidojenik enzim aktivitesine sahiptir ve predominant olarak testosteron salgılarlar (Hardly ve ark 1989). Prepubertal rat testisinde progenitör Leydig hücreleri yaklaşık olarak

doğum sonrası ikinci haftada belirlenmiştir (Handagama ve Ariyaratne 2001). LH dışında bazı hormonlar ve kimyasal faktörler de leydig hücre gelişimine etki etmektedirler. Testosteron ve östrojen, prekürsör hücre farklılaşmasının başlamasını inhibe eder. Progenitör hücre oluşturulduktan sonra androjenler progenitör hücrelerin olgun erişkin tip Leydig hücrelerine farklılaşması için gereklidir (Handagama ve Ariyaratne 2001). Bir grup araştırıcı (Purvis ve ark 1979, Molenaar ve ark 1986, Teeders ve ark 1989) FSH'nun bu süreçte gerekli olmadığını ileri sürmüşlerdir. İnsülin benzeri büyüme faktörü I (Insulin-like growth factor I/IGF-I), IALC proliferasyonunun indüklenmesinde ve genç erişkin Leydig hücrelerinin olgun erişkin leydig hücrelerine farklılaşmasında görevlidir. Transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor / TGF) mezenşimal prekürsör hücreler için mitojendir. Hem TGF hem de transforme edici büyüme faktörü ß (Transforming growth factor ß/ TGFß)-TGF 'den daha az-, LH veya insan koryonik gonadotropini (human chorionic gonadotropin-hCG) varlığında Leydig hücrelerinde mitozu uyarır (Teerds ve ark 1999, Handagama ve Ariyaratne 2001).

Makrofajlar Leydig hücre gelişiminde önemli rol oynarlar. Leydig hücreleri makrofajdan yoksun testiste gelişimlerini tamamlayamazlar. Makrofajlar yangı durumunda ürettikleri interlökin 1 (interleukin-1/ IL-1) ve tümör nekroz faktörü (tumör necrosis factor/ TNF) ile Leydig hücre fonksiyonlarını inhibe ederler (Hales 2002).

Tiroid hormonu mezenşimal prekürsörlerin proliferasyonuna, mezenşimal prekürsör hücrelerin progenitör Leydig hücrelere farklılaşmasına, mezenşimal hücrelerin progenitör Leydig hücrelerine farklılaşmasının hızlanmasına ve neonatal dönemde yeni şekillenmiş Leydig hücrelerinin proliferasyonunun artmasına neden olur (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Postnatal testiste Leydig hücre sayılarında prepubertal ve pubertal artışlar ortalama iki mekanizmayla açıklanır. İlki; kısa bir zaman sürecinde mezenşimal prekürsör hücrelerin Leydig hücrelerine farklılaşması, ikincisi ise; yeni oluşan Leydig hücrelerinin mitotik bölünmeleridir (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Ratlarda doğumdan sonraki 90 günlük süreye kadar testis interstisyumunda bir mezenşimal hücre artıştı olduğu görüldü (Handagama ve Ariyaratne 2001). Deneysel olarak ethan dimetan sülfonat (Ethane Dimethane Sulphonate/ EDS)

uygulaması yetişkin rat testislerinde hem mezenşimal hem de Leydig hücre sayısını artırmıştır (Teerds ve ark 1999, Handagama ve Ariyaratne 2001). Bazı araştırıcılar da (Russel ve ark 1995, Teeders ve ark 1998, Ariyaratne ve ark 2000a,b) progenitör hücrelerin proliferasyonunu ve prepubertal rat testisinde progenitör hücrelerin farklılaşarak yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücrelerine dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. Rat testisinde hem Leydig hem de mezenşimal hücre sayıları doğumdan seksüel olgunluğa kadar artar (Ariyaratne ve Handagama 2000).

Hardly ve ark (1989), 28. gündeki mezenşimal hücre sayılarını 56. gün ile karşılaştırdıklarında %50'ye varan bir azalma tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Leydig hücreleri, insülin benzeri faktör 3 (Insl3) ya da leydig- insülin benzeri peptid (Ley-IL) olarak da bilinen relaksin benzeri faktör (RLF)'ü salgılarlar (Ivell 1997, Bamberger ve ark 1999, Adham ve ark 2000, Klonisch ve ark 2001, Ivell ve Bathgate 2002, Kumagai ve ark 2002).

1.2.8. Erkek Genital Yolları Histolojisi

1.2.8.1. Duktuli Efferentes

Rete testisi, epididimise bağlayan kanallardır. Rete testis, epididimisin başına, sayıları yaklaşık 12 adet olan kıvrımlı seyreden duktuli efferenteslerle açılır. Kanalları döşeyen yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden oluşur. Hücre boyları eşit olmadığından dolayı, epitel yüzeyi girintili çıkıntılı görünür. Uzun boylu prizmatik hücreler genellikle silyuludur. Kısa boylu hücreler ise silyum içermez. Bu hücreler çok sayıda mikrovillus, pinositoz vezikülü, membranla sınırlı cisimcikler içeren, endositoz yapan hücrelerdir. Seminifer tubüllerden salgılanan sıvının büyük bir bölümü duktuli efferentesin bu hücreleri tarafından rezorbe edilir. Epitelde lenfositlere de rastlanabilir. Elastik lif içeren ince bir sirküler kas tabakası kanalı çepeçevre kuşatır. Spermin bu kanallar boyunca ilerlemesi silyaların hareketi ve kas tabakası sayesinde gerçekleşir.

1.2.8.2. Duktus Epididimis

Testisin arka yüzü boyunca uzanan, son derece kıvrımlı uzun bir kanaldır. Baş, gövde ve kuyruk olamak üzere 3 bölümden oluşur. Kanalı kan damarlarından,

düz kas hücrelerinden zengin sıkı bir bağ dokusu sarar. Yalancı çok katlı sterosilyalı prizmatik epiteli, bazal hücreler ve prizmatik hücrelerden (esas hücreler) oluşur. Epitel içinde lenfositlere rastlanabilir. Epididimisin baş ve gövdesinin büyük bölümünde bağ dokusu dışında sirküler seyirli düz kaslardan oluşan ince bir tabaka daha yer alır. Kuyrukta bu tabakanın iç ve dış bölümünde longitudinal seyirli iki kas tabakası daha eklenir. Spermatozoa duktus epididimisten geçerken hareket ve döllenme yeteneği kazanır. Duktuli efferentes'de absorbe edilmemiş olan sıvı burada absorbe edilir. Epitel hücreleri sertoli hücreleri tarafından ortadan kaldırılmamış olan artık cisimleri ve dejenere olan spermleri fagosite ederek ortadan kaldırırlar. Esas hücreler sperm olgunlaşmasını sağlayan siyalik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgılarlar.

1.2.8.3. Duktus Deferens

Epididimisin kuyruğunun devamı olan, kalın duvarlı musküler bir borudur. Epididimise benzer şekilde, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epitel hücrelerinin çoğunun yüzeyinde sterosilyumlara rastlanır. Epitel altında elastik liflerden zengin lamina propria yer alır. Mukoza lümene doğru katlantılar yaptığından lümen düzensiz görülür. Musküler tabaka, içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyreden kas liflerinden oluşan kalın bir tabakadır. Duktus deferens spermatik kordonun bir parçasını oluşturur. Kanal, prostata girmeden önce genişleyerek ampullayı yapar. Ampullanın son kısmında seminal veziküller kanala katılır. Bundan sonra duktus deferens prostata girer ve üretraya açılır. Prostata giren segmente ejekülator duktus denir.

1.2.8.4. Duktus Ejakulatoryus

Basit prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Duvarında kas tabakası bulunmaz. Epiteli fibröz bağ dokusu tabakası sarar (Eşrefoğlu 2004).

1.3. Testisin Histofizyolojisi

Testis ekzokrin ve endokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bir bezdir (Arıncı ve Elhan 1999, Yıldırım 1999). Testisin iç salgılama işlevini Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron meydana getirir. Testosteron yüksek lokal etkiyle seminifer tübüllerdeki spermatogenezi etkilerken, kana geçerek erkek üreme sistemine yardımcı bezlerin (prostat, vesikula seminalisler, bulboüretral bezler) işlevini de etkiler. Erkeğe özgü ikincil cinsiyet özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, müsküler vücut şekli) ortaya çıkmasından sorumludur. Testosteron üretimi adenohipofizden salgılanan LH etkisiyle gerçekleşir. LH, Leydig hücrelerinde kendisine ait reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Her ne kadar Leydig hücreleri testisin genel hacminde küçük bir yer tutsa da steroidojenik potansiyelleri çok yüksektir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değil esas olarak geceleri 90 dakikalık aralıklar şeklinde olur. LH dışında prolaktin ve LH releasing hormon'da (LH-RH) doğrudan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasını etkiler. Testosteronun yükselmesi LH salgılanmasını durdurur. LH dışında spermatogenezin başlaması ve devam etmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon FSH'da etkilidir. FSH, sertoli hücrelerini etkileyerek ABP salgılanmasını sağlar böylece spermatogenez için gerekli oranda testosteronun yerel etkisi sağlanır. Bu etki spermatogenezin başlaması için gereklidir. Germ hücrelerinin azalması FSH salgısını uyarır. FSH salgılanması sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonuyla durdurulur.

Testisin dış salgı işlevi, kıvrıntılı seminifer tübüllerin aktif halokrin salgı ürünü spermatozoonu salgılamaktır (Hassa 2003). İnsanda iki testisten günlük ortalama spermatozoon yapımı ortalama 200 milyondur. Bu büyük bir miktar gibi görünse de diğer türlerle karşılaştırıldığında düşük bir sayıdır. İnsanda her iki testis 800-1200 adet kıvrıntılı tohum borucuğu içerir. Bunların her biri 30-70 cm. uzunluğundadır. Oluşan ejakulat miktarı ise 2-5 ml. dir. Bu ejakulat 40-100 milyon/ml spermatozoon içerir. Bu sayı 20 milyonun altına düşerse kısırlıktan (infertilite) söz edilir. 37ºC olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı 35ºC'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir (Friberg 1984, Yıldırım 1999). Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki

terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki kramester kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.

Testisin inişindeki bozukluk olan kriptorşidizmde (Yun:kryptos, gizli+orchis, testis), testisler 37ºC'ta kalır ve spermatogenez inhibe olur. Çok ileri olmayan vakalarda testisler cerrahi olarak skrotuma indirildikleri takdirde spermatogenez normal olarak devam edebilir. Karın içi sıcaklığında kalan testislerde germ hücrelerinin çoğalması inhibe olur, fakat testosteron sentezi devam eder. Bu da kriptorşidizmli seks karakterlerinin gelişmesinin ve ereksiyon oluşmasının nedenini açıklar.

Kötü beslenme, alkolizm ve bazı ilaçların etkisi ile spermatogonyumlarda değişiklikler ve sonuçta spermatozoon yapımında bir azalma ortaya çıkar. X-ışını ve kadmiyum tuzları spermatogenik seri hücrelerine oldukça toksiktirler ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak hayvanda steriliteye yol açarlar (Arıncı ve Elhan 1999, Yıldırım 1999). Bisülfan germinal hücreler üzerinde etkilidir, gebe sıçanlara verildiğinde bunların erkek yavrularının germinal hücrelerini öldürür. Bu nedenle yavru steril kalır ve seminifer tübülleri sadece Sertoli hücrelerini içerir. Androjen-üreten interstisyel hücre tümörleri erkeklerde erken puberteye yol açabilir. Bununla birlikte spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi hiç şüphesiz endokrin faktörler oluşturur (Yıldırım 1999, Hassa 2003).

Spermatogenez, hipofizin FSH ve LH'ın testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'un Sertoli hücrelerine etkiyerek adenital siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta siklik adenozin monofosfat'ın (cAMP) artışına yol açtığı ve aynı zamanda da ABP sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır ve östrojenler ve progestojenlerle inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir.

Spermatogenik hücrelerin farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle, farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immun yanıtı teşvik edebilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immun sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldıracaktır. Bu bariyer seminifer tübüllere immunglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilite bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir otoimmun reaksiyonda korumuş olur.

İnsanda ergenlikle başlayan spermatogenez devamlıdır ve ölenceye kadar azalarak da olsa devam eder (Arıncı ve Elhan 1999, Hassa 2003). Germ hücre epiteli toksik ajanlar, alkol, çeşitli enfeksiyon hastalıkları ve beslenme yetersizliklerine (vitamin A ve E eksikliği) hassastır. Düşük dozlarda bile X-ışınları dejenere hücre sayısını arttırır, yüksek dozlarda kısırlığa neden olur. Germ hücreleri yüksek ısıdan da etkilenir. Bu nedenle testisin skrotum içinde ve vücut dışında yer alması gerekir. Testisin skrotuma inmediği hallerde (kriptorkidizim) seminifer borucuklar atrofik kalır sadece Sertoli hücreleri, çok az miktarda da spermatogoniyum izlenir (Fawcett 1994).

1.4. Testisin Anatomisi

Erişkin bir erkeğin her bir testisi 4x3.5x3 cm boyutlarındadır. Testisler ovoid şekilli gonadlardır. Her birinin hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3 bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. “Mediastinum testis” olarak isimlendirilen kranioposterior kısmından, seminal taşıyıcılar çıkar (Snell 1986).

Testis, tunika albuginea adı verilen kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu tabaka; fibroblastlar ve kollajenden yoğun bir yapıdadır. Tunika albuginea’nın altında nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, tunika vaskulosa adı verilen damarsal bir tabaka yer alır. Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Herbir lobülün

içinde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise rete testis diye isimlendirilen kanal ağına açılırlar. Tunika albuginea'nın üzerinde peritonun uzantısı olan tunika vaginalis yer almaktadır. Tunika vaginalis iki yapraklıdır. Anteriorda, testise yakın olan ve epididimi çevreleyen kısmına viseral tabaka, daha dışta yer alan kısmına ise paryetal tabaka adı verilir. Bunların da dışında sırasıyla, "fascia spermatica interna, musculus cremaster, fascia spermatica externa", tunika dartos ve cilt yer alır (Kuran 1983).

Spermatik kordon; duktus deferens, duktus deferensin arter ve veni, testiküler arter, "plexus pampiniformis, plexus deferentialis, processus vaginalis peritonei, musculus cremaster, arteria cremasterica, vena cremasterica", lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral sinirin genital dallarından oluşur. Tüm bu oluşumlar birbirine gevşek bir bağ dokusuyla bağlanmış ve dıştan kas lifleri ile "fascia spermatica externa, fascia cremasterica, fascia spermatica interna" adı verilen zarlarla sarılmıştır (Kuran 1983).

Testisin ana damarı aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin yaklaşık iki-üç cm altından çıkan testiküler arterdir. Bu damar iç kasık halkasına kadar retroperitoneumda ilerleyip spermatik kordon yapıları arasına katılır. Tek veya dallara ayrılan testiküler arter, testis arka yüzüne ulaşarak oblik biçimde tunika albugineayı geçer. Sonra ana dallar bölünerek ilerler ve seminifer tübüller arasında yer alan interlobüler arteriolleri oluşturur. Ana damar testiküler arter olmasına karşın, kremasterik, vazal ve epididimal arterlerle testiküler arter arasında birçok anastomoz görülebilmektedir.

Testisin venöz drenajı kapiller ile başlar ve testis dışında 'plexus pampiniformis'i meydana getirirler. Çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde bu venler birleşerek testiküler veni oluştururlar. Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin dört-beş cm kadar altından vena kava inferiora, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır.

Testisin innervasyonu asıl olarak sempatik postganglionik ve visseral afferent sinirlerle olmaktadır. Sinirler genelde damarları takip ederek testise ulaşırlar. Tunika albuginea dışında dallara ayrılan sinirler interstisyuma kan damarları ile birlikte ulaşırlar.

Testis lenfatikleri, seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapilerlerle interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatik kordonu takip ederek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar (Kuran 1983, Snell 1986).

1.5. Kemoterapotikler

Spermato-genik hücreler kemoterapotik ilaçların zararlı etkilerine çok duyarlıdır. Kök hücre topluluğunda onarılamayan hasara yol açarak kalıcı infertiliteye yol açabilir. En duyarlı hücreler aktif bölünen spermatogonia ve preleptoten fazına kadarki spermatositlerdir. Kemoterapotik ajanlardan en gonodotoksik olanları alkilleyiciler (siklofosfamid, mustin, klorambusil, melfelan, busulfan, lamustin, karmustin), antimetobolitler (sitarabin), vinka alkoloidler (vinblastin) ve diğerleri (prokarbazine, sisplatin, nitrojen mustart) olarak bilinir (Carter ve ark 1993, Meistrich ve ark 1997). Spermatogenezdeki bozulmanın ciddiyeti ve düzelebilirliği ajanların yapısına, toplam dozuna ve tedavi şekline bağlıdır. Kemoterapotik tedavisinin ratlarda germ hücrelere verdiği hasarı en aza indirmek üzere GnRH analogları (leuprolid) ile yapılan hormonal müdahalenin spermatogenik hücrelerde sitoprotektif etki yaptığı gösterilmiştir.

Her ne kadar, hormonal tedavinin ratlarda spermatogenezi koruyucu etkisi gösterilmiş olsa da, insandaki etkileri için daha fazla çalışma gereklidir (Rosen ve ark 1988, Schmieder ve ark 1991).

Kemoterapinin testislerin endokrin fonksiyonu üzerine etkileri tartışmalıdır. Sertoli ve Leydig hücrelerinin nispeten yavaş bölünen hücreler olduğu ve kemoterapi ilaçlarının etkilerine dirençli oldukları bildirilmektedir. Leydig hücreleri dirençli olmasına rağmen; bir miktar disfonksiyon oluşup, LH seviyelerinde yükselme ve testosteron düzeylerinde düşme görülür. Kemoterapotik tedavisini takiben oluşan en sık hormonal değişiklik FSH yükselmesidir. Serum FSH seviyeleri tedavi sonrası spermatogenezin takibinde bir göstergedir (Tal ve ark 2000).

1.5.1. Sisplatin

Sisplatin (CP) ağır bir metal olan platin (Pt) içeren güçlü bir antineoplastik ajandır (Borch, Pleasants 1979, Hanneman, Baumann 1988, Sadzuka ve ark 1991, Liu ve ark 1998, Mansour ve ark 2002, Sueishi ve ark 2002, Sheikh- Hamad ve ark 2004). Sıvı ortamda Pt elektrotlar aracılığıyla oluşturulan elektriksel alanın E. coli'nin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan deneyler sırasında, elektrottan sıvıya geçen platin türevlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etki yaptıkları tesadüfen fark edilmiştir (Kayaalp 1998). Platinin de içinde bulunduğu VIII. grup metallerin nötral kompleksleri antitümör ve karsinojenik etki gücüne sahiptir. Aralarında en etkin olan Pt kompleksleridir ve CP de bunlardan biridir. Bu bileşikler selektif ve spesifik olarak hücre çoğalmasını inhibe ederler ve ayrıca antibakteriyel özellikleri de mevcuttur (Chirina, Pedraza-Chaverri 2009, Gayer, Clarkson 2001). Platin grubu taşıyan kematerapötikler, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan altı sınıf kemoterapötikten biridir (Boulikas 2009).

CP, yalnız başına veya diğer antineoplastik ajanlar ile (siklofosfamid, bleomisin, etoposid gibi) birlikte sık görülen ağız, baş, boyun, akciğer, endometriyum kanserlerinde olduğu kadar ileri over ve testis kanserlerinde de sıklıkla kullanılır (Hanneman, Baumann 1988, Zunino ve ark 1989, Bogin ve ark 1994, Liu ve ark 1998, Goren 2003, Hanigan, Devarajan 2003, Sheikh- Hamad ve ark 2004, Uehara ve ark 2005). CP, ayrıca özefagus kanseri, lokalize servikal kanser ve baş-boyun kanserlerinde radyoterapiyle birlikte kullanılır. Genellikle diğer antineoplastik ajanların tek başlarına başarısız oldukları katı tümörlerin tedavisinde, CP ile kombinasyon uygulanır. CP'in terapötik etkisi, doz artışıyla belirgin derecede artmaktadır (Hanigan, Devarajan 2003, Florea, Büsselberg 2009). İntravenöz infüzyon veya yavaş i.v. injeksiyon şeklinde tek başına günde 100 mg/m^2 dozunda, kombinasyon içinde ise genellikle 20 mg/ m^2 dozunda uygulanır (Kayaalp 1998). Ancak; nefrotoksisite başta olmak üzere, yan etkileri klinik kullanımında sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle, CP ile yapılan kanser kemoterapisinde nefrotoksisitenin önlenmesi klinikte hasta yararına önemli katkı sağlayacaktır (Borch, Pleasants 1979, Bompart 1990, Sadzuka ve ark 1991, Kayaalp 1998, Liu ve ark 1998, Thenenshkumar ve ark 2009).

CP nefrotoksisitesinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, sisplatinin neden olduğu süperoksit ve hidroksil radikali gibi serbest oksijen radikalleri oluşumu, nefrotoksisitesini açıklayan mekanizmalardan biri olarak ileri sürülmüştür. Bu görüşten hareketle, antioksidanların sisplatin nefrotoksisitesine karşı koruyuculuğu araştırılmış ve gerçekten bazı antioksidanların, böbrek dokusunu sisplatine bağlı nefrotoksisiteden koruduğu gösterilmiştir (Borch, Pleasants 1979, Bompart 1990, Appenroth ve ark 1997, Greggi-Antunes ve ark 2000, Mansour ve ark 2002, Kadikoylu ve ark 2004, Sheikh- Hamad ve ark 2004, Ateşşahin ve ark 2006).

Günümüzde daha etkin ve daha az toksik olan CP analogları araştırılmaktadır (Sadzuka ve ark 1991, Gayer, Clarkson 2001, Uehara ve ark 2005). Toksisitesi düşük yeni ajanların geliştirilmesi ile CP'in klinik kullanımının artırılmaya çalışılması çok ilgi çeken bir çalışma alanıdır (Mansour ve ark 2002). CP'in doz kısıtlayıcı nefrotoksisitesi nedeniyle, karboplatin gibi Pt merkezli ve nefrotoksik olmayan türevler geliştirilmiştir. Ancak, CP halen Pt içeren ajanlar arasında en çok tercih edilen hem de en sık kullanılan kemoterapötiklerden biri olmayı sürdürmektedir. Karboplatin de CP gibi DNA'ya bağlanır ve çoğalan tümör hücresini öldürür. Ancak, Pt merkezli diğer bir ilaç olan karboplatin, kemik iliği depresyonu ve anemiye neden olmaktadır Karboplatin, CP'in nefrotoksisite ve nörotoksisite gösterdiği terapötik dozdan beş kat daha yüksek dozda kullanılabilir. (Gayer, Clarkson 2001, Hanigan, Devarajan 2003). Nedaplatin, daha az nefrotoksik bir CP analoğudur. Ancak, hakkındaki bilgiler henüz çok sınırlı olup, çalışmalar devam etmektedir (Uehara ve ark 2005).

1.5.2. Etki Mekanizması

CP'in antikanser aktivitesi, DNA çifte sarmalında sarmal içi çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini engelleyen bir komplekse dönüşmesinden (Sueishi ve ark 2002), yani DNA çift-zincirinde çapraz bağlanma yapmasından ileri gelir (Kayaalp 1998). Böylece CP, tümör hücresinde DNA biyosentezini inhibe eder (Sadzuka ve ark 1991). CP'nin sitotoksik etki mekanizması, nükleer DNA'ya bağlanması ve transkripsiyonu ve/veya DNA replikasyon mekanizmasını interfere etmesi ile açıklanmaktadır. CP, çeşitli mekanizmalar ile mitokondriyal permeabiliteyi artırarak apoptozu indüklemektedir. Ancak aynı apoptotik etki CP toksisitesinde de rol

oynamaktadır (Florea, Büsselberg 2009). CP'nin etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlarınkine benzer. Sadece sis izomeri sitotoksiktir. Döneme özgü olmayan bir ilaçtır, hücreleri her dönemde etkileyebilir. Alkilleyici ilaçlar, antimetabolitler ve bazı bitkisel kaynaklı antineoplastik ilaçlarla sinerjistik etkileşme gösterir (Kayaalp 1998).

CP, katı tümörlerin pekçok çeşitinde kullanılabilen, etkin bir kemoterapötik olmasına karşın, başta nefrotoksisite olmak üzere (Borch, Pleasants 1979, Hanneman, Baumann 1988, Liu ve ark 1998, Klaassen 2001, Sueishi ve ark 2002, Sheikh-Hamad ve ark 2004) hepatotoksisite (Bompart 1990, Dubskaia ve ark 1994, Zicca ve ark 2002), miyelosupresyon etki (Kayaalp 1998, Klaassen 2001, Mansour ve ark 2002), nörotoksisite (Kayaalp 1998, Klaassen 2001, Zicca ve ark 2002), geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doz bağımlı belirgin yan etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır (Liu ve ark 1998, Zicca va rak 2002). CP ile kanser kemoterapisinde klinik açıdan önemli olan nokta, yan etkilere karşı korunmanın sağlanmasıdır (Sueishi ve ark 2002).

CP'in toksik etki mekanizmaları henüz net olarak açıklanamamış olmakla birlikte, bunlardan biri, CP'nin DNA ile katlım ürünleri oluşturmasıdır. Bu mekanizmada, CP'nin doğrudan sitotoksik Pt-DNA kompleksini oluşturduğu ileri sürülmüştür. Pozitif yüklü Pt atomu hücresel DNA, RNA ve proteinleri bağlayabilir. Pt-DNA kompleksinin özellikle hücre bölünmesi üzerinde önemli toksik etkileri mevcuttur (Hanigan, Devarajan 2003).

CP insanlarda baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek gibi bir çok solid tümörde etkili bir antitümör ilaç olarak kullanılmaktadır (Madasu ve ark 1997, Mansour ve ark 2002). Bunların toksisiteleri ve taşıdıkları minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla göz ardı edilir. Çeşitli organ ve sistemlere olan toksisiteleri yanında risklerden biri üreme yaşındaki bireylerin over veya testis hasarına bağlı olarak üreme yeteneklerinin kaybedilmesidir. Özellikle testis hücreleri mitotik, mayotik morfojenik çeşitli süreçlere girdiklerinden kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olarak seçilir, bu yüzden de kolayca hasarlanırlar. Kemoterapötik ajanlar alkilleyiciler, antimetabolitler, mitotik inhibitörler, antibiyotikler, enzimler, hormonlar ve hormon antagonistleri gibi çeşitli kategorilere ayrıldıklarından, bunların genel etki

mekanizmalarının benzerliğinden söz etmek doğru olmaz (Pogach ve ark 1989, Kayaalp 1994).

Tedavi esnasında serbest oksijen radikalleri üreterek nefrotoksisiteye neden olabilmekte, sonuçta doz kısıtlamasına gidilmektedir (Kuhlmann ve ark 1998). Serbest radikaller, sıklıkla hücre membranındaki lipid komponentlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (Mansour ve ark 2002). Ayrıca, protein sentezinde azalmaya sebep olduğu, hücre bileşenleriyle reaksiyona girerek hücrenin asli görevlerini yapmasını engellediği ve DNA'yı bloke eden organik peroksitlerin oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir (Santovito ve ark 2000). Serbest radikaller mitokondrilerin fonksiyonunda bozukluklara da sebep olmaktadırlar (Leibbrandt ve ark 1995). Yapılan çalışmalarda sisplatinin, lipit peroksidasyonuna, bazı enzim aktivitelerinde değişikliklere ve kromozom anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir (Nefic 2001, Mansour ve ark 2002, Özyurt ve ark 2002).

Sisplatin toksisitesinden sorumlu birden fazla mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Hücre içerisine difüzyon yoluyla giren sisplatin, antitümöral ve hatta nefrotoksik etkisini, hücre içinde reaktif platin türlerine hidrolize olarak gösterir (Klaassen 1996). Sisplatin DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu bağların ortaya çıkışı ise DNA transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eder. Sisplatinin modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutta ise, hücre tarafından tolere edilemez ve hücre ölümüne neden olur (Jordan, Carmo-Fonseca 2000).

Sisplatinin neden olduğu oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri de mitokondrial hasar ve kaspaz 9 üzerinden apoptozisi tetiklemektedir (Van Geelen ve ark 2003).

Sisplatin, gerek süperoksit iyonları gerekse hidroksil radikalleri gibi aktif oksijen türlerini üretebilir, normal dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir (Nishikawa ve ark 2001). Bu nedenle, normal dokulara zarar vermemek şartıyla, antitümöral etkinliği olmaksızın, ilaçların meydana getirdiği hasarı azaltmak amacıyla çok sayıda koruyucu ajan antitümöral ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır (Vickers ve ark 2004).

1.6. Apoptozis

Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Öztürk 2002, Tomatır 2003, Akşit, Bildik 2008).

Kerr (1972), fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Touchette, Fogle 1991).

Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitozis ile dokuda sürekli bir denge halindedir (Cummings ve ark 1997). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Schwartzman ve ark 1993, Majno ve ark 1995).

Apoptotik süreç esnasında, hücrede bir çok morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler; hücrelerin küçülmesi, büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, nüklear piknoz ve parçalanma, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile karakterizedir. Nükleozomlar arası DNA yıkımı görülür. Apoptotik cisimcikler fagosite olduğu için doku reaksiyonlarında inflamasyon görülmez (Walker ve ark 1988, Öztürk 2002). Apoptotik süreçte gözlenen aşamalar şu şekilde sıralanabilir (Öztürk 2002);

1. Apoptozis'in başlatılması,
2. Hücre içi proteazların aktivasyonu,
3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler,
4. Fagositoz.

1.6.1. Apoptozis'in Başlatılması

Apoptotik sürecin başlamasında hücre içi ve hücre dışı kökenli ölüm sinyalleri etkili olur. Bu uyarılara maruz kalan hücrede, ilgili genetik mekanizma harekete geçer ve apoptozis başlar (Öztürk 2002). Metabolizma ve siklus

bozuklukları, hiperkalsemi, pH değişiklikleri gibi etkiler hücre içinden kaynaklanan sinyallerdir.

Hücre dışından gelen sinyaller ise, ultraviole ışınları, hipoksi, ısı değişiklikleri, anti-kanser ilaçlar ve toksik maddelerdir. Dış kaynaklı olan sinyaller DNA hasarı meydana getirerek apoptozise yol açmaktadır (Ergin 2002).

1.6.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

Hücre içi ya da hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan proteazları aktive eder. Bu proteazlara kaspaz adı verilir (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases) (Öztürk 2002). Şu ana kadar belirlenmiş 14 kaspaz vardır (Strasser ve ark 2000). Bu kaspazlar; başlatıcı kaspazlar, öldürücü kaspazlar ve sitokin olgunlaşmasından sorumlu kaspazlar olarak üç sınıfa ayrılır (Lawen, Grutter 2000). Sonuç olarak; bu kaspazların aktive olması apoptotik sürecin başlamasına yol açar (Öztürk 2002). Bu olay şu şekilde gerçekleşir; mitokondri apoptozis olayında önemli rol oynar. Mitokondrial yol, sitotoksik ajanlar ve oksidatif baskı gibi çesitli intraselüler ve extraselüler etkiler sonucu aktive olur. Apoptotik sinyaller, mitokondriye ait iç ve dış membranlar arasındaki boşluktan sitoplazmaya doğru sitokrom C salınmasına neden olur. Sitoplazmaya salınan sitokrom C, burada apoptotik proteaz aktive edici faktor 1'e (apaf-1) tutunur. Apaf-1'e tutunan sitokrom C sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olur. Meydana gelen apoptozomlar ise, kaspazları aktive eder. Sonuç olarak, kaspazların aktivasyonu da apoptozise yol açar (Lawen, Grutter 2000).

1.6.3. Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik sürecin sonlarına doğru, kaspazlar DNA kırılmalarına yol açar. Aktin filamanının yıkımına bağlı olarak hücre normal şeklini kaybeder ve hücre membranının asimetrisi bozulur. Su kaybeden hücre büzülür. Hücre yüzeyinde kraterler oluşur. Çekirdek de büzülerek parçalanır. Son olarak hücrenin parçalanmasıyla apoptotik cisimcikler meydana gelir (Öztürk 2002).

1.6.4. Fagositoz

Meydana gelen apoptotik cisimcikler, çevredeki parankim hücreleri ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenir. Apoptozis esnasında inflamasyon oluşmaz (Lawen ve Grutter 2000).

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken, nekrozis patolojik bir ölüm şeklidir. Apoptotik hücrede kromatin nükleus membranı agregasyon gösterir ve kondanse olur ancak nekroziste kromatin paterni normal hücredekine benzerdir. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler "membrane blebs" oluşur. Apoptozis ile ölen bir hücrede hücre membranı intaktır ve enflamasyon gözlenmez; nekrozda ise, enflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması gözlenir (Orrenius ve ark 2003). Apoptozis, bir hücre hasarına yanıt olarak meydana gelirken nekroz, genelde hasar sonucu gelişir. Apoptozis, önceden belirlenen bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken; nekroz, birçok biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile aktive olur (Denecker ve ark 2001, Krysko ve ark 2008).

1.6.5. Apoptozis'in Düzenlenmesi

Bir hücrede apoptozis mekanizması iki yolla düzenlenir:

1) Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süper ailesi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis

2) Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptozis (Scorrano ve Korsmeyer 2003).

Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör Nekroze edici Faktör Reseptör (TNFR) süper ailesine ait transmembran proteinlerinin bir üyesidir. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde tekrar eden sistein zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplazmanın iç kısmında 'ölüm bölgesi' (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler (Ashkenazi ve Dixit 1998). Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın

mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu ile sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi sonucu apoptotik süreçde geri dönülemez noktaya ulaşılır. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl- 2 ailesidir.

Hücrelerdeki apoptotik sürecin kontrol edilmesinde mitokondriler önemli bir rol üstlenir. Apoptozis sürecinde Bcl-2, Bax ve Bcl-X görev alan başlıca mitokondri molekülleridir. Bcl-2 ailesi pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad, Bcl-XS) ve anti-apoptotik (Bcl- 2, Bcl-XL) üyeleri içerir (Ergin 2002). Bu üyelerin mitokondrileri etkilemesi sonucu sitokrom C ya sitoplazmaya salınır (apoptozisin aktivasyonu) ya da salınım baskılanır (apoptozisin inhibisyonu). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler arasındaki denge sitokrom C salınmasında önemli bir role sahiptir.

Bcl-2, Bax'ın mitokondrial membrana tutunmasını engelleyerek, sitoplazmaya sitokrom C salınımını inhibe eder ve apoptozis engellenir. Olayın bu şekilde gerçekleşmedigi durumlarda ise, Bax mitokondrial membrana tutunarak sitoplazmaya sitokrom C salınmasını aktive eder ve apoptozis oluşur. Sonuç olarak, bir hücre sitoplazmasında immunohistokimyasal olarak Bax proteininin gösterilmesi o hücrede apoptozis'in meydana geldiğini ortaya koyar (Gross ve ark 1999, Deveraux ve ark 2001).

DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: DNA'nın 180- 200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılması olarak ifade edilen DNA fragmentasyonu programlı hücre ölümünün belirleyici özelliğidir (Arends, Wyllie 1991). DNA'nın bu özelliği agoroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Fakat bu yöntemlerle apoptozisin kesinliği değil DNA'nın fragmentasyonunun anlaşılması için tanımlayıcıdır. Enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) yöntemi 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından doku kesitlerinde ve hücrelerde ilk defa kullanılmıştır. TdT enziminin aktivitesi için DNA'nın 3' ucu biotinlenmiş dUTP ile birleşir. İn situ olarak DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde ise (ISEL), çoğunlukla Kornberg polimeraz (E. coli'den elde edilen DNA polimeraz) DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti ve TdT kullanılmaktadır (Hilton ve ark 1997).

1.6.6. Apoptozun Tespiti: TUNEL Metodu

Apoptoz, hücre hacminin küçülmesi ile başlar, hücre büzülür, sitoplazmik membranda küçük balonlaşmalar oluşur, nukleus yoğunlaşır ve nüklear membrana yarım ay biçiminde çöker, segmentler halinde parçalanır ve hücre "apoptotik cisimcikler" şeklinde küçük parçalara ayrılır ve sonunda fagositler tarafından tanınarak ortamdan kaldırılırlar. Apoptozun morfolojik değişimlerinin tümü elektron mikroskopisi ile görülebilmektedir. Karakteristik apoptotik cisimcikler, kısa ömürlü ve anlık görülür ve diğer hücresel kuruculara benzediği için ışık mikroskopi ile gözlenebilir. Apoptotik hücrelerde DNA parçalanmasını takiben hücre ölümü olmakta ve genellikle birkaç saat içerisinde dokudan uzaklaştırılmaktadır. Her bir saatte hücrelerin sadece % 2-3'ünde apoptoz görülmesi sonucu doku gerilemesinin oranı gün başına %25 kadar hızlı olmaktadır. Bu yüzden morfolojik olarak apoptotik indeksin sayısal ölçümleri zor olmaktadır.

Apoptozda görülen DNA parçalanması genellikle hücresel morfolojide ince yapısal değişimler ile ilişkilidir. Sistemlerinin çoğunda, kromatin yapısal organizasyonunun endonukleolitik yıkılması ile oluşan ilk ürünler 300 kb- 50 kb'lık büyük parçalardır. Bu büyük DNA parçaları elektroforez jelinde görülebilir. Bir çok modelde, Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlı endonükleaz aktivitesinin aktivasyonu, nukleozomlar arasındaki bağlayıcı yerlerde DNA bölünmesi ile parçaları daha da kısaltır. DNA parçaları yaklaşık 180 bp nukleozomal bölümlerin multimerleridir. Bu multimerler apoptotik hücrelerden çıkarılan DNA'nın agaroz jel elektroforezinde "DNA merdiven" görüntüsü olarak gözükür.

Apoptoz çalışmalarında DNA parçalanmasını tespit amacıyla kullanılan bir diğer metod TUNEL yöntemidir. DNA dizi kırıkları, değişime uğramış nukleotidlerin serbest 3'-OH uçlarının enzimatik (TdT enzimi: terminal deoxynucleotidyl transferase) olarak işaretlenmesiyle tespit edilir. TdT, tek veya çift dizili DNA'nın 3'-OH uçlarına nukleotid trifosfatların eklenmesini katalizler. Digoksigenin-konjugat nukleotidinin oluşturduğu bir oligomerden nukleotidler birleşir. DNA parçaları digoksigeninnukleotid ile işaretlenir. Peroksidaz antikor konjugat enzimatik olarak devamlı ve şiddetli bağlanma meydana getirir, lokalizasyon kromojenik substratlar (DAB) ile boyanır ve görünür hale getirilir (Wijsman ve ark 1993, Collins ve ark 1997, Kaya Dağıstanlı ve ark 2005). Yeni DNA uçları (DNA parçalanması ile oluşur), apoptotik cisimcikler nukleusta bulunur

ve morfolojik olarak tanımlanabilir. Buna karşın, normal veya proliferatif nukleusta DNA 3'-OH uçlarının sayısı az olduğundan genellikle boyanma olmaz. TUNEL tekniği ile apoptoz erken dönemde kromatin yoğunlaşması başladığında ve daha az dizi kırıkları olduğunda, hatta nukleusta büyük morfolojik değişimler başlamadan önce tespit edilir.

In situ apoptoz tespit kiti apoptoz ile ilişkili kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanmasını özgün olarak tespit ettiğinden; nekrozdan apoptozu ayırmaktadır. Pozitif boyanma apoptozun tipik biyokimyasal ve morfolojik kanıtları ile doğrudan ilişkilidir. Bazı dokularda sitoplazmik büzülme hücre çevresinde belirgin olarak gösterilmektedir. Erken safha pozitiflik, nukleusta kromatin yığılması ile görülebilmektedir. Apoptotik cisimcikler ya hücreler arası alanda ya da fagositik hücrelerin içinde bulunabilir (Labat-Moleur ve ark 1998).

1.6.7. Testiste Apoptozis'in Rolü

Testisteki germ hücre dejenerasyonu hem gelişimde hem de erişkinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Sıçanlarda doğurma zamanına kadar testisteki hücrelerin yarısının öldüğü bilinmektedir. Bu dejenerasyon sırasında apoptozis yoluyla ölüm en sık kullanılan mekanizmadır. Bu mekanizmanın içerisinde Bcl- 2 ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi faktörler yer alır. Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (Sharpe 1994, Sinha-Hikim ve ark 1998).

Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (Beumer ve ark 2000). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (Jefferson ve ark 2000). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir (Kerr 1992). Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır ve apoptozisin doğal bir mekanizma olarak normal spermatogenez sırasında sperm

üretimini %25 ile %75 arasında değişen oranda azalttığı bilinmektedir (Huckins 1978, Allan ve ark 1987, Kerr 1992, Hsueh ve ark 1996). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Rodriguez ve ark 1997, Sinha-Hikim ve ark 2000, Ayaşhoğlu 2001). Androjen eksikliğinde, azoospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorkidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artış görülebilir (Heiskanen ve ark 1996, Ikeda ve ark 1999). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (Tapanainen ve ark 1993, Yin ve ark 1997).

Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da HCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (Heiskanen ve ark 1996, Yin ve ark 1997). Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptozis görülebilir (Lin ve ark 1999). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (Blanco-Rodriguez ve Garcia Martinez 1998).

Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimülanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (Korsmeyer 1995).

1.7. Çinko

Çinko (Zn), mavimsi açık gri renkte, kırılgan bir metaldir. Elementlerin periyodik tablosunda geçiş elementleri grubunda yer alır. Zn, yerkabuğunda en çok bulunan elementler arasında 23. sıradadır. Düşük kaynama sıcaklığı dikkat çekicidir. Dökülmüş halde sert ve kırılgandır. 120°C'de şekillendirilebilir. Elektrokimyasal potansiyel dizisinde demirden daha negatif değerdedir. Böylece Zn anot olarak katodik korozyon korumada önemli bir kullanım bulur. Galvanizleme bu tür uygulamalardan biridir. Zn, bileşiklerinde (+2) değerlikli olarak bulunur.

Oluşturduğu bileşiklerde kovalent bağ yapar. Zn, özellikle toz halde çok etkili bir redükleyicidir (Bray ve Bettger 1990, Chandra ve Mcbean 1994, Powell 2000, Rostan ve ark 2002).

1.7.1. Çinkonun Tarihçesi

Zn, antik çağlardan beri bilinen ancak üretimi ve kullanılması tam anlaşılamadığından diğer metallerle karıştırılan bir elementtir. Zn'nin ilk tanımlanması 1509 yılında Erasmus Ebener tarafından yapılmıştır. 1869'da Raulin Zn'nin Aspergillus niger adlı siyah ekmek mantarının büyümesi için gerekli bir element olduğunu göstermiştir (Tanimoto ve ark 1999, Powell 2000, Saner ve ark 2002, Belgemen, Akar 2004). Biyolojik fonksiyonu ise 1940 yılında karbonik anhidrazın katalitik aktivitesi için Zn'ye gereksinimi olduğunun Keilin ve Mann tarafından saptanması ile ortaya çıkarılmıştır (Wellinghausen ve ark 1997, Belgemen, Akar 2004). Prasad'ın 1961 yılında sunduğu vakada; 1958 yılında Dr. Halsted ile birlikte gördüğü cücelik, hipogonadizm, hepatosplenomegali, toprak yeme, kuru cilt ve demir eksikliği anemisi ile gelen 21 yaşındaki İran'lı bir hastada Zn eksikliği tanımlanmıştır (Wellinghausen ve ark 1997, Belgemen, Akar 2004). 1963 yılında Mısır'da benzer bulguları taşıyan çocuklarda ilk defa kanda Zn ölçümleri yapılarak bu elementin eksik olduğu saptanmış ve sonrasında bu klinik tablo 'Prasad Sendromu' olarak literatüre geçmiştir. Aslında toprak yiyen çocuklarda, anemi, gelişme geriliği, dalak, karaciğer büyüklüğünün meydana geldiği, 1942 yılında Dr. Memduh Tayanç tarafından gözlenmiş ve yayınlanmıştır (Wellinghausen ve ark 1997). 1973'de Barnes ve Moynahan, akrodermatitis enteropatikanın Zn desteğiyle düzeldiğini bildirmişlerdir (Prasad 1995, Belgemen ve Akar 2004). 1974'de Amerikan Ulusal Bilimsel Akademi Gıda ve Beslenme konseyi tarafından Zn'nin esansiyel bir besin maddesi olduğu açıklanmış ve daha sonrada parenteral beslenme sıvılarına katılması zorunlu kılınmıştır (Walsh ve ark 1994, Prasad 1995, Wellinghausen ve ark 1997, Belgemen ve Akar 2004). Günümüzde Zn'nin metabolik olaylarda, protein, karbonhidrat, enerji, nükleik asit, lipid ve hem sentezinde, gen ekspresyonunda, immün sistem matürasyonunda, doku sentezi ve embriyogenezisde önemli roller üstlendiği bilinmektedir.

1.7.2. Kullanım Alanları

Zn, dünyada yıllık kullanım miktarı açısından demir, alüminyum, ve bakırdan sonra gelir. Zn:

*Korozyondan korunma amacıyla, çelik gibi diğer metallerin galvanize edilmesinde kullanılır.

*Pirinç, nikelli gümüş, değişik lehimler, alman gümüşü gibi alaşımların yapımında kullanılır.

*Genellikle otomotiv endüstrisinde döküm kalıplarında, pillerin gövdelerinin yapımında kullanılır.

*Zn oksit, sulu boyalarda beyaz pigment olarak ve lastik sanayinde aktivatör olarak kullanılır.

*Reçetesiz satılabilen bazı merhemlerin bileşiminde bulunur ve ince bir tabaka halinde uygulandığında cildin su kaybetmesini önler. Yazın güneş, kışın da soğuk yanıklarına karşı koruyucudur.

*Bebeklerin bez bağlanan bölgelerinde çok az miktarda kullanılarak ciltte meydana gelebilecek kızarıklıklar önlenebilir.

*Yaşa bağlı göz hastalıklarının tedavisinde de kullanılır.

*Çinko klorür, deodorantlarda ve ahşap koruyucu olarak kullanılır.

*Çinko sülfür, karanlıkta parlayan pigment olarak saatlerin akrep ve yelkovanlarında kullanılır.

*Zn, pek çok günlük vitamin ve mineral ilaçlarının bileşenidir (Bray ve Bettger 1990, Chandra, Mcbean 1994, Tanimoto ve ark 1999, Powell 2000, Saner ve ark 2002).

Zn'nin vücuttaki bilinen önemli işlevleri şunlardır:

1) Antioksidan özelligi ile hem hücreleri serbest radikallerden korur, hem de hücre zarı ve fonksiyonlarına yardım eder.
2) Zn, karbonhidrat metabolizması için önemli bir hormon olan insülin molekülünün bir parçasıdır.
3) Zn, tat duyusunda temel rol oynayan tükrük yapısına katılır.

4) Zn, beyin ve koroner damarlarda genişlemeler sağlayarak iskemik durumları önler.

5) Zn, yara iyileşmesinde rol oynar.

6) RNA ve DNA oluşumu ve proteinlerin enerjiye dönüştürülmesi için çok önemlidir. Özellikle kalp, beyin ve üreme sistemi Zn'ya ihtiyaç duyar.

7) Zihinsel fonksiyonlarda, vücudun kendi kendini iyileştirmesi ve yenilemesi gereken durumlarda, kanın stabilizasyonunda, vücuttaki alkali dengesinin korunmasında önemli roller üstlenir.

8) Alkol dehidrogenaz enziminin yapısına girerek içki ile alınan ve ayrıca vücuttaki kimyasal olaylarla oluşan alkolü etkisizleştirir.

9) Deri sağlığına yararlıdır. Deri hücrelerinin çoğalmasına, yağ bezlerinin çalışmasına ve kollajen dokuya etki eder. Böylelikle hem cildin sağlığının korunmasına hem de yanık gibi nedenlerle oluşan hasarların tamir edilmesine yardımcı olur. Hücre yenilenmesinde payı oldugu için cildi güzelleştirerek el tırnaklarını sertleştirir, nörodermatiti ve uçukları hafifletir. Ayrıca saç dökülmesi üzerinde olumlu etkileri vardır.

10) Prostat bezi, göz, dalak ve kas dokularına olumlu etkisi vardır.

11) Enerji üretiminde ve fosforun kemiğe tutunmasında etkilidir. Kemik ve dişlerin yapısında rol alır.

12) Bağışıklık sistemine oldukça büyük destek verir. Kış aylarında soğuk algınlığı ve gribe karşı oldukça etkili olan çinko, bakterilere ve virüslere karşı direnci arttırır, dış enfeksiyon etkenlerine karşı antikor üretimine katkıda bulunur. Aşıların etkilerini göstermesinde yardımcıdır.

13) A vitamininin etkisiyle mikropları öldürür ve vücuttaki aknelerin kaybolmasını sağlar.

14) Hücre büyüme ve bölünmesi, cinsel olgunlaşma ve üreme, karanlığa adaptasyon ve gece görme, tat ve olasılıkla koku alma duyumunun tamlığı gibi fizyolojik fonksiyonların gerçekleşebilmesi için vücudumuz çinkoya bağımlıdır.

15) Çocukların büyüme ve gelişmelerinin desteklenmesinde, akut alt solunum yolu enfeksiyonlarının önlenmesinde, diyare süresinin kısaltılmasında, diyare

prevelansının ve pnömoni prevalansının azaltılmasında kullanılır (Batra ve ark 1998, Afanne ve ark 2002, Arcasoy 2002, Boran ve Özkan 2004, Bashandy ve ark 2006).

1.7.3. Gıda Kaynakları

Zn, oldukça fazla gıdada bulunan bir elementtir. Bir porsiyon istiridye diğerlerinden daha çok çinko içerir. Zn bulunduran diğer faydalı gıdalar; kırmızı et, kümes hayvanları, kabuklu deniz ürünleri, fasulye, fındık, bütün tahıllar, zenginleştirilmiş kahvaltılık tahıl ürünleri ve süt ürünleridir. Zn'nin hayvansal proteinlerin fazla olduğu gıdalardan emilimi bitkisel proteinlerin olduğu ürünlerden daha kolaydır. Zn'nin vücuttaki bulunabilirlik ve kullanılabilirlik oranı ette, sütte ve denizden elde edilebilen gıdalarda oldukça yüksektir, çünkü bu gıdalar Zn'nin emilimini azaltıcı maddeler bulundurmazlar, aksine emilimi arttırıcı bazı amino asitleri (sistein ve methionine) bulundurmaktadırlar (Powell 2000, Rostan ve ark 2002, Saner ve ark 2002).

1.7.4. Vücuttaki Görevleri

Zn, antioksidan etki gösteren ve önemli proteinlerin yapısına giren esansiyel bir mineraldir (Bray ve Bettger 1990, Powell 2000, Rostan ve ark 2002, Saner ve ark 2002). İnsan bedeninde toplam olarak 2–2.5 mg bulunur. Demirden sonra yoğunluğu en fazla olan ikinci maddedir.

İnsan vücudunda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan yaklaşık yüz çesit enzimi aktif hale gelmesi için uyarır. Hücresel mekanizmaların birçoğu Zn'ye bağlıdır. Zn büyüme ve gelişmede, bağışıklık düzeninde, nörolojik fonksiyonlarda ve hücrelerin çoğalmasında önemli role sahiptir. Hücrelerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için kritik rol oynar. Zn hücre zarının yapısal ve fonksiyonel özelliklerini etkileyebilir. Biyolojik zarlarda Zn'nin kaybı bu zarın oksijenin verebilecegi zararlara daha açık hale gelmesine ve fonksiyonlarının kaybolmasına neden olabilir. Gen ekspresyonu ve büyümede fonksiyonları vardır. Ayrıca, UV radyasyondan korur, yara iyileşmesini kolaylaştırır, immün ve nöropsikiyatrik fonksiyonlara katkıda bulunur, kanser ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltır. Zn; tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alır (Bray ve

Bettger 1990, Powell 2000, Rostan ve ark 2002, Saner ve ark 2002). Enzimlerin aktif bölgelerine bağlanır, katalitik bölgelerinde anahtar rol oynar. Biyolojik membranların ve iyon kanallarının stabilitesini ve bütünlüğünü korur. Nükleik asit veya diğer gen düzenleyici proteinlerde yapısal element olarak rol oynar. Redoks aktivitesinin olmaması nedeniyle bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir. Karbonhidrat, protein, lipid, nükleik asit, hem sentezi, gen ekspresyonu, üreme ve embriyogenezisde de görevleri vardır. Metabolizmasında başlıca rol oynayan organ karaciğerdir. Zn, aynı zamanda hücrelerin uyarılmasında, hormonların salgılanmasında ve sinir uyarılarının iletilmesinde rol almaktadır. Son zamanlarda Zn'nin apoptozisde, büyüme ve gelişme için kritik olan bir çok hücresel işlevde çoğu kronik hastalıkta olduğu kadar etkili olduğu gözlenmiştir (Petering ve ark 1984, Harris 2002, Belgemen ve Akar 2004, Boran ve Özkan 2004, Elgazar ve ark 2005).

1.7.5. Çinkonun Metabolizması ve Toksisitesi

Normal bir beslenme düzeninde çinkodan dolayı herhangi bir zehirlenme oldukça düşük bir olasılıktır. Belirgin bir Zn zehir etkisinin ortaya çıkması ancak galvanizlenmiş kaplarda bulunan yiyecek ve içeceklere bu kaplardan Zn'nun bulaşması ve bu gıdaların tüketilmesiyle mümkündür. Bu tür rahatsızlığın çeşitli göstergeleri karın ağrısı, bulantı ve kusmadır. Çinko oksit dumanının içe çekilmesi halinde metal dumanı kaynaklı ateşli rahatsızlık gözlenmiştir (Petering ve ark 1984, Walsh ve ark 1994, Belgemen, Akar 2004). Bol miktarda terleme, güçsüzlük ve hızlı soluk alıp verme gibi belirtileri vardır. Zn, karaciğerde yüksek konsantrasyonda, pankreas, böbrekler ve salgı bezlerinde ise az miktarda bulunur. Zn'nun emilimi özellikle ince bağırsaklarda görülür, Zn'yi kendilerine bağlayabilen moleküller Zn'yi bağırsak mukoza hücrelerinden albümin molekülleri ile kendilerine bağlar karaciğere ve diğer organlara taşırlar. Emilim oranı %20-%70 arasında değişmektedir. Zn'nin %60'ı duodenumdan, %30'u ileumdan, %10'u da jejunumdan emilir. Vücuttaki fazla Zn böbrekler tarafından dışarı atılır. Zn, ince bağırsaklardan spesifik bir mekanizma ile emilir, mukoza hücrelerinde çinko bağlayıcı proteinler tarafından demir gibi tecrit edilir ve daha sonra kandaki serum albüminine iletilir. Bakır, intravasküler duvar içinde bulunan albümin molekülü üzerindeki bağlanma yerleri için yarışarak Zn emilimini engelleyebilir. Ayrıca, yüksek kalsiyum ve fosfat düzeyleri de Zn eksikliğine neden olabilir. Organizmada Zn en bol olarak prostatta, daha az olmak

üzere saç, kemik, kaslar, pankreas, mide, barsak, dalak ve kanda da bulunur. Zn, pankreas sıvısına ve az miktarda da safraya salgılanır, Zn'nin vücuttan atılması özellikle dışkı ile ve bir miktar da ter ile olur. Zn'nin idrarla atılımı çok azdır. Ancak, bir defada fazla miktarda alkol alınması idrarla çinko atılımını artırır (Petering ve ark 1984, Belgemen ve Akar 2004, Elgazar ve ark 2005).

Bu elementin etkili olduğu bir çok fonksiyon bulunduğunu biliyoruz. Fakat bu etkilerin nasıl meydana geldiği, hangi mekanizmaların kullanıldığını net olarak ortaya koyacak araştırmalar henüz tamamlanmamıştır.

Zn eksikliğinin tanımlandığı 1960'lı yıllardan bu yana yapılan çalışmalarda, Zn'nun gen ekspresyonu, DNA sentezi, enzimatik kataliz, hormonların depolanması ve salınımı, büyüme ve gelişme, nörotransmisyon, hafıza ve görme gibi metabolik olaylarda, önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Vallee ve Falchuk 1993). Zn, organizmada demirden sonra en çok bulunan eser elementtir. 70 kg ağırlığındaki bir insanda bulunan yaklaşık 1.4-2.5 gr Zn'nin başlıca eritrositler, prostat, semen, karaciğer, böbrek, hipokampus, retina, kemik ve kas dokusunda dağıldığı bildirilmektedir. Eritrositlerde Zn miktarı, plazmanın yaklaşık 10 katıdır. Çünkü eritrositler, Zn içeren karbonik anhidraz gibi enzimler yönünden zengindir. Biyolojik sistemlerde sadece +2 değerlikli olarak bulunan Zn, demir ve bakırdan farklı olarak oksidasyon veya redüksiyona uğramaz. Yaklaşık 300 den fazla enzimin integral bir komponentidir. Zn içeren enzimler arasında karbonik anhidrazın yanı sıra, alkalen fosfataz, DNA polimeraz, RNA polimeraz, karboksipeptidaz, ve alkol dehidrogenaz sayılabilir. Zn atomu enzime sıkıca bağlı olup, sıklıkla aktif bölgeye de katılmakta ve pek çok metaloenzimin stabilitesini sağlamada görev almaktadır (David 1999).

Zn eksikliğinde özellikle timidin kinaz, alkalen fosfataz ve pankreatik karboksipeptidaz A aktiviteleri daha düşüktür. Çünkü gen ekspresyonunda çinkonun, hem katalitik hem de yapısal rolü bulunmaktadır. Zn'nin DNA ve RNA'ya bağlanması bu yapıların protein sentezi ve replikasyonunu etkilemektedir. DNA'ya bağlanan en büyük protein grubunu oluşturan Zn parmak proteinler (zinc-finger) gelişme ve diğer proseslerle ilgili gen ekspresyonlarını kontrol ederler. Kataliz ve gen ekspresyonuyla ilgili fonksiyonlarına ilaveten proteinleri ve nükleik asitleri stabilize eden Zn subsellüler organellerin bütünlüğünü korur, transport proseslerine katılır, viral ve immün olaylarda da önemli roller alır. Yara iyileşmesinde Zn oldukça önemli bir elemettir. Bağ dokusunun biyosentezi ve integrasyonu için Zn gereklidir.

Bu nedenle cerrahi sonrası yeterli oranda Zn alınması önem taşımaktadır (Vallee ve Falchuk 1993).

Canlılarda hücrelerin proliferasyon, replikasyon ve farklılaşması için aminoasitler, glukoz, yağ asitleri ve vitaminler yanında minerallere de ihtiyaç vardır. Zn, organizma için esansiyel bir mineraldir. Optimal sağlık için her gün belirli bir miktar alınması gereken biyolojik bir eser elementtir (Arcasoy 2002). Tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alır. Önemli proteinlerin yapısına girer. Enzimlerin aktif bölgelerine bağlanır, katalitik bölgelerinde anahtar rol oynar. İntrasellüler bir düzenleyici olup, moleküler etkileşimlerde proteinler için yapısal destek sağlar. Biyolojik membranların ve iyon kanallarının stabilitesini ve bütünlüğünü korur. Nükleik asit veya diğer gen düzenleyici proteinlerde yapısal element olarak rol oynar. Redoks aktivitesinin olmaması nedeniyle bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir. Karbonhidrat, protein, lipid, nükleik asit, hem sentezi, gen ekspresyonu, üreme ve embriyogenezis'de de görevleri vardır (Arcasoy 2002, Rostan ve ark 2002).

Zn'nin serbest radikal oluşumu ve oksidatif stresten koruyucu rolü vardır. Oksidatif hasarın neden olduğu kütanöz ve romatolojik inflamatuar hastalıklar, alkolizm, karaciğer sirozu ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rol oynar. Zn, antioksidan etkilerini iki mekanizma ile sağlar:

1. Redoks stabil olan Zn, kritik selüler ve ekstraselüler bölgelerde demir ve bakır gibi redoks reaktif olan metallerin yerine geçer.

2. Serbest radikallerden koruyan, sülfidrilden zengin proteinler olan metallotiyoneinlerin sentezini indükler.

Zn, antioksidan etkili bir enzim olan süperoksit dismutazın ve dokuları serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan metallotiyoneinlerin yapısında yer alır (Rostan ve ark 2002).

Bir dokunun büyüklüğü hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Birçok hücre kendi ölümünü programlanmış hücre ölümü veya apopitozis denilen genetik bir işlemle kontrol eder. Zn fazlalığının apopitozisi inhibe ettiği, çinko eksikliğinin ise uyardığı gözlenmiştir. Zn'nin apopitozisten koruma mekanizmaları;

1) Programlanmış hücre ölümünde önemli bir mekanizma olan oksidatif stresten korur.

2) Demir veya diğer toksik metallerin sisteine bağlanmasını ve protein veya DNA bağlayan elementleri okside etmelerini önler. Böylece nükleer faktörleri oksidasyondan korur. Okside olarak inaktive olan P53 tümör süpresör geninin oksidasyonunu engeller. Apopitozisin geç fazında görevli olup DNA'nın nükleozomlara bölünmesinden sorumlu olan Ca^{+2} – Mg^{+2} bağımlı endonükleazı inhibe eder (Favier 1998).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Doku örnekleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji, Patoloji ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında incelendi.

2.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışma planı oluşturulduktan sonra Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alındı (Karar No: 2010-081). Proje Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğüce (BAP No: 10102041) desteklendi.

2.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezinde ağırlıkları 270-470 gr arasında değişen 10-12 haftalık 40 adet erkek Spraque-Dawley sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Ratlar standart diyet ile beslendiler. 22 ± 2 °C oda sıcaklığı, % 60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritm sağlandı. Kullanılan deney hayvanlarında seçim kriteri olarak literatürde rat modeli kullanılması yanında, temin olanakları da göz önünde tutuldu.

2.3. Deney Hayvan Grupları

Sıçanlar; I. Grup (n=8) Kontrol, II. Grup (n=12) Sisplatin (cis-Platinum, Merck S3950710) tedavisi alan, III. Grup (n=8) Çinko (Zinksulfat, Merck 1150236) ve IV. Grup (n=12) Sisplatin+Çinko olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubuna (Kon); 30 gün boyunca izotonik salin solusyonu intraperitonal (ip.), sisplatin grubuna (CP); ilk 20 gün izotonik salin solusyonu sonraki 5 gün cis-platinum (günlük 2 mg/kg) ip. ve son 5 gün izotonik salin solusyonu, çinko grubuna (Zn); 30 gün boyunca çinko sülfat (3 mg/kg) ip., sisplatin+çinko grubuna (CP+Zn) ise; 20 gün boyunca sadece çinko sülfat (3 mg/kg)

sonraki 5 gün cis-platinum (günlük 2 mg/kg) ve son 5 gün sadece çinko sülfat (3 mg/kg) ip. olarak verildi (Çizelge 2.1).

CP grubundaki deney hayvanlarından 5'i CP enjeksiyonundan sonra öldü ve çalışmaya dahil edilmedi. 30 günün sonunda sıçanlara yüksek doz Ketalar-Rompun ile ötenazi yapıldı.

Çizelge 2.1. Gruplara göre günlük yapılan enjeksiyonun takip çizelgesi

GÜNLER	Kon (n=8)	Zn (n=8)	CP(n=12)	CP+Zn (n=12)
1. GÜN	SF			
2. GÜN	SF	Zn		
3. GÜN	SF	Zn	SF	
4. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
5. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
6. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
7. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
8. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
9. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
10. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
11. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
12. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
13. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
14. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
15. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
16. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
17. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
18. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
19. GÜN	SF	Zn	SF	Zn

20. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
21. GÜN	SF	Zn	CP	CP
22. GÜN	SF	Zn	CP	CP
23. GÜN	SF	Zn	CP	CP
24. GÜN	SF	Zn	CP	CP
25. GÜN	SF	Zn	CP	CP
26. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
27. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
28. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
29. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
30. GÜN	SF	Zn	SF	Zn
31. GÜN	X	Zn	SF	Zn
32. GÜN		X	SF	Zn
33. GÜN			X	Zn
34. GÜN				X

2.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deneye başlarken ve deney süresinin sonunda sıçanların vücut ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Her hayvanın deney süresinde gösterdiği ağırlık değişimi belirlendi ve deney sonu vücut ağırlığı farkı olarak adlandırıldı.

2.5. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) hesaplaması

Deneyin son günü ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için TAİ değerleri belirlendi (Şahintürk ve ark 2007);

TAİ: [(sağ+sol testis ağırlıkları toplamı)/vücut ağırlığı] × 100

2.6. Histolojik Uygulamalar

2.6.1.Nötral Formaldehid Tespit Solusyonunun Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak nötral formaldehid solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

Na_2HPO_4	6,5 g
$NaH_2PO_4H_2O$	3,5 g
Formalin	100 ml
Distile su	900 ml

2.6.2. Dokuların Alınması

Tüm hayvanlar deneyin sonunda tartıldı ve derin anestezi (Ketalar-Rompun) altındayken öldürüldü. Testisler sıçanların karınları tıraş edildikten sonra alt abdomen duvarına orta hat insizyonu yapılarak skrotumdan çıkarılıp formalin solüsyonunda tespit edildi.

2.6.3. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması

Testislerin üzerine tespit sıvısı döküldükten sonra her iki ucundan bistüri ile hafif birer kesik oluşturuldu. Nötral formalin solusyonunda yirmi dört saat bekletildi. Testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölündü ve kasetlere alındı. Bu şekilde kasetlenen dokular etiketlenerek kodlandı ve olağan doku takibi sürecine alınarak her hayvana ait parafin blokları hazırlandı (Russell ve ark 1990, Bankroft ve Gamble 2002).

2.6.4. Kesitlerin alınması ve boyanması

Her bloktan 5 μm kalınlığında seri kesitler alındı. Testis dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikleri gözlemlemek için kesitler Periyodik Asit Schiff (PAS; Biostain Ready Reagents RRSK15-100), Masson Trichrom (Bio-Optica R11S716) ve Hematoksilen Eosin boyaları ile boyandı.

Johnsen Skoru:

10 Germ epiteli çok tabakalı, açık santral lümen, çok miktarda spermatozoon,

9 Germ epiteli çok tabakalı ancak disorganize, lümendeki epitel hücreleri spermatozoonlarla karışmış,

8 Germ epiteli çok tabakalı, lümende 10'dan daha az spermatozoon

7 Çok miktarda spermatid, ancak hiç spermatozoon yok,

6 Hiç spermatazoon yok, spermatid sayısı 10'dan daha az,

5 Bir kaç tane spermatosit, spermatid veya spermatozoon yok,

4 Spermatozoon ve spermatid hiç yok, spermatosit sayısı 5'den az,

3 Sadece bir kaç spermatogonyum,

2 Bir kaç sertoli hücresi, germ hücresi hiç yok,

1 Seminifer tübülde hiç hücre yok,

Bu puanlama sistemine göre incelenen tubuli seminiferi kontorti kesitlerine verilen puanların toplamı, sayılan tübül sayısına bölünerek ortalama puan hesaplanmıştır (Ivan 1993).

2.7. İmmünohistokimyasal Boyama

Elde edilen parafin bloklardan alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler poly-Llysne ile kaplı lamlar üzerine yerleştirildi. Daha sonra lamlar immünohistokimyasal olarak boyandı (Öztürk 1998). İmmunohistokimyasal boyama Avidin biyotin- peroksidaz yöntemi (ABC Metodu*)* ile gerçekleştirildi. Primer antikor olarak Bax monoklonal İmmünglobulin G (IgG) (Santa Cruz Biotechnology U.S.) kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Bax boyama yönteminde izlenilen basamaklar

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon	1 saat
2	Distile su	5 dakika
3	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de (pH: 7.6)	5 dakika
4	%3'lük H2O2'de	20 dakika
5	Distile su, PBS'de yıka ve temiz PBS	5 dakika
6	Süper Blok (V-Blok)	7 dakika
7	Distile su, PBS	bekletme
8	Primer antikor	1 saat
9	Distile su, PBS'de yıka ve temiz PBS	5 dakika
10	Sekonder antikor	20 dakika
11	Distile su, PBS'de yıka ve temiz PBS	5 dakika
12	Streptavidin Peroxidase	20 dakika
13	Distile su, PBS'de yıka ve temiz PBS	5 dakika
14	ABC kromojen	15 dakika
15	Distile su	5 dakika
16	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	3 dakika
17	Akarsu	1 dakika
18	Amonyaklı su	1-2 saniye
19	Distile su	1-2 saniye
20	Kurulama	
21	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Bu işlemlerden geçirilerek boyanan testis doku kesitleri Olympus DP72 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak hücre sitoplazmalarında gözlenen Bax boyanmasının şiddeti 0'dan +3'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Bax boyanma şiddetinin derecelendirilmesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+ 1	Minimal şiddette
+ 2	Orta
+ 3	Belirgin

2.8. Apoptoz Tayini

2.8.1.TUNEL Yöntemi

Apoptoz tayini için in situ DNA uç işaretleme yöntemi kullanıldı ve kit içerisinde önerilen aşağıdaki işlem sırasıyla uygulandı (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Peroksidase kit, S7101-KIT, Chemicon).

1) Parafin giderme ve suya indirme: Doku kesitleri, 2x5 dk toluol, 2x5 dk absolü alkol, 3 dk %95 alkol, 3 dk %70 alkol'de bekletildi ve 5 dk PBS ile çalkalandı.

2) Proteinlerin sindirilmesi: Kesitler Proteinaz K (20µg/ml) ile oda ısısında 15 dk inkübe edildi.

3) 2x2 dk distile su ile çalkalandı.

4) Endojen peroksidazın maskelenmesi: Kesitler PBS ile hazırlanmış %3 H_2O_2 ile 5 dk oda ısısında muamele edildi.

5) PBS ile 2x5 dk yıkandı.

6) Dengeleme tamponu: Lamların etrafı dikkatlice kurulanıp, kesitlerin üzerine 75µl dengeleyici tampon konulup, plastik lameller ile kapatıldı. 30 dk oda ısısında inkübe edildi.

7) Tdt enziminin uygulanması: Plastik lameller kaldırılıp etrafı kurulandı ve her lam üzerine 55µl Tdt enzimi konuldu ve plastik lameller ile kapatıldı. Nemli ortamda 37 ˚C etüvde 1 saat inkübe edildi.

Negatif kontrol olarak kullanılan kesitin üzerine Tdt enzimi yerine distile su damlatıldı

8) Durdurma/ Yıkama: Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dk yıkandı.

9) PBS ile 3x5 dk yıkandı.

10) Anti-Digoksigenin-Peroksidaz: Her kesit üzerine 65µl Anti-Digoksigenin-Peroksidaz konuldu ve üzerlerine plastik lameller tekrar kapatılarak oda ısısında 30 dk bekletildi.

11) Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler PBS ile 3x5 dk yıkandı.

12) Renk reaksiyonu: Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra her kesit üzerine 75µl DAB (diaminobenzidine) substrat solusyonu damlatıldı. 3-6 dk arasında pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında tespit edildi.

13) Renk reaksiyonu oluşmasından sonra kesitler distile su ile 3x1 dk yıkandı

14) Kesitler distile su ile 5 dk tekrar yıkandı.

15) Zıt Boya Uygulaması: Kesitler metil yeşili ile 1 dk. boyandı ve distile suda boyama durduruldu.

16) Fazla boyanın giderilmesi amacıyla kesitler 2x10 sn. %100 alkol ile ardından 30 sn tekrar %100 alkol ile çalkalandı.

17) Kapatma: Kesitler 2x2 dk. toluolde tutuldu. Toluolden çıkarıldıktan sonra entellan yapıştırıcı maddesi kullanarak kapatıldı.

Uygulama esnasında hazırlanması gerekli solüsyonlar:

% 3 H_2O_2: *3 ml H_2O_2 / 27 ml PBS= 30 ml*

Tdt: 77 µl Reaksiyon Tamponu + 33 µl Tdt Enzimi =110 µl

DAB Substrat: 147 µl DAB Dilüsyon solüsyonu + 3 µl DAB Substratı= 150µl

Durdurma/Yıkama tamponu: 1ml yıkama solüsyonu + 34 ml distile su = 35ml

Boyama Özgüllüğü Kontrolleri:

1- Pozitif kontrol olarak, 5 mg/kg dozunda Deksametazon uygulanmış erişkin sıçana ait timus dokusu ve kit içinden çıkan doku kesiti kullanıldı.

2- Negatif kontrol olarak kullanılan kesitin üzerine Tdt enziminin uygulandığı aşamada Tdt enzimi yerine distile su damlatıldı.

2.8.2. Apoptotik İndeks

Tüm gruplara ait deney hayvanlarının testis doku kesitlerinde apoptoz tayini için TUNEL boyaması uygulandı. Doku kesitlerinde ayrıca apoptotik indeksin tespiti, Olympus marka ışık mikroskobunda 40'lık büyütmede rastgele seçilen 10 tane seminifer tübülde pozitif olarak işaretlenen apoptotik çekirdekler sayılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı.

Apoptotik İndeks (APOİ)= Apoptotik çekirdek sayısı/ Toplam hücre sayısı x 100 (Tunçdemir ve Öztürk 2008).

2.9. Plazma Testosteron seviyesinin ölçülmesi

Deneyin sonunda ratlar Ketalar-Rompun ile anestezi edilerek disekte edildi ve kalplerinden alınan kan örnekleri antikoagulanlı steril tüplere aktarıldı. Kan örnekleri 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Üstte kalan serum eppendorf tüpe alındı ve çalışma zamanına kadar -80˚C' de saklandı. Testosteron düzeyleri testosteron kiti (Siemens, Advia) ve aynı marka cihazla kemiluminesan yöntemi ile ölçüldü.

2.10. İstatistiksel Yöntemler

Tüm gruplardaki hayvanların vücut ağırlık, testis ağırlık indeksi, Johnsen kriteri, bax ve tunel immunreaksiyonunun istatiksel olarak değerlendirmesinde GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden değerlerin karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA ve gruplar arası farklılıkta TUKEY testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi $p<0.05$ olarak seçildi.

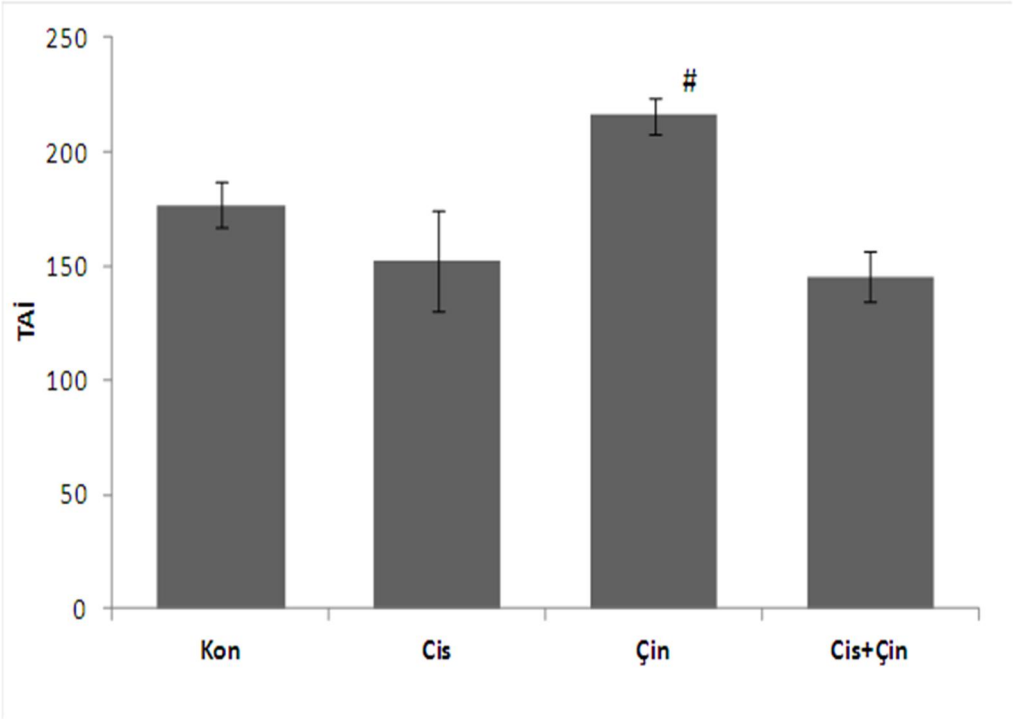
3. BULGULAR

3.1. Vücut Ağırlığı Farkı

Araştırmanın başlangıcında ve deney süreci sonunda olmak üzere; Kon, CP, Zn ve CP+Zn deney grubundan oluşan sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Bu sonuçlara göre, sadece CP+Zn ile Zn grubunun deney sonrası vücut ağırlrklarında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,023$, $p< 0,05$). Grup içi kıyaslamalarda ilk ölçüm ve son ölçümler arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,8211$, $p>0,05$).

3.2. Testis Ağırlık İndeksi

Gruplara göre TAİ'lere ilişkin bulgular şekil 3.1'de görülmektedir. İstatistiksel karşılaştırmada TAİ bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,01$, $p<0,05$). Gruplar karşılaştırıldığında ise CP ve Zn grubu ($p<0,05$), Zn ve CP+Zn grubu ($p<0,01$) arasında anlamlı bir fark saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 3.1. Testis Ağırlık İndeksi Ortalamaları *, Kon ile # ise CP ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ seviyesindeki istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (Kon, n=6; CP, n=6; Zn, n=6; CP+Zn, n=6).

3.3. Işık Mikroskobik Bulgular

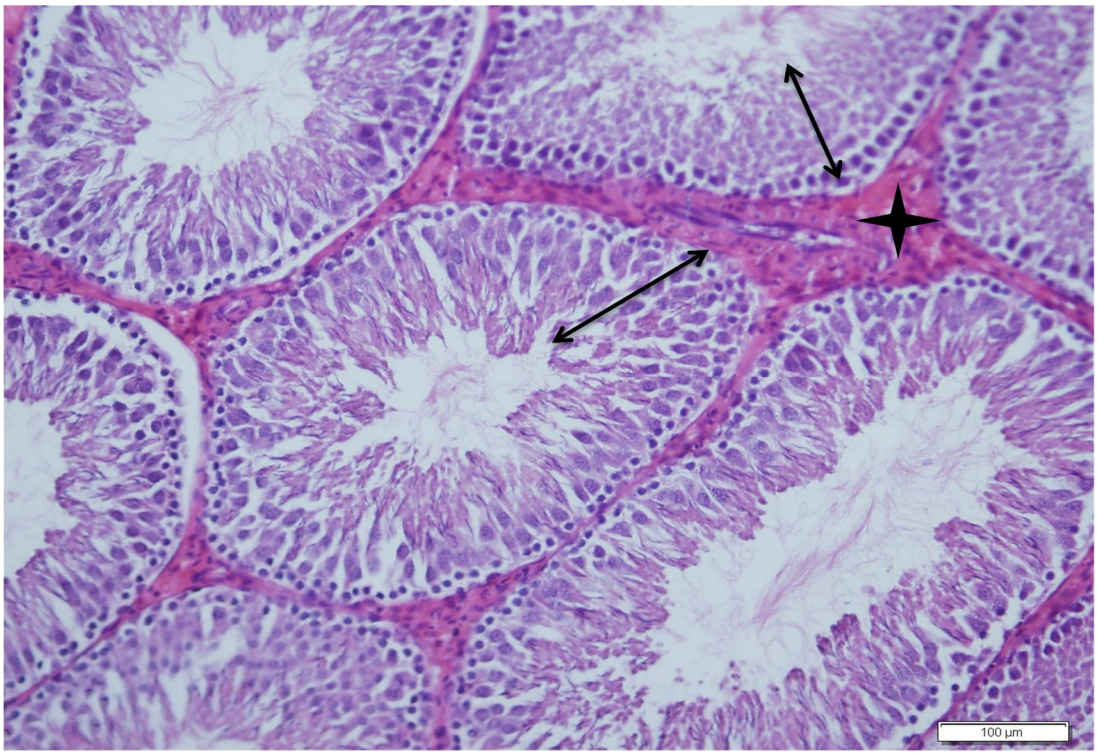
Işık mikroskobik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinde genel görünümü saptamak için Hemotoksilen-Eosin (H-E) boyası ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trichrom boyası yapıldı.

Kon grubunun; testis kesitlerinde seminifer tübül sınırların düzgün olduğu, tübül germ hücrelerinin düzenli bir organizasyon içerisinde normal görünümde bulundukları spermatogonyumdan başlayarak spermiyogenezin tüm evrelerindeki germ hücrelerinin normal görünümde olduğu saptandı. Gelişmekte olan spermatozoonlar klasik görüntülerindeki gibi kuyruk lümende, baş tübül duvarına yönelik, Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş durumdaydı. İnterstisyel aralıktaki Leydig hücrelerinin, daha küçük çekirdekli makrofajların ve damarların normal yapılarını korudukları tesbit edildi (Resim 3.1, 3.2, 3.3).

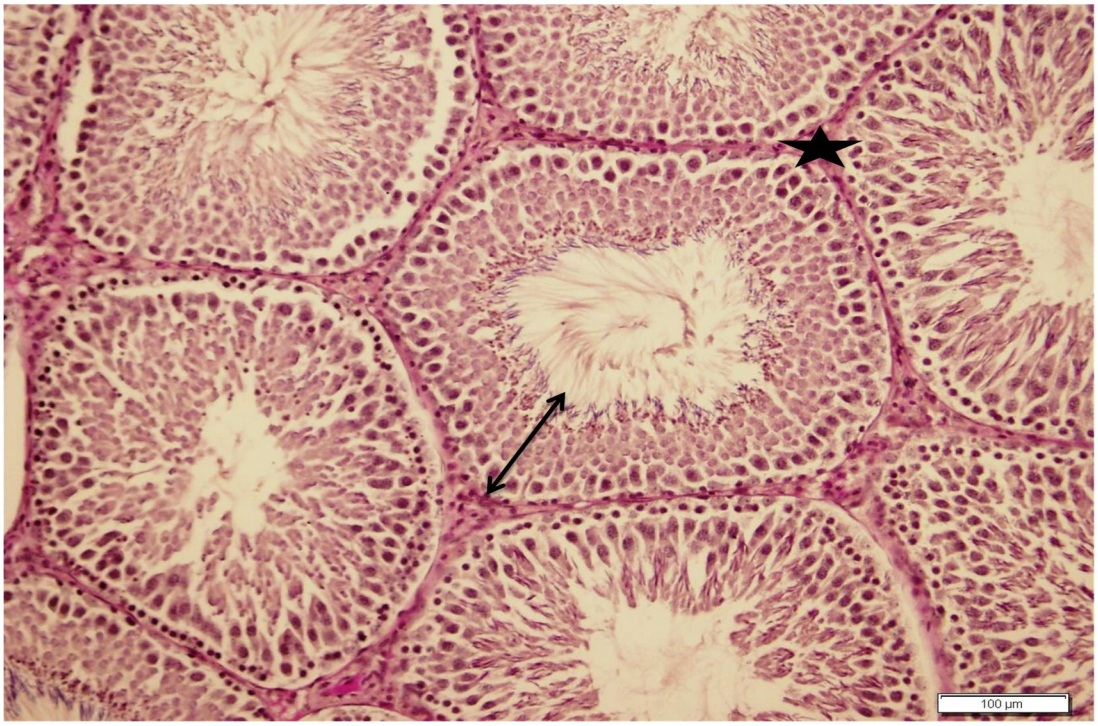
CP grubunun; ışık mikroskobik incelemelerinde ise testis dokusunda dejeneratif etkinin belirgin olduğu gözlemlendi. Bu grupta; germ hücrelerinde sıralama bozukluğu, sertoli ve spermatogonyumların bazal membrandan ayrıldığı, tüm epitel duvarı boyunca hücreler arası mesafenin arttığı, lümene yakın hücrelerde özellikle spermatidlerde kromatin yoğunlaşması, parçalanması ve Leydig hücrelerinin sayısında azalma gözlemlenmiştir. Tübül duvarında, gerek ana hücreler gerekse spermatogenezin hiç bir evresi ayırt edilemiyordu. Büyük büyültmelerde hücrelerin bazal laminadan ayrı veya lümene dökülmüş oldukları gözlendi (Resim 3.4, 3.5, 3.6).

Zn grubunun ışık mikroskobik incelenmesinde ise, gerek bazal lamina ve gerekse seminifer tübül yapıları kontrol grubuna benzer bir yapı gösteriyordu (Resim 3.7, 3.8).

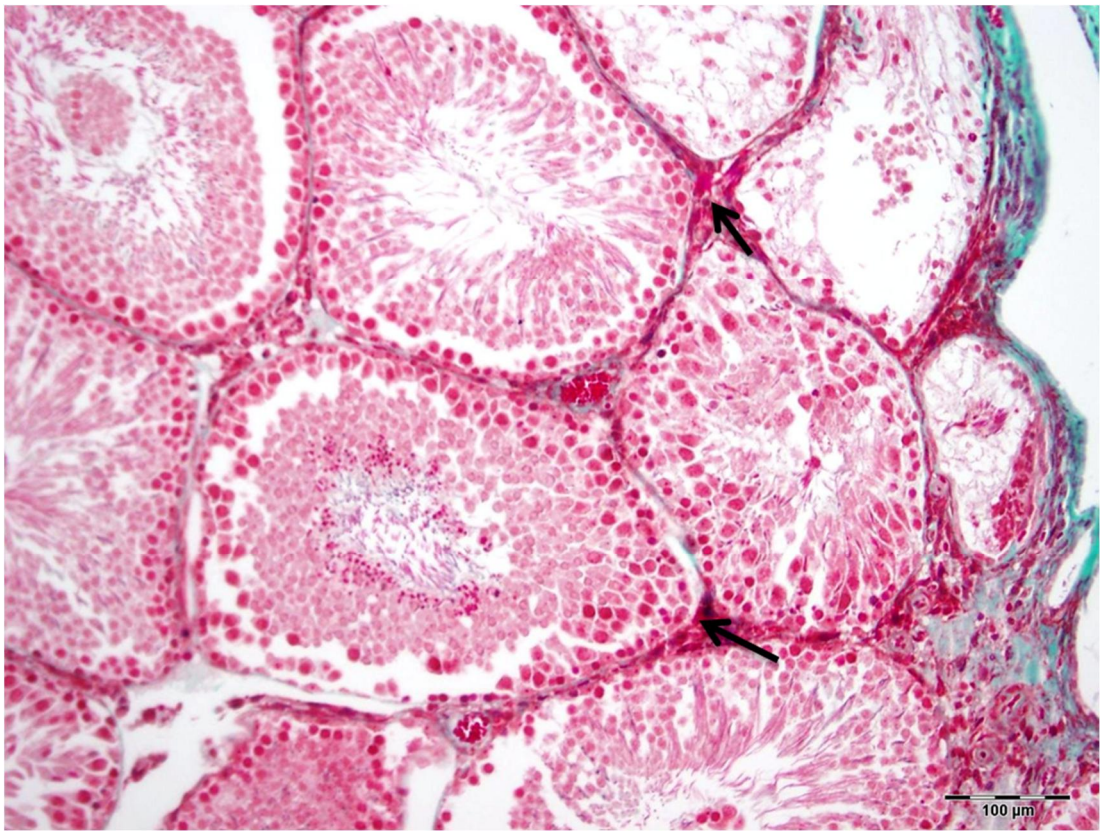
CP+Zn grubunda ise, gerek bazal lamina ve gerekse seminifer tübül yapıları kontrol grubuna hemen hemen benzer bir yapı gösteriyordu. Sisplatin grubuna göre; korunmuş spermatogenik hücreler, düzgün seminifer tübül yapısı gözlendi. Bazı tübüllerde epitel hücreleri arasında az da olsa vakuollü görünüme rastlandı. İnterstisyel aralıkta dejenerasyonun devam ettiği gözlemlenmiştir (Resim 3.9, 3.10, 3.11).



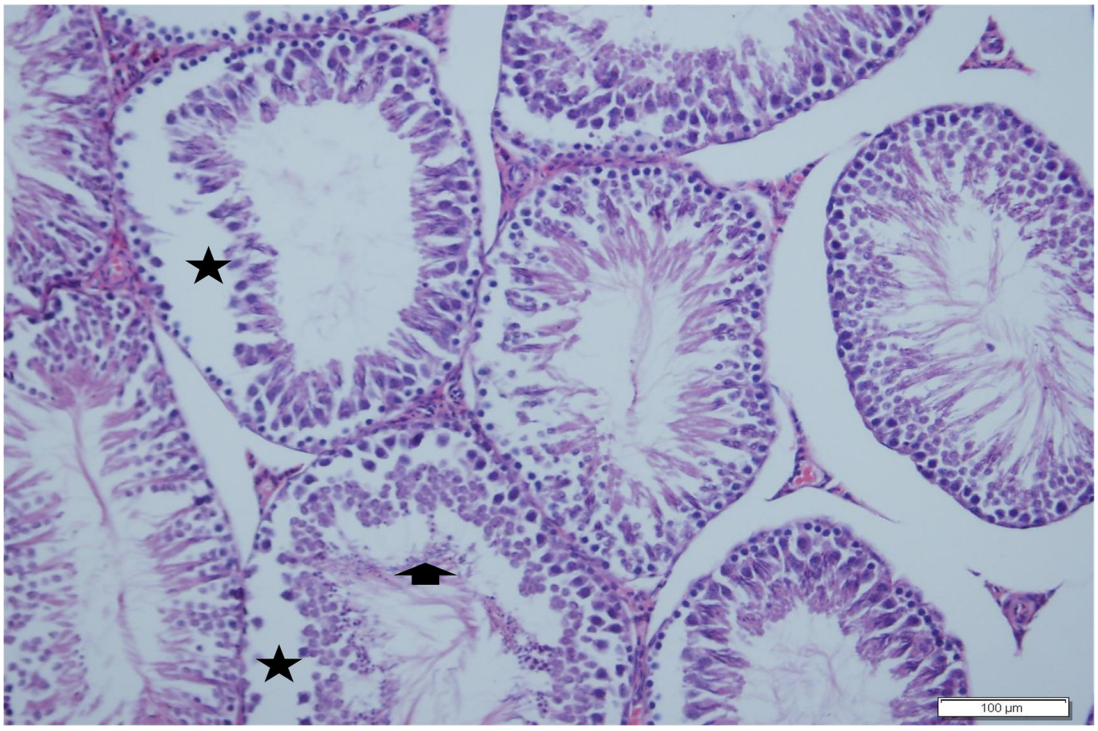
Resim 3.1. Kontrol grubuna ait testis kesitinde normal seminifer tübül yapısı; (✦) interstisyel aralık, (⟷) spermatogenik hücreleri göstermektedir, H.E boyası.



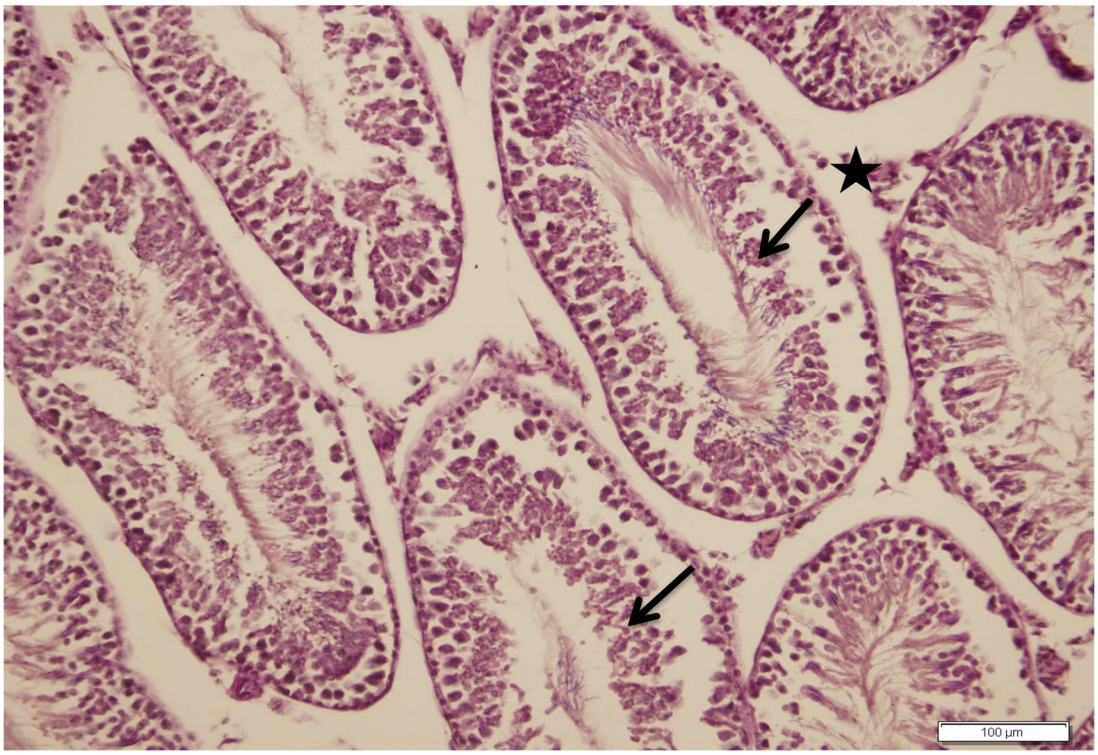
Resim 3.2. Kontrol grubuna ait testis kesitinde normal seminifer tübül ve intersitisyel aralık;(★) interstisyel aralık, (⟷) spermatogenik hücreleri göstermektedir, PAS boyası.



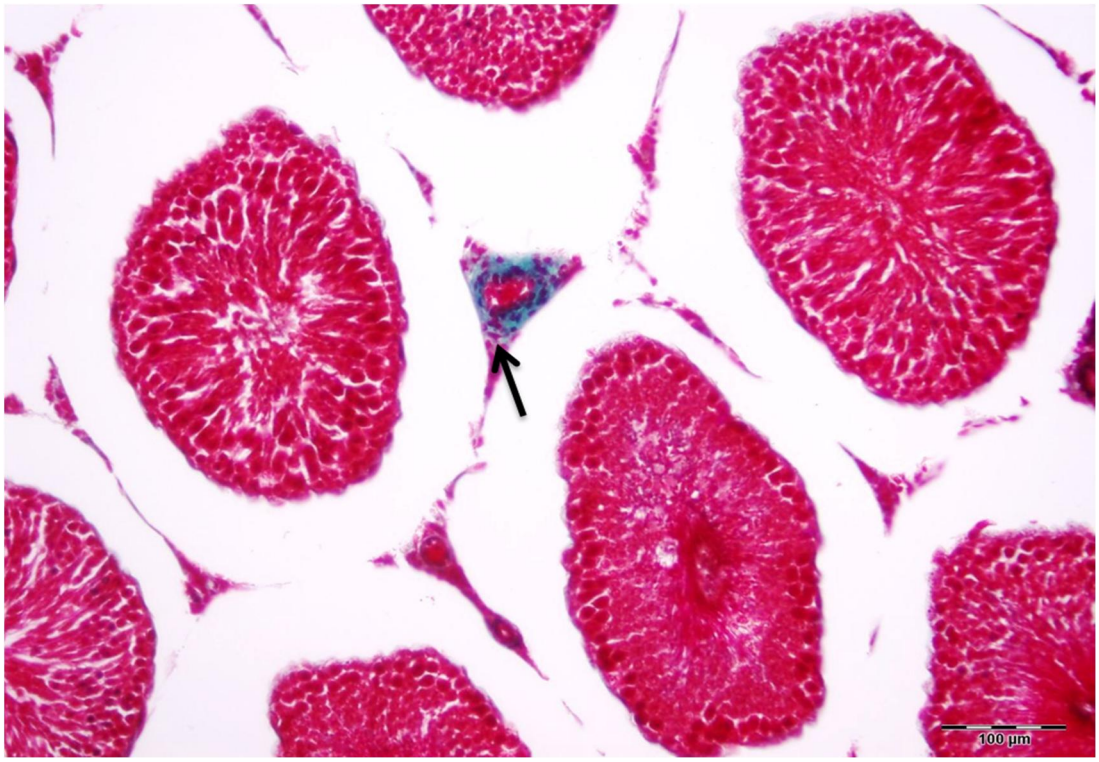
Resim 3.3. Kontrol grubuna ait testis kesitinde normal seminifer tübül ve interstisyel aralık; (→) seminifer tübüllerin etrafını saran bağ dokusu tabakası, Masson'un Trikrom boyası.



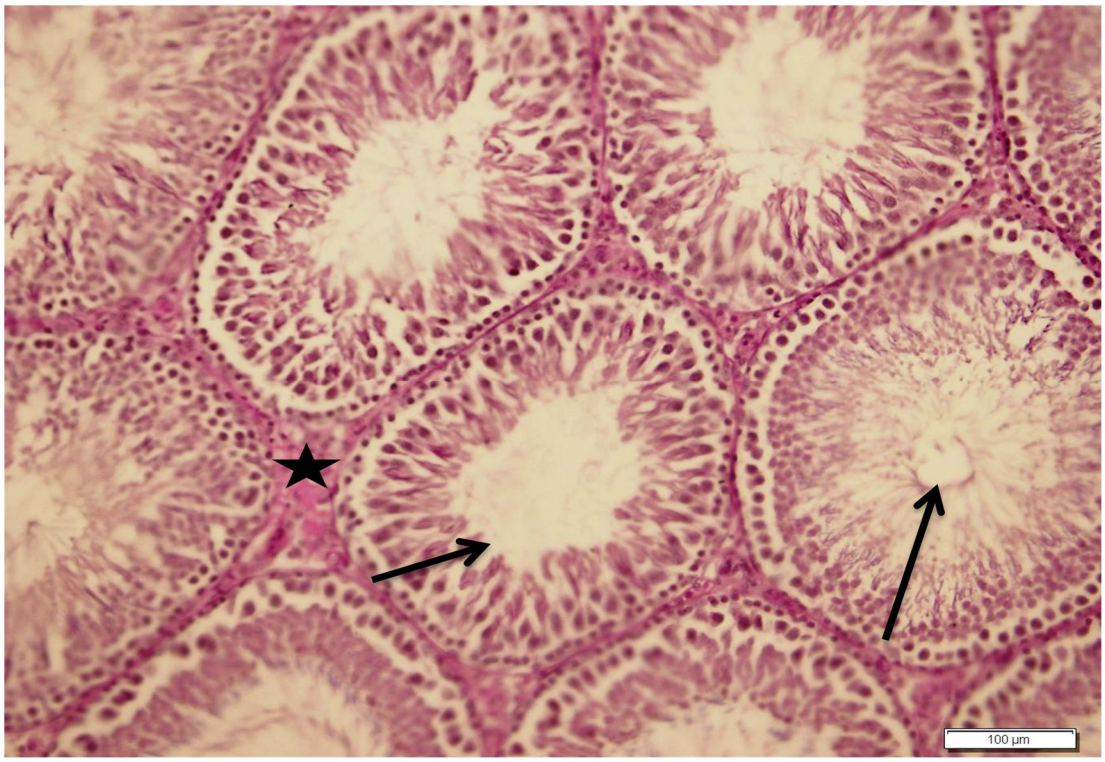
Resim 3.4. Sisplatin grubuna ait testis kesiti; (★) dejenere spermatogenik hücreler, (⬆) lümene dökülmüş hücreleri göstermektedir, H.E boyası.



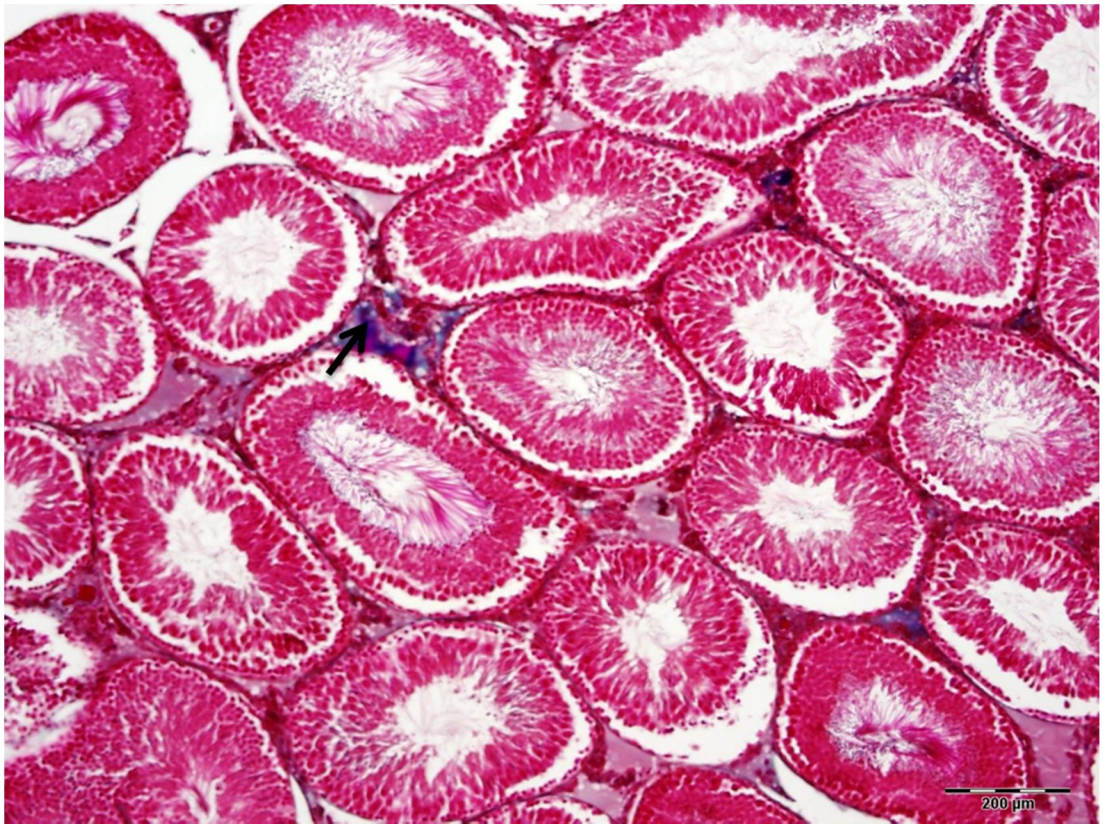
Resim 3.5. Sisplatin grubuna ait testis kesiti; (↙) germ hücrelerindeki sıralanma bozukluğuna bağlı olarak tüm epitel duvarı boyunca artan hücreler arası mesafe, (★) dejenere olmuş interstisyel aralığı göstermektedir, PAS boyası.



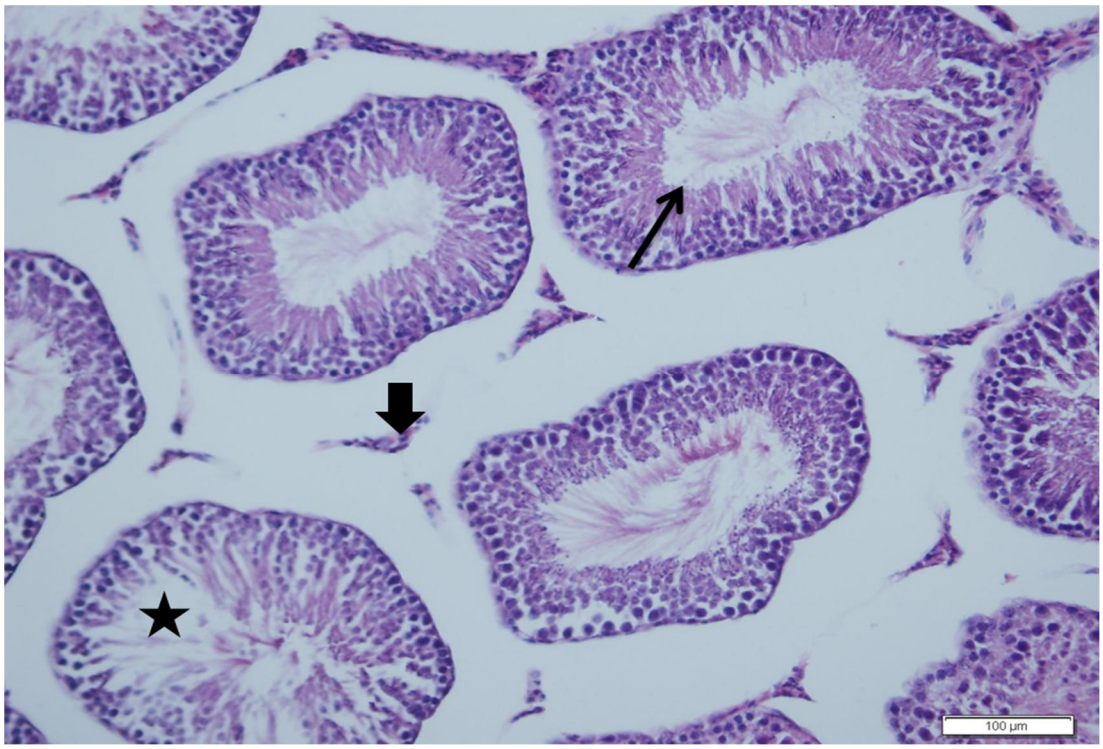
Resim 3.6. Sisplatin grubuna ait testis kesitinde (↙) incelmiş ve yer yer düzensiz görünüme sahip bağ dokusunu göstermektedir, Masson'un Trikrom boyası.



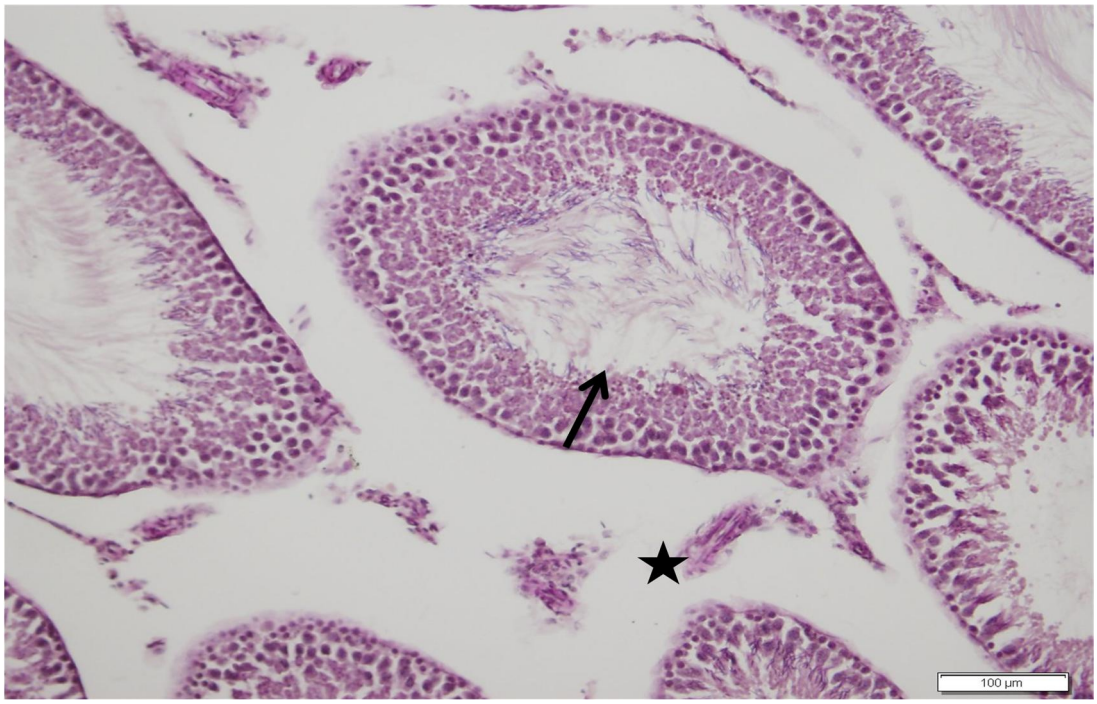
Resim 3.7. Çinko grubuna ait testis kesiti; (★) normal interstisyel aralık,(➔) düzenli spermatogenik hücreler, PAS boyası.



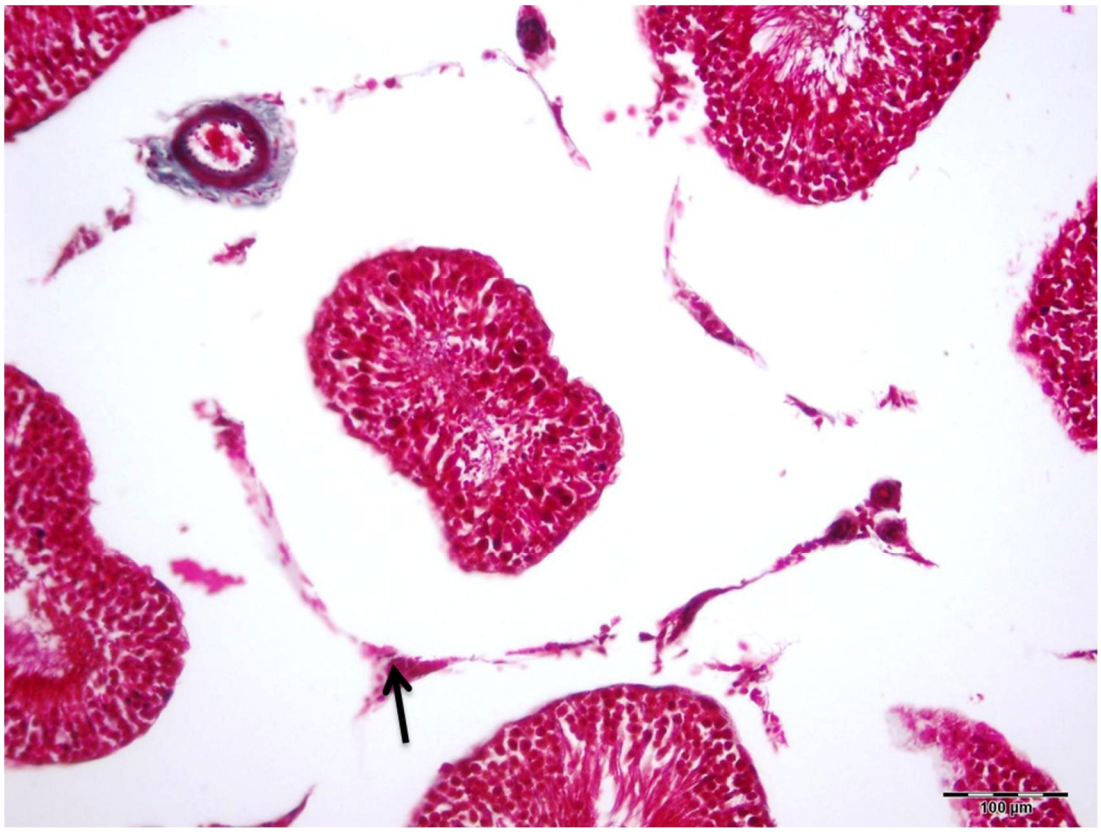
Resim 3.8. Çinko grubuna ait testis kesiti; (➔) seminifer tübülü saran düzenli bağ dokusunu göstermektedir, Masson'un Trikrom.



Resim 3.9. Sisplatin+ Çinko grubu testis kesiti; (★) epitel hücreleri arasındaki vakuol, (↗) spermatogenik hücreler ve (⬇) dejenere interstisyel aralığı göstermektedir, H.E boyası.



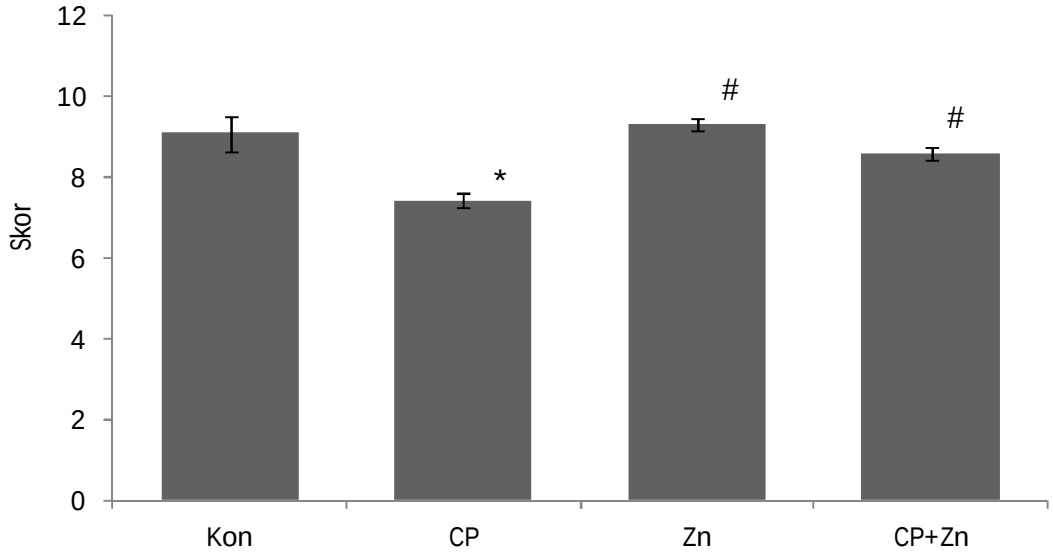
Resim 3.10. Sisplatin+ Çinko grubu testis kesiti; (★) dejenere interstisyel aralık ve (↗) spermatogenik hücreler, PAS boyası.



Resim 3.11. Sisplatin+ Çinko grubu testis kesiti; (↗) seminifer tübül etrafındaki bağ dokusunda dejenerasyon devam etmekte, Masson'un Trikrom boyası.

3.4. Histopatolojik Bulgular

Seminifer tübül duvarındaki spermatogenez Johnsen skoruna göre değerlendirildi. Kon grubuna ait örneklerde ortalama değer 9,10 olarak bulunurken, CP'de 7,43, Zn'da 9,30 ve CP+Zn grubunda ise 8,58 olarak bulundu.



Şekil 3.2. Johnsen Skoru *, Kon ile # ise CP ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ seviyesindeki istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (Kon, n=6; CP, n=6; Zn, n=6; CP+Zn, n=6).

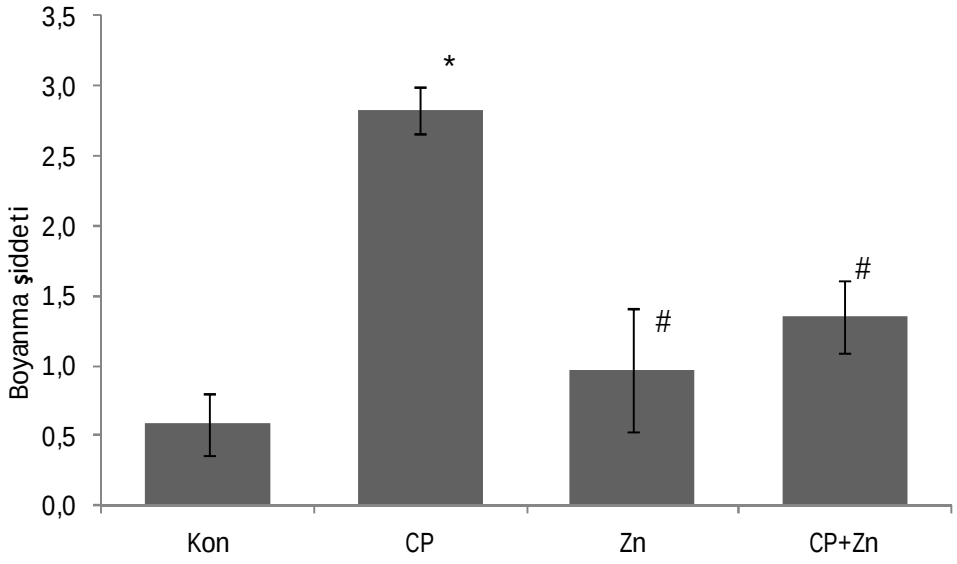
İstatistiksel olarak gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark vardı ($p<0,003$). Seminifer tübüllerde en fazla hasar CP grubunda gözlemlendi ve kon grubu ($p<0,01$), Zn grubu ($p<0,001$) ve CP+Zn grubu ($p<0,05$) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulundu (Şekil 3.2).

3.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda, apoptozis'in varlığını ortaya koymak için her dört gruba ait testis doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal Bax boyaması gözden geçirildi. Bax proteininin testis dokusunda görünür hale getirilerek incelenmesi için yapılan bu boyamada, saptanan reaksiyonun yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı.

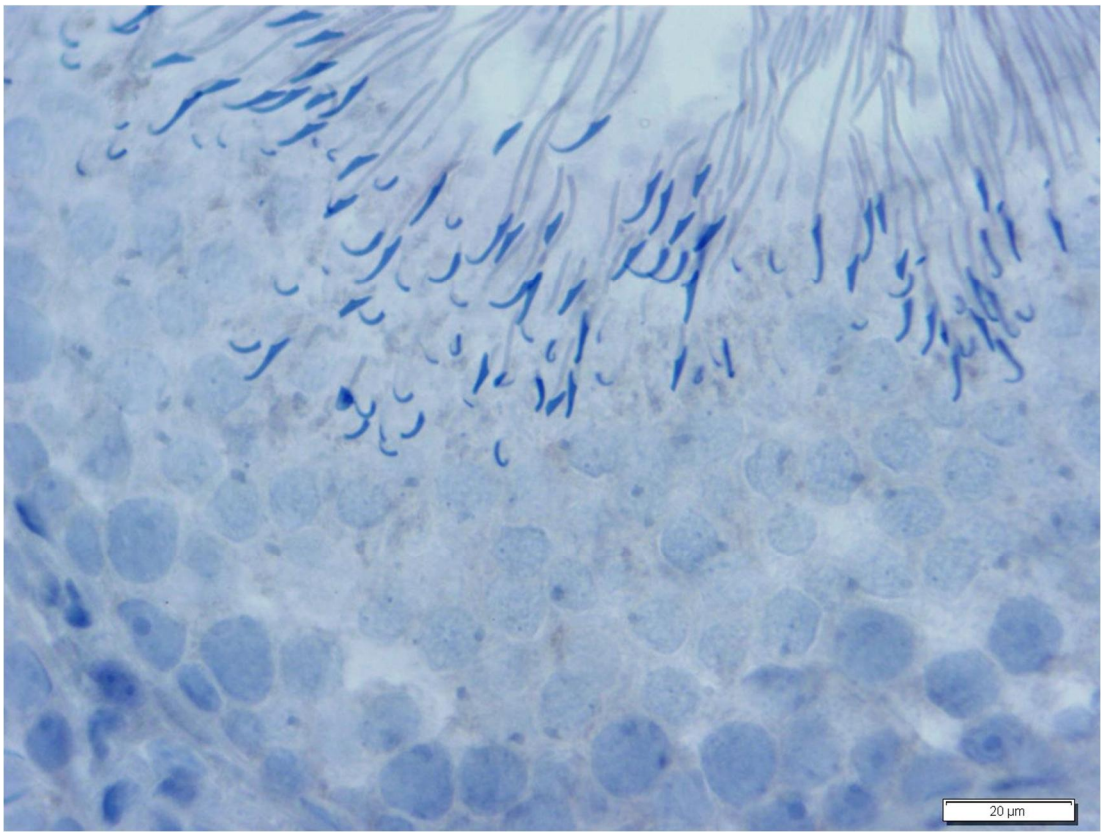
3.5.1. BAX Boyanmasının Değerlendirilmesi

Bax boyanmış testis kesitleri incelendiğinde, tubül duvarındaki spermatogenik hücrelerden spermatogonyumlarda en fazla, Leydig hücrelerinde ise daha az sitoplazmik boyanmanın olduğu görüldü. Kon grubunda Bax boyanmasının olmadığı (0,5) (Resim 3.12, 3.13), CP uygulanan sıçanlarda ise belirgin bir boyanma (+2,8) olduğu görüldü (Resim 3.14, 3.15). Zn grubunda (Resim 3.16) ise Kon grubuna benzer boyanmanın olduğu (0,9) ve CP+Zn grubunda ise minimal (+1,3) Bax boyanmasının olduğu görüldü (Resim 3.17, 3.18).

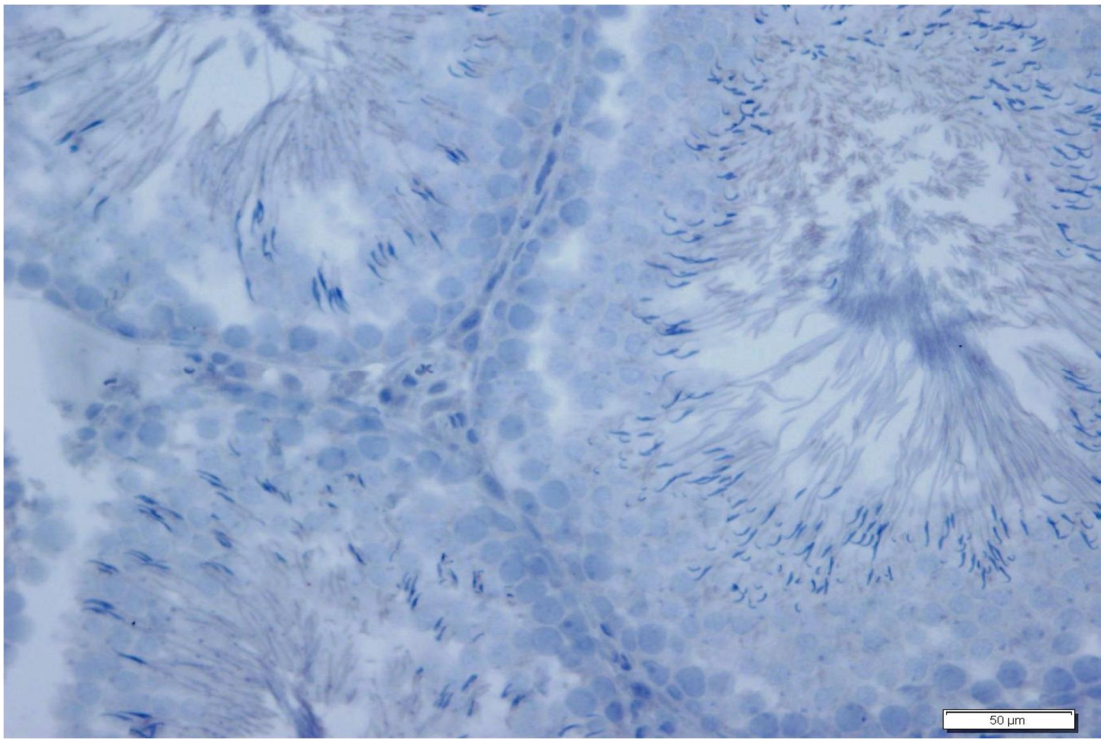


Şekil 3.3. Bax boyanma şiddeti *, Kon ile # ise CP ile karşılaştırıldığında p<0,05 seviyesindeki istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (Kon, n=6; CP, n=6; Zn, n=6; CP+Zn, n=6).

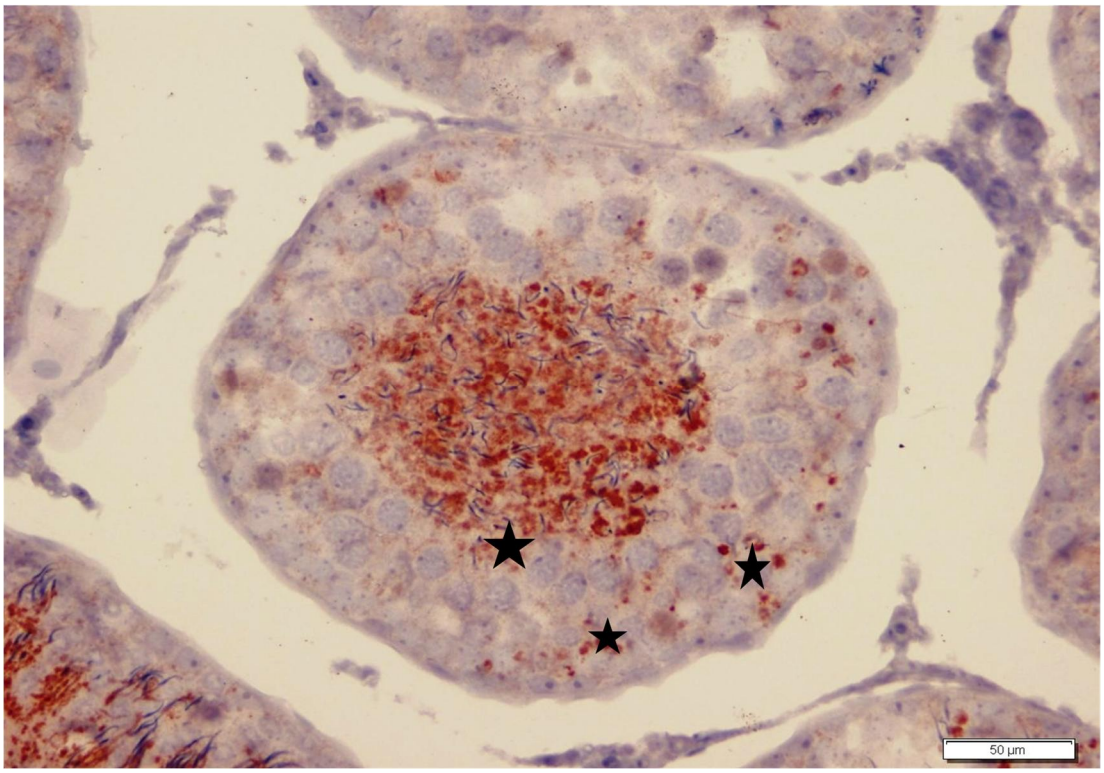
Bax boyanma şiddeti bakımından gruplar istatistiki açıdan karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulundu (p= 0,003). Kon ve CP grubu arasında (p<0,001), CP ve Zn arasında (p<0,001) ve CP ve CP+Zn grubu arasında (p<0,01) anlamlı bir fark bulundu (Şekil 3.3).



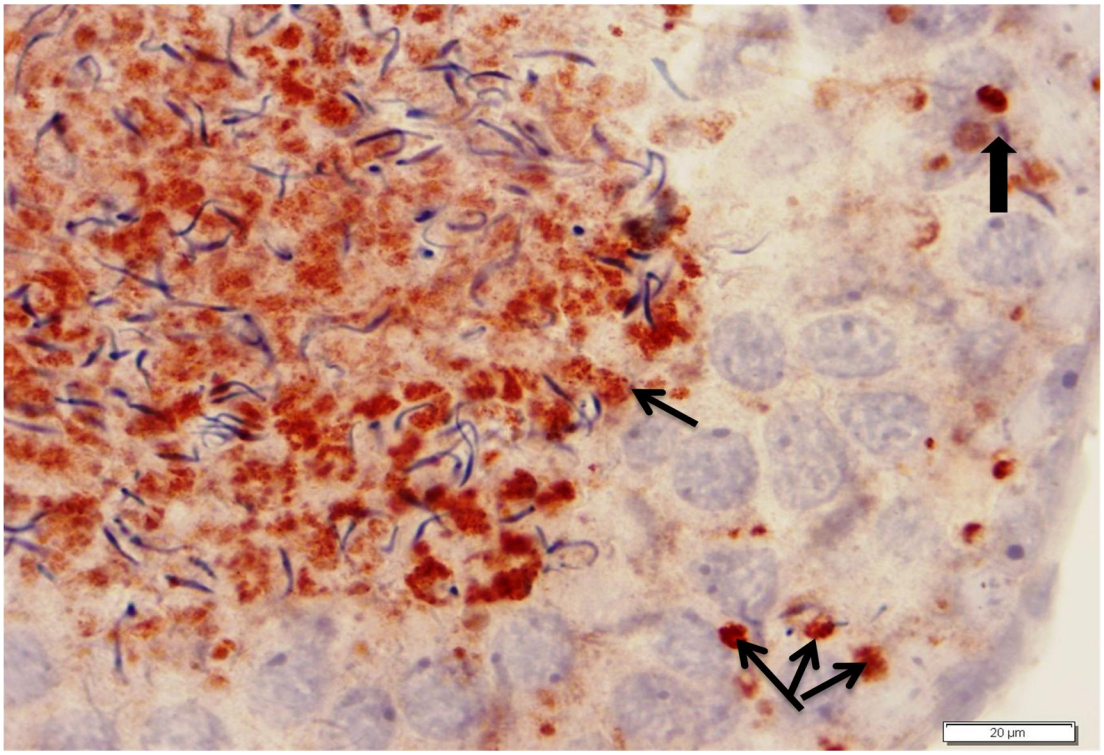
Resim 3.12. Kontrol grubuna ait seminifer tübül yapısı incelendiğinde, immünohistokimyasal olarak Bax boyanmasının olmadığı görülmektedir.



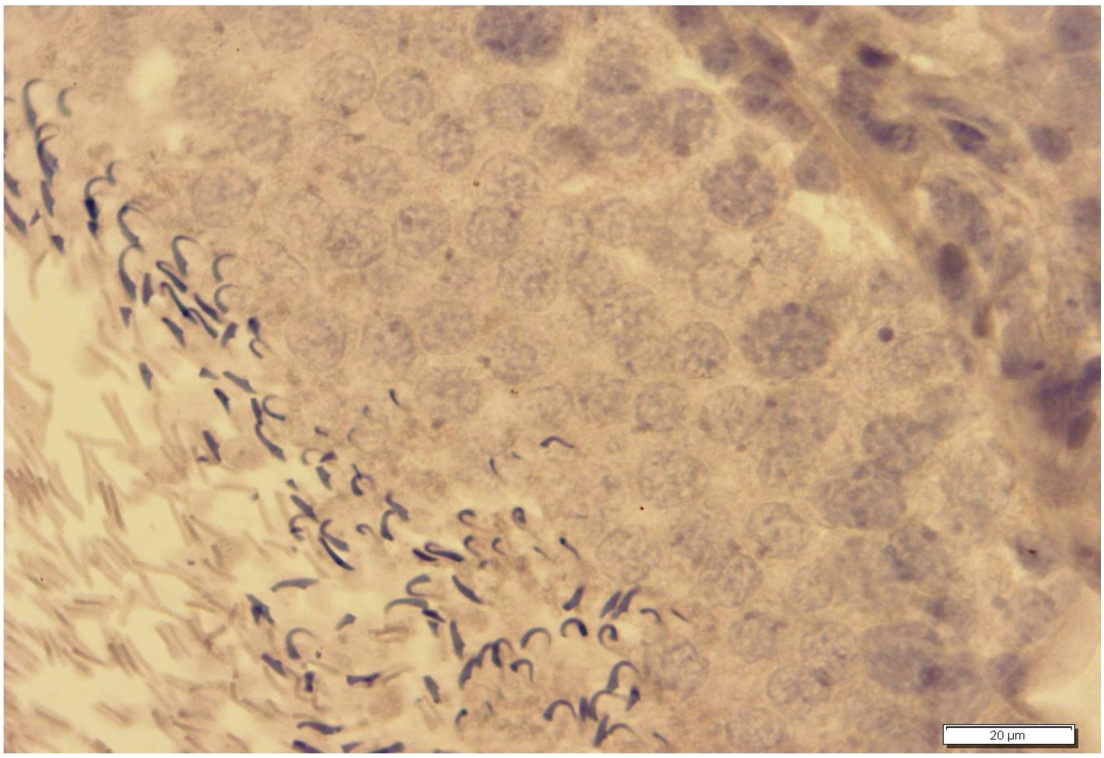
Resim 3.13. Kontrol grubuna ait testis doku kesitinin görünümü. Seminifer tübüller arası interstisyel alanda yer alan Leydig hücre sitoplazmalarında Bax boyanmasının negatif olduğu dikkati çekmektedir.



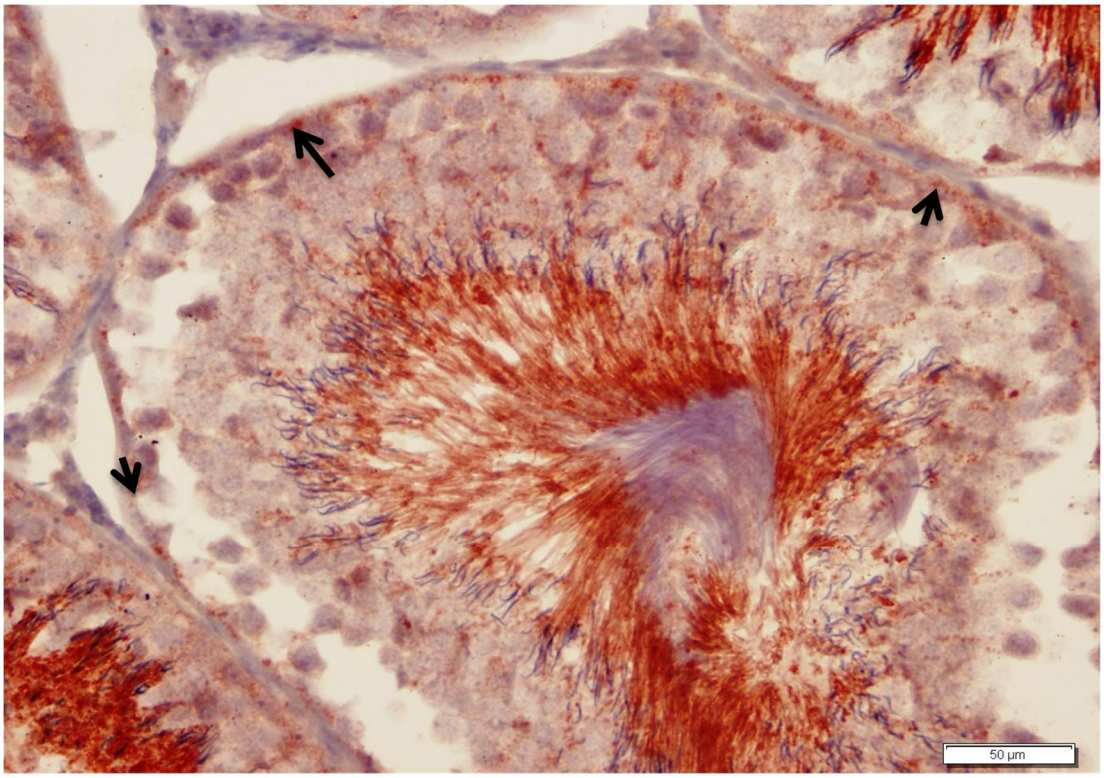
Resim 3.14. Sisplatin grubuna ait testis kesiti; (★) seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücre sitoplazmalarında şiddetli bir Bax boyanmasının olduğu görülmektedir.



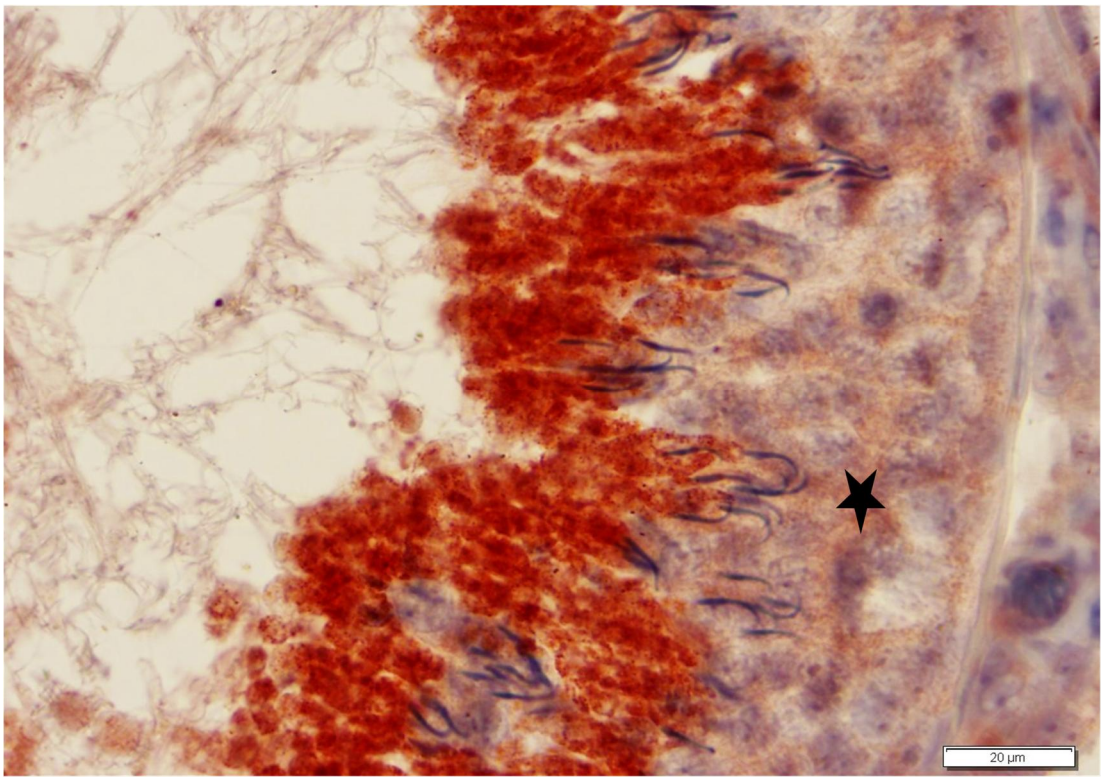
Resim 3.15. Sisplatin grubuna ait seminifer tübül yapısı; (↖) spermatogenik hücre sitoplazmalarındaki şiddetli Bax boyanmasını göstermektedir.



Resim 3.16. Çinko grubuna ait seminifer tübül yapısı; immünohistokimyasal olarak Bax boyanmasının olmadığı görülmektedir.



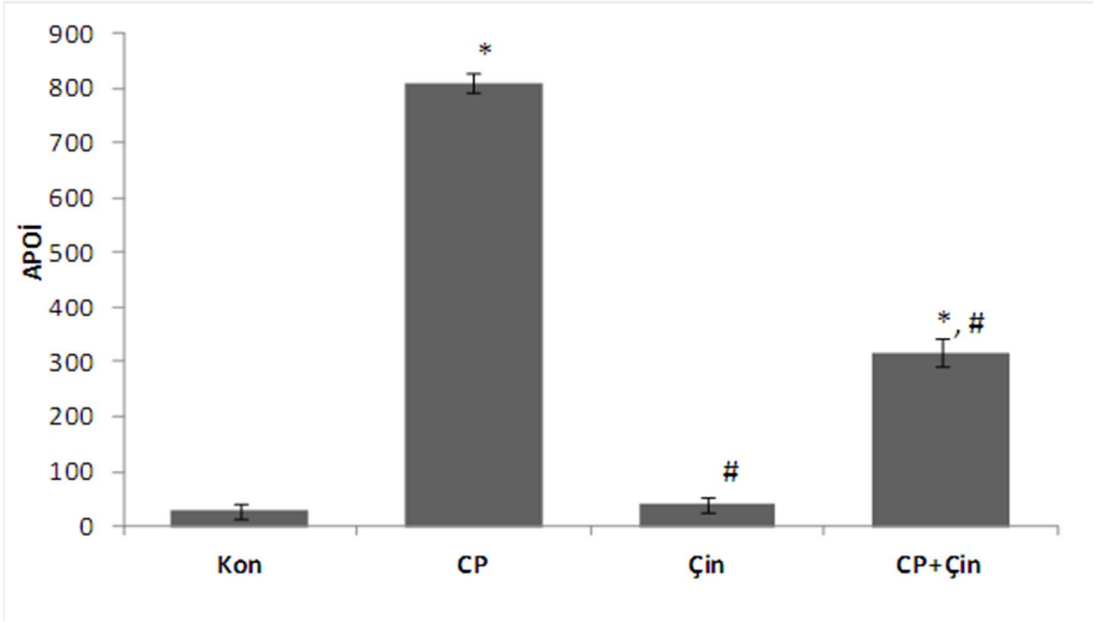
Resim 3.17. Sisplatin+Çinko grubuna ait testis kesiti; (↖) seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücre sitoplazmalarındaki Bax boyanmasını göstermektedir.



Resim 3.18. Sisplatin+Çinko grubuna ait seminifer tübül duvarındaki (★) Bax boyanması

3.5.2. TUNEL Bulguları

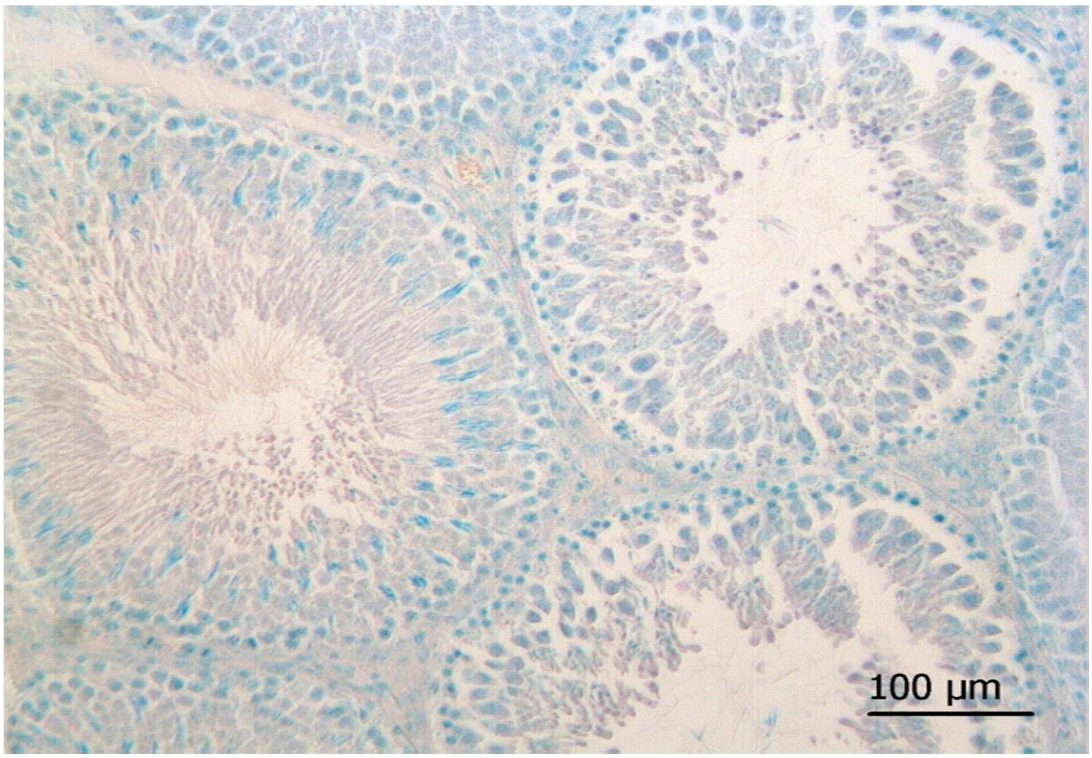
TUNEL yöntemi ile boyama sonucu, nukleusları boyanmış olan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kon grubundaki sıçanların seminifer tübüllerinde gözlenen spontan apoptoz ağırlıklı olarak spermatogonyumlarda ve çok az olarak da spermatositlerde gözlendi ve APOİ'i 28,3 olarak hesaplandı (Resim 3.19). CP grubunda seminifer tübüldeki hemen hemen bütün spermatogenetik seride çok sayıda apoptotik nukleuslara rastlandı ve APOİ'i 806,6 bulundu (Resim 3.20, 3.21). Zn grubunda da kon grubuna benzer bir görüntü vardı ve APOİ'i 40 olarak hesaplandı (Resim 3.22, 3.23). CP+Zn grubunda ise seminifer tübüldeki spermatogenetik seride apoptotik nukleuslara rastlandı fakat; CP grubundaki kadar çok değildi ve APOİ'i 591,6 olarak bulundu (Resim 3.24, 3.25).



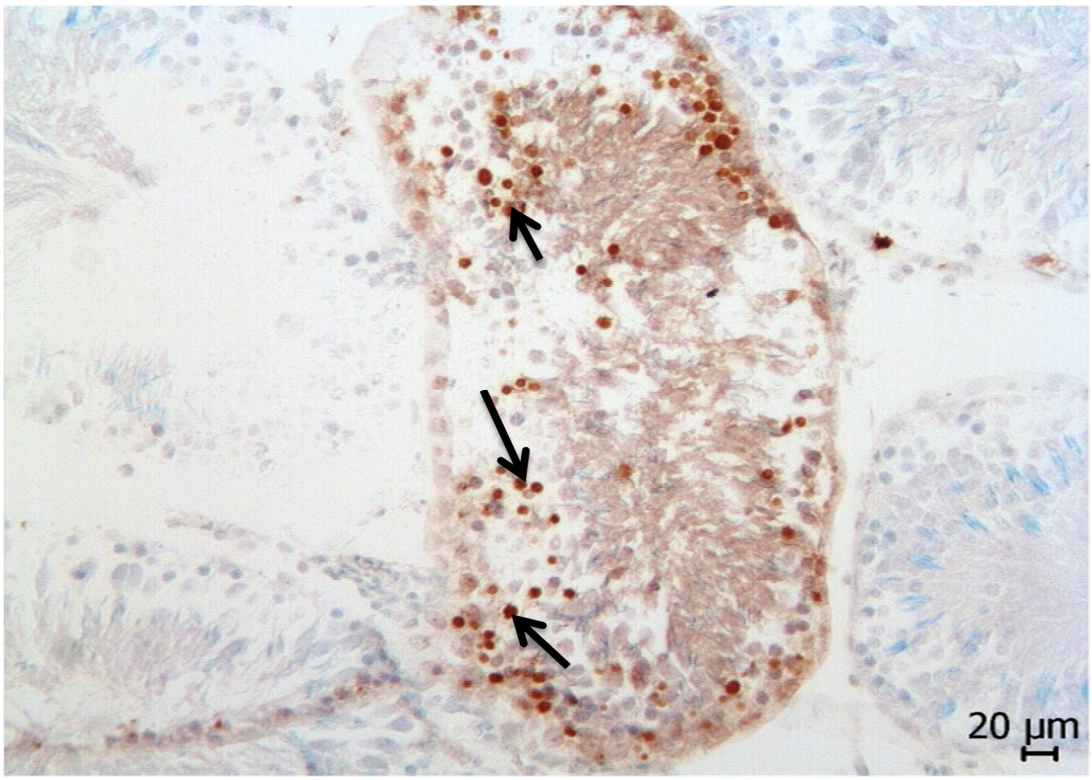
Şekil 3.4. Apoptotik İndeks *, Kon ile # ise CP ile karşılaştırıldığında p<0,05 seviyesindeki istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (Kon, n=6; CP, n=6; Zn, n=6; Cis+Çin, n=6).

CP'li grupta dejeneratif seminifer tübüllerin germ hücrelerinde çok sayıda apoptotik hücre gözlendi ve bu artış kon ve Zn grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edildi (p<0.001). Bu grupta interstisyel alanda nadiren apoptotik hücreler gözlendi.

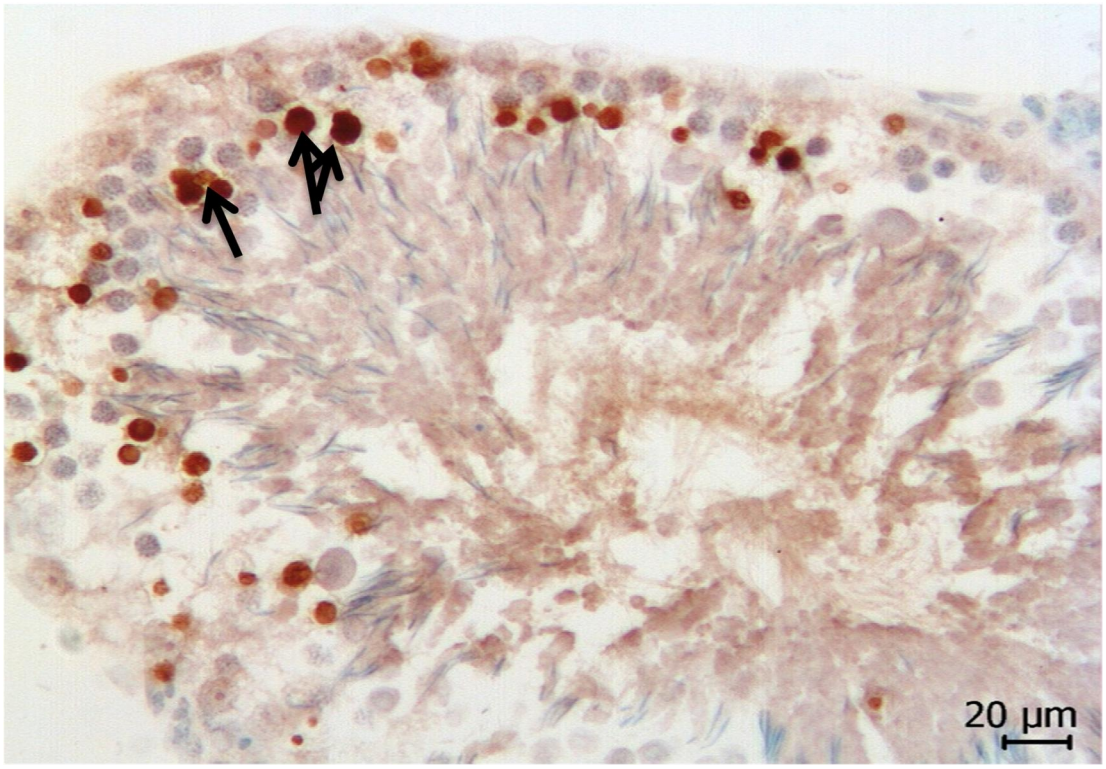
CP+Zn'lu grup CP grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısının azaldığı ve apoptotik hücrelerin daha çok spermatogonyum ve spermatositlerde sınırlı kaldığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak CP ve CP+Zn grubu arasında (p<0,001) ve Zn ve CP+Zn grubu arasında (p<0,001) anlamlı bir fark bulundu (Şekil 3.4).



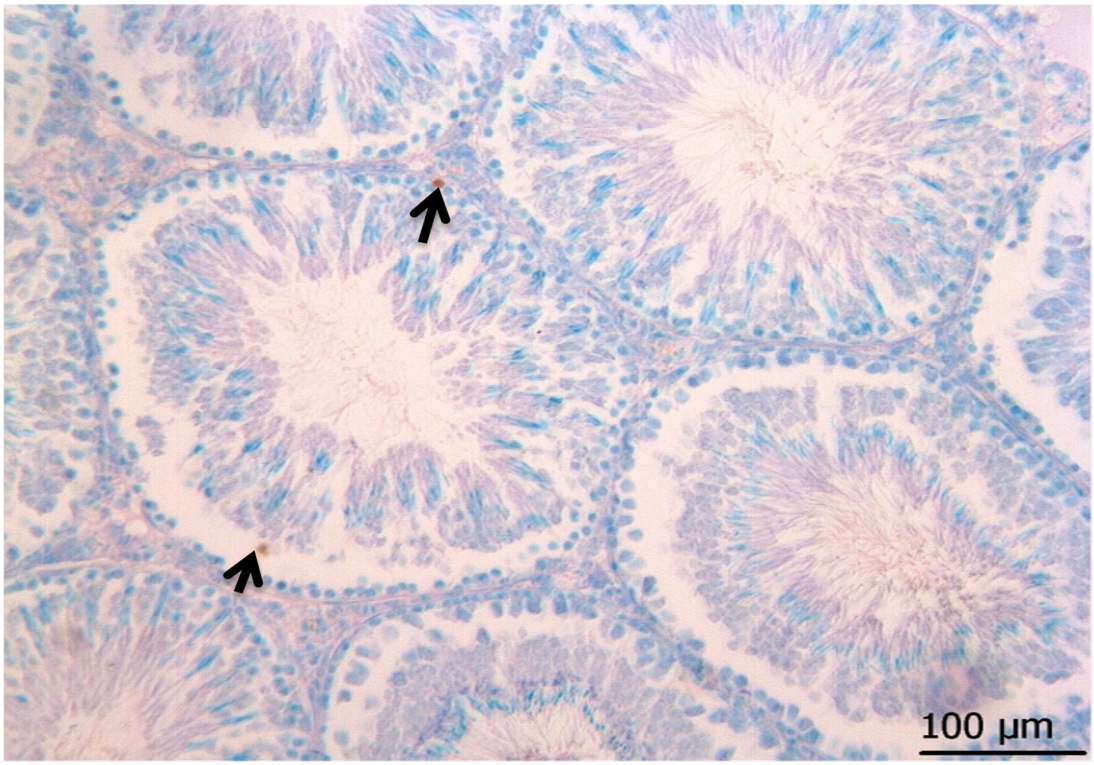
Resim 3.19. Kontrol grubuna ait testis kesiti; seminifer tübül yapısı incelendiğinde TUNEL boyanmasının olmadığı görüldü.



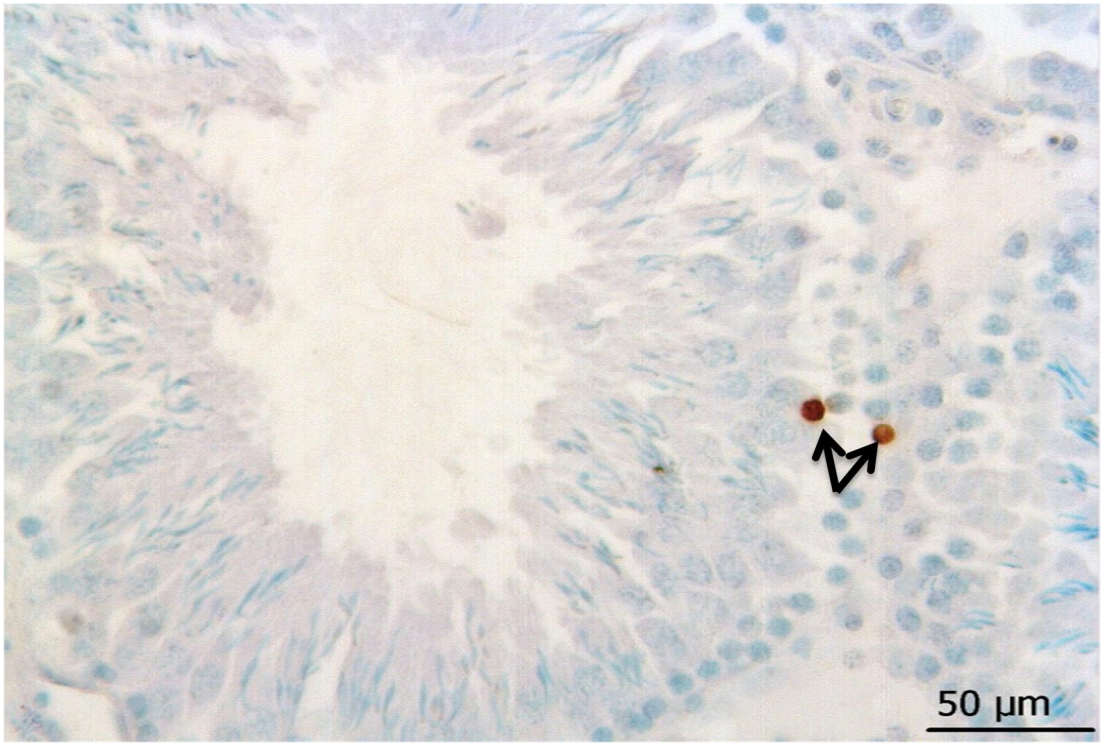
Resim 3.20. Sisplatin grubuna ait seminifer tübül yapısı; spermatogenik hücrelerin hemen hemen hepsinde apoptotik hücreler görüldü (↖), TUNEL metodu.



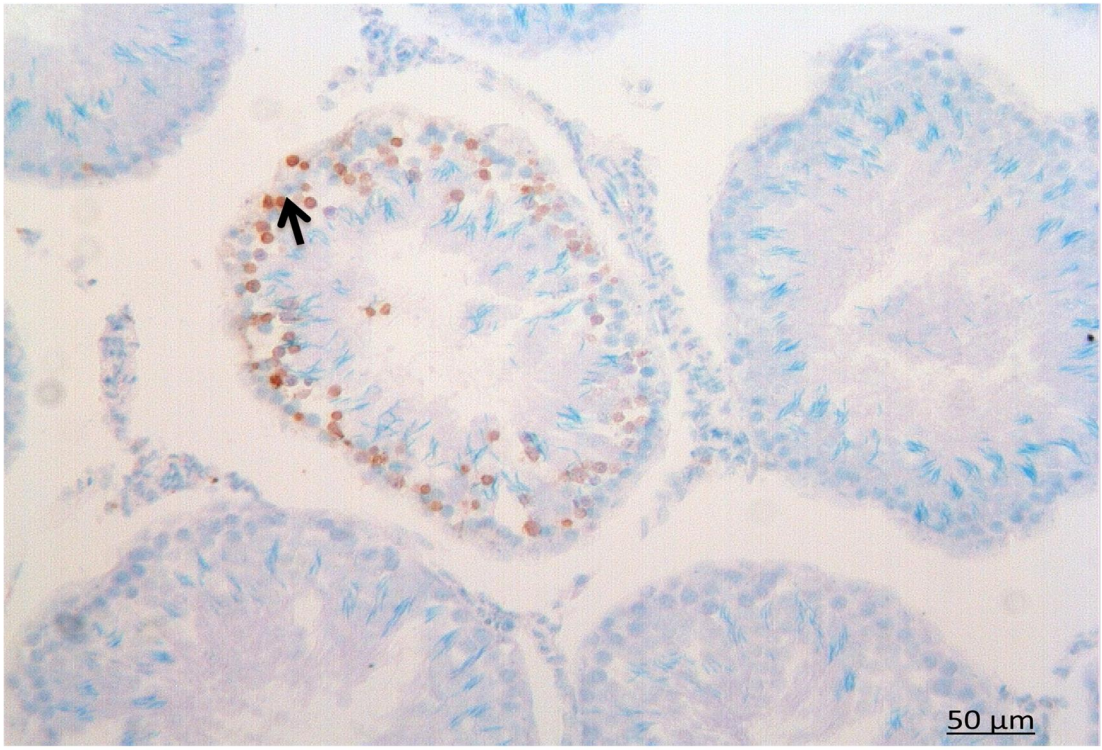
Resim 3.21. Sisplatin grubuna ait seminifer tübül yapısı; ( ) apoptotik hücreler, TUNEL metodu.



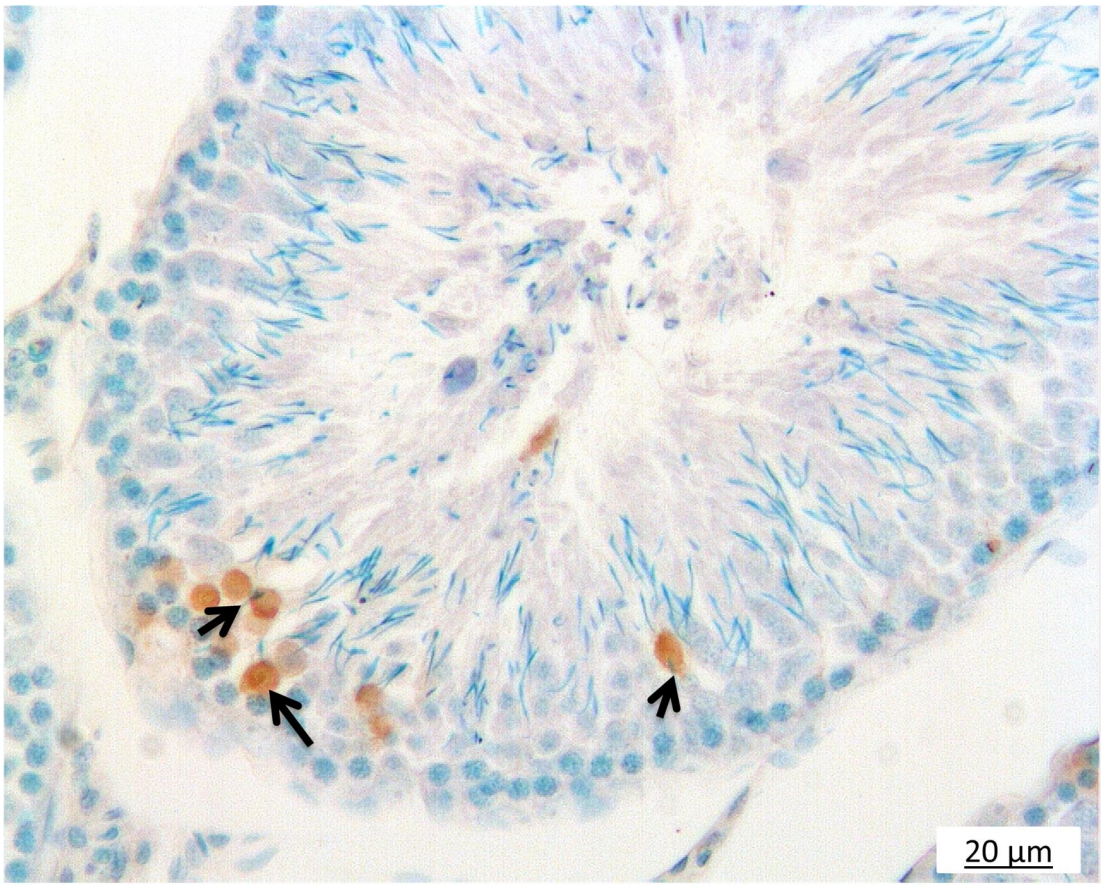
Resim 3.22. Çinko grubuna ait testis kesiti; seminifer tübül içindeki apoptotik hücreler ( ), TUNEL metodu.



Resim 3.23. Çinko grubuna ait testis kesiti; seminifer tübül içindeki apoptotik hücreler ( ), TUNEL metodu.



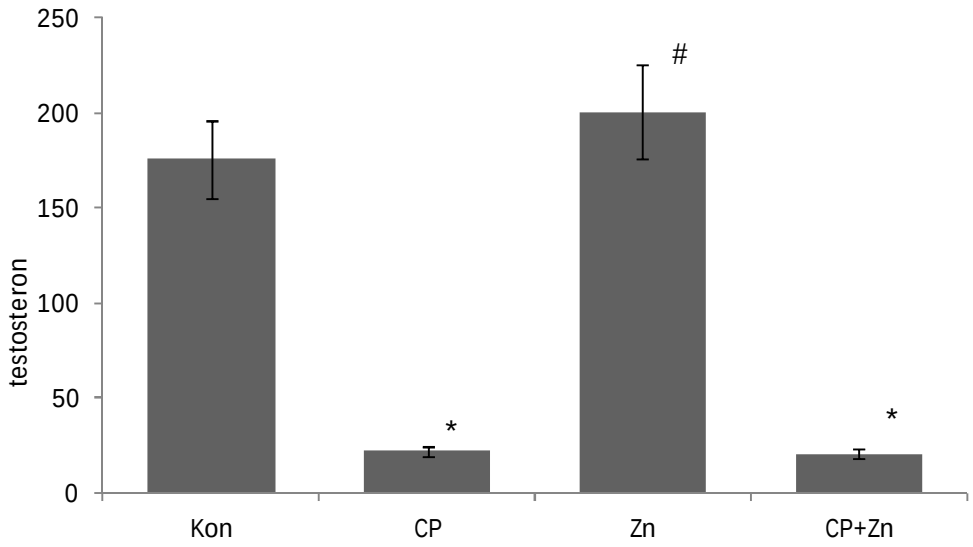
Resim 3.24. Sisplatin+Çinko grubuna ait testis kesiti; ( ) seminifer tübül duvarındaki spermatogenik serideki apoptotik hücreler görülmektedir, TUNEL metodu.



Resim 3.25. Sisplatin+Çinko grubuna ait seminifer tübül yapısı; ( ) apoptotik hücreler, TUNEL metodu.

3.6. Plazma Testosteron Seviyesi

CP grubu; Kon ve Zn grubuyla karşılaştırıldığında testosteron seviyesinde anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). CP+Zn grubu; Kon ve Zn grubuyla karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark vardı ($p<0,001$). Fakat; Kon ve Zn grupları arasında bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$), (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Plazma testosteron seviyesi *, Kon ile # ise CP ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ seviyesindeki istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (Kon, n=5; CP, n=5; Zn, n=5; CP+Zn, n=5).

4. TARTIŞMA

Erkek üreme sistemi, sperm üreten ve androjenleri salgılayan testislerden, erkek genital duktuslarından, erkek yardımcı bezlerinden ve penisten oluşur. Erkek üreme sisteminin bir parçası olan testisler, seks hücreleri olan spermatozoonların devamlı üretimi ve beslenmesi ile erkek seks hormonlarının sentezi ve sekresyonundan sorumlu olan bir çift organdır (Kaya ve ark 2006).

Erkek üreme sisteminin spermatozoonların yapımından sorumlu kısmı olan testislerin yapılarının ve fonksiyonlarının bilinmeyen yönlerinin açıklığa kavuşturulmasına yönelik çalışmalar yıllar öncesinde başlamış ve halen de devam etmektedir. İnsanlarda spermatozoon yapımının pnömoni nedeniyle durmasının fark edilmesiyle (Mills 1919) sayısız araştırmacı farklı ve çeşitli toksik ajanın testiste oluşturduğu değişiklikleri araştırmaya yönelmiştir.

Apoptozis, bir seri morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilen ökaryotik hücre ölümü şeklidir. Hayvan modelleri üzerindeki çalışmalar, apoptozisin normal spermatogenez esnasında germ hücre ölümünün altında yatan mekanizma olduğunu göstermiştir (Barroso ve ark 2000, Agarwal ve Said 2003, Wang ve ark 2003, Simon ve ark 2005). Memeli testislerinde germ hücreleri olgun spermatozoa oluşumu ile sonuçlanan farklılaşma aşamasını geçirmeden önce birkaç kez mitoz ile klonal olarak çoğalırlar. Bu klonal genişleme fazla olduğundan sertoli hücrelerinin destekleyici kapasitesi ile germ hücre sayısını denkleştirmek için apoptozis gibi bir mekanizma gerekir. Bu şekilde, apoptozis erkek gametlerin aşırı üretimini kontrol eder (Agarwal ve ark 2003).

Germ hücrelerinin çoğu aktif şekilde bölünen farklılaşmamış spermatogonyumlardır ve sitotoksik ajanlara karşı oldukça duyarlıdırlar. Bunlar, testislerin çok düşük dozlarda ışınlanmasından sonra bile ölürler. Spermatidler ve spermler ise oldukça dirençlidirler (Guitton ve ark 1999, Özalpan 2001, Shetty ve Meistrich 2005). Ancak bu hücrelerde de genetik değişikliklerin meydana gelme olasılığı yüksektir. Germ hücrelerinin aksine, erişkinlerde çoğalmayan Leydig ve Sertoli hücreleri ise en dirençli hücreler olup, çoğu sitotoksik terapi sonrasında hayatta kalır. Ancak bu hücreler fonksiyonel hasara uğrayabilir (Özalpan 2001, Shetty ve Meistrich 2005).

CP insanlarda baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek gibi bir çok solid tümörde etkili bir antitümör ilaç olarak kullanılmaktadır (Madasu ve ark 1997, Mansour ve ark 2002). CP uzun yıllardır başarı ile kanser tedavisinde kullanılmasına rağmen biyokimyasal etki mekanizması henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır. İlacın sitotoksik özelliklerini nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak ve çeşitli sinyal iletim yolaklarını aktive ederek sağladığı düşünülmektedir. CP hücre mitokondrisine zarar verir, hücre siklusunu duraklatır, ATPaz aktivitesini engeller, hücresel transport sistemlerini değiştirir ve sonuç olarak apoptoz, inflamasyon, nekroz ve hücre ölümüne sebep olur (Mansour ve ark 2002).

Yapılan çalışmalarda CP'nin, lipid peroksidasyonuna, bazı enzim aktivitelerinde değişikliklere ve kromozom anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir (Özyurt ve ark 2002, Nefic 2001). CP'nin oluşturduğu olumsuz etkileri önlemek için CP'le birlikte C vitamini (Nefic 2001), adenozin antagonistleri (Knight ve ark 1991), L-histodinol (Badary ve ark 1997), aminoguanidin (Mansour ve ark 2002), CAPE (Özyurt ve ark 2002, Yılmaz ve ark 2002), nifedipine (Deray ve ark 1998), erdostein (Söğüt ve ark 2002, Yılmaz ve ark 2004) ve glutamin (Mora ve ark 2002) kullanılmıştır. Çeşitli organ ve sistemlere olan toksisiteleri yanında risklerden biri üreme yaşındaki bireylerin over veya testis hasarına bağlı olarak üreme yeteneklerinin kaybedilmesidir. Özellikle testis hücreleri mitotik, mayotik morfojenik çeşitli süreçlere girdiklerinden kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olarak seçilir, bu yüzden de kolayca hasarlanırlar (Kayaalp 1994).

Klinikte yapılan geniş çaplı retrospektif çalışmalar CP'nin kök hücreler üzerinde total öldürücü etki göstermediğine işaret etmektedir. CP'nin B spermatogonyumları ve lümene komşu bölgede germ hücrelerini etkilediği bildirilmiştir. Bu sonuç CP'nin lümene kadar girebilme yeteneğine bağlı direk ilaç etkisi olabileceği gibi ilacın Sertoli hücrelerine verdiği zarara bağlı sekonder bir etki de olabilir. (Russell 1991, Nonomura ve ark 1991)

Spermatogenez Sertoli hücreleri tarafından düzenlenmekte ve desteklenmektedir. Sertoli hücrelerinin önemli işlevlerinden biri de, germ hücrelerinin farklanması için tübül içinde mikroçevrenin stabilitesini sağlayan kan-testis bariyerini oluşturmaktır. Yapılan bir çalışmada CP'nin Sertoli hücrelerinin arasında bulunan zonula okludens tipi bağlantı komplekslerini etkilediği

gösterilmiştir. Bunun anlamı CP'nin kan testis bariyerini bozmasıdır (Erdemli ve ark 1999).

Kemoterapotik ajan olan CP spermatozoonun baş kısmında anomalilere (Ateşşahin ve ark 2005) ve spermatozoon DNA'sında hasara sebep olan genotoksik bir maddedir (Khynriam ve Prasad 2003). Genotoksik maddelerin spermatozoon DNA'sına verdiği zararlarla ilgili yapılan diğer çalışmalar acrylonitrile (Xu ve ark 2003), tamoxifen (Pagano ve ark 2001), cyclophosphamide (Anderson ve ark 1995, Simula ve Priestly 1992), styrene (Simula ve Priestly 1992) ve acrylamide (Dearfield ve ark 1988) gibi pek çok maddenin genotoksik etkiye ve spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Farelerde yapılan çalışmalarda intraperitonal ya da intravenöz CP enjeksiyonunu takiben spermatogenezis'de akut hasar olduğu gösterilmiştir. Düşük doz CP bile özellikle spermatogonyum için toksiktir. Yüksek doz CP seminifer tübül lümeninin etrafındaki spermatidler ve spermatositleri içine alan bütün basamaktaki hücreleri öldüren geniş bir olaya neden olur. Hatta bu olaylara kan-testis bariyerini koruyan Sertoli hücrelerinin toksisitesi de eklenebilir. Kök hücrelerin ise CP'nin neden olduğu toksisiteye karşı oldukça dirençli olduğu görülmektedir (Meistrich ve ark 1982).

CP maruziyetinden sonra Sertoli hücresinin yapı ve fonksiyonunda değişiklikler olmuş bu da bu hücrelerin toksisite için bir hedef hücre olduğunu göstermiştir. 5 günlük 2mg/kg intraperitonal CP enjeksiyonundan en erken 24 saat sonra sertoli hücre bağlantısında (kan-testis bariyeri) parçalanmalar olmuş ve bu etki en az 40 gün sürmüştür (Pogach ve ark 1989, Gotoh ve ark 1990). Sertoli hücre bağlantılarındaki bu değişiklikler seminifer tübül sıvı elektrolitlerinde gözlenen değişikliklerle açıklanabilir (Pogach ve ark 1989). CP maruziyeti sertoli hücre fonksiyonunu etkileyerek serum ve epididimal androjen bağlayıcı protein seviyelerinde azalmalara neden olur (Huang ve ark 1990).

Bugünkü çalışmalarda yetişkin ratlara CP verilmesinden sonra spermatogenik fonksiyonlarda akut hasarlara neden olduğu fakat bu etkinin geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar klinik gözlemler (Drasga ve ark 1983, Lange ve ark 1983, Berthelsen ve ark 1984, Meistrich ve ark 1989) ve hayvan deneyleri (Meistrich ve ark 1982) ile uyuşmaktadır.

Bu çalışmada yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olarak, CP'nin testis dokusuna dejeneratif etkisinin belirgin olduğu görüldü. CP'li grupta; germ hücrelerinde sıralama bozukluğu, Sertoli ve spermatogonyumların bazal membrandan ayrıldığı, tüm epitel duvarı boyunca hücreler arası mesafenin arttığı, lümene yakın hücrelerde özellikle spermatidlerde kromatin yoğunlaşması, parçalanması ve Leydig hücrelerinin sayısında azalma gözlendi. Tübül duvarında, gerek ana hücreler gerekse spermatogenezin hiç bir evresi ayırt edilemedi. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenezi Johnsen kriterine göre değerlendirildiğinde, en fazla hasarın CP grubunda olduğunu bulundu.

Sawhney ve ark (2005) çalışmalarında, CP'nin akut dozuna maruz kalmış farelerde germ hücre apoptozis oranının arttığını göstermişlerdir. Germ hücresinde apoptozis oranının artması ilk günlerde (14-21. günler) gözlemlenmiş, subkronik CP maruziyetinden sonra belirgin bir şekilde düşmüştür. Her ne kadar, germ hücresindeki apoptotik orandaki bu düşüş testisdeki apoptozis seviyesinin azalmasının bir sonucu olarak meydana gelmese de germ hücrelerinin eksikliğinin bir sonucu olarak oluşmuştur. 2,5 ve 5 mg/kg CP verilmesi sonucu sitosolik vakuollerin oluşmasıyla seminifer tübüllerde atrofi, apikal yırtılma, lümene dökülmüş hücresel materyal ve germ hücre tabakasında etkili kayıp olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca, düşük dozla (2,5 mg/kg) CP tedavisinin sürdürülmesi sonucu seminifer tübül hasarının devam ettiği ve bunun sonucu olarak da stem spermatogonyum'daki kayıplardan dolayı infertilitenin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Diğer taraftan kısa bir sürede yüksek doz CP verilmesinin sistemik toksisiteye neden olabileceğini fakat; bu dozda bile spermatogonyum'nun hayatta kalabileceğini ileri sürmüşlerdir. Spermatogonyum'daki kayıbın önceki çalışmalarla uyumlu olarak sadece yüksek doz akut CP'nin verilmesi sonucu spermatogonial apoptozisle ortaya çıktığını not etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, testis germ hücresi ölümünün apoptoz yoluyla meydana geldiğini göstermiştir. Spontan apoptoz, germ hücrelerinin gelişimi esnasında oluşan ve hasarlı germ hücrelerinin eliminasyonunu sağlayan fizyolojik bir süreç olup ayrıca iyonizan radyasyon, kemoterapi ve hormonal manipülasyonlar gibi bir takım dış uyaranlar da apoptoza yol açmaktadır (Çelik ve ark 2004).

Zhang ve ark (2001), sıçanlara tek doz 1, 5 ve 10 mg/kg intraperitonal CP enjeksiyonu yaptıktan sonra bütün grupları CP enjeksiyonunu takiben 1, 3 ve 7.

günün sonunda sakrifiye etmişler. Her 3 deney günün sonunda CP tedavili gruplardaki testislerde spermatidlerin ve spermatozoa'nın sayılarının azaldığını not etmişler. Herhangi bir CP tedavili grupta spermatogonyum ve spermatosit sayısında önemli bir azalma bulamamışlar. CP tedavisini takiben seminifer tübüldeki spermatidler, spermatositler ve spermatogonyum'da apoptotik hücreler olduğunu görmüşler. Zaman ve doz bakımından apoptotik indeks'lerindeki yükselmeleri tek tek not etmişmişler (1. gün 1 mg/kg CP, 3. gün 5 mg/kg CP ve 7. gün 10 mg/kg CP) ve doza bağlı CP ile uyarılmış apoptotik germ hücresinin artması sadece 7. günde gözlemlemişler. Ayrıca; zamanın ilerlemesine bağlı olarak CP indüklü apoptotik germ hücresindeki artışı sadece 10 mg/kg CP tedeavili grupta izlemişler. Sonuç olarak, CP indüklenmesiyle oluşan germ hücre apoptozisinde hasar oranının hem doz hem de zamana bağlı olarak değişebileceğini göstermişlerdir.

Otala ve ark (2004), elektron mikroskobik analizle testisde ışınlama aracılığıyla meydana getirilen en yaygın ölüm şeklinin apoptozis olduğunu göstermişlerdir. Apoptozisin morfolojik işaretleri başta spermatogonyumlar olmak üzere tüm germ hücrelerinde oldukça sık gözlenmiştir.

Önceki çalışmalarda, CP'nin testiküler hasarının patogenezinde apoptozisin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. CP'nin sertoli hücrelerinde ve testiküler germ hücrelerinde apoptozise yol açtığı rapor edilmiştir. CP'nin testiküler hasarı indüklemesi p53 ekspresyonunun yüksek regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. p53 protein'nin yükselmesi DNA hasarını tetikleyerek ya hücre döngüsünü geçici olarak durdurur ya da apoptozise neden olur. Bu nedenle testiküler epiteldeki CP araçlı apoptozis'de p53'ün çok önemli bir komponent olduğu ileri sürülmüştür (Amr ve ark 2008).

Oakberg (1956) ve Clermont (1962) testis germ hücrelerinde dejenerasyonun anormal kromozoma sahip hücrelerin eliminasyonunu sağlayan bir mekanizma olabileceğini ileri sürmelerine rağmen günümüzde apoptozun spermatogenik germ hücrelerinde yüksek oranlarda gözlenmesinin nedeni henüz bilinmemektedir.

Son çalışmalarda, CP indüklenmesinin germ hücre apoptozisine yol açtığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmalarda, TUNEL metodu ile pozitif boyanan germ hücrelerinin apoptotik olduğunu ve CP maruziyetinin apoptoz yoluyla germ hücre ölümüne neden olduğu doğrulanmıştır (Zhang ve ark 2001, Seaman ve ark 2003).

Germ hücre apoptozis indüksiyonu hızlıdır ve CP maruziyetli günlerde doruk noktaya ulaşır. Germ hücre apoptozisinin CP maruziyetinden 12 gün sonra da kontrol seviyesini koruyarak devam ettiği ve seminifer epiteldeki hasarın uzun süreli olduğu gösterilmiştir. Bütün dozlar denendiğinde CP'nin apoptozis indüklü etkisinin spermatogoyumdan daha çok spermatositlere hassas olduğu görülmüştür (Seaman ve ark 2003).

Bax proteini Bcl-2 ailesinden proapopitotik bir proteindir. Görevi apopitozise neden olmaktır (Oltvai ve ark 1993). Tümör supresör gen olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Bax protein fonksiyon kaybının bazı lösemilerde ve kolon kanserinde rol oynadığı gösterilmiştir (Maijerink ve ark 1998). Çoğu çalışma Bax sentezinin normal ve malign doku arasında farklı olmadığını göstermiştir (Kakava ve ark 1999, Mozetti ve ark 2000). Prognoza etkisi olmadığını söyleyen çalışmalar yanında iyi ve kötü yönde etkilediğini söyleyen çalışmalar da mevcuttur (Harima ve ark 1998, Harima ve ark 2000, Cheurg ve ark 2002).

Kuş ve ark (2008) yaptıkları çalışmada, kontrol grubu sıçanlarına ait testis doku kesitlerinde herhangi bir Bax boyanması gözlemezken, formaldehite maruz kalan gruba ait doku preparatlarında şiddetli derecede immünohistokimyasal Bax boyanmasının olduğunu tespit etmişler. Formaldehit enjeksiyonu ile birlikte omega-3 yağ asitleri verilen sıçanlara ait testis doku kesitlerinde ise immünohistokimyasal Bax boyanmasının minimal derecede olduğu görmüşler.

Kükner ve ark (2010) çalışmalarında, immobilize rat testislerinin interstisyel hücrelerinde ve spermatogonyum'da şiddetli derecede immünohistokimyasal Bax boyanması gözlemlemişler, E vitamini tedavili grupta ise interstisyel alanda ve spermatogonyum'da Bax boyanmasının azaldığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, testis dokunda seminifer tübüldeki apoptozis hem immünohistokimyasal olarak Bax boyasıyla hem de TUNEL yöntemi ile gösterildi. Bax boyanmış testis kesitleri incelendiğinde, spermatogenik hücrelerdeki spermatogonyumlarda en fazla, Leydig hücrelerinde ise daha az sitoplazmik boyanmanın olduğu tesbit edildi. CP grubunda artmış apoptozisle beraber belirgin bir boyanma olduğu (+3) buna karşın Kon ve Zn grubunda boyanmanın olamadığı, CP+Zn grubunda ise apoptozisin devam ettiği fakat, boyanma şiddetinin CP'deki

kadar fazla olmadığı (+1) görüldü. Bax boyanma şiddeti bakımından gruplar istatistiki açıdan karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulundu.

TUNEL yöntemi uygulanan gruplarda, nukleusları kahverengiye boyanmış hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kon grubundaki sıçanların seminifer tübüllerinde gözlenen spontan apoptoz, ağırlıklı olarak spermatogonyumlarda ve çok az olarak spermatositlerde gözlendi ve APOİ'i 28,3 olarak hesaplandı. CP grubunda seminifer tübüldeki hemen hemen bütün spermatogenik seride çok sayıda apoptotik nukleuslara rastlandı ve APOİ'i 806,6 bulundu. Zn grubunda da Kon grubuna benzer bir görüntü gözlendi ve APOİ'i 40 olarak hesaplandı. CP+Zn grubunda ise seminifer tübüldeki spermatogenik seride apoptotik nukleuslara rastlandı fakat, CP grubundaki kadar çok değildi ve APOİ'i 591,6 olarak bulundu.

CP'li grupta dejeneratif seminifer tübüllerin germ hücrelerinde çok sayıda apoptotik hücre gözlemlendi ve bu artış Kon ve Zn grubuyla kıyaslandığında istatistiki yönden anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,001$). Bu grupta interstisyel alanda nadiren apoptotik hücre gözlemlendi. CP+Zn grubu, CP grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısının azaldığı ve apoptotik hücrelerin daha çok spermatogonyum ve spermatositlerde sınırlı kaldığı görüldü. İstatistiksel olarak CP ve CP+Zn grubu arasında ($p<0,001$) ve Zn ve CP+Zn grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı bir fark bulundu.

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda CP'nin vücut ağırlığı üzerinde hiç bir etki oluşturmadığı, ancak germ hücre tüketimine bağlı olarak testis ağırlığında belirgin derecede bir azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (Agarwal ve Said 2003, Otalla ve ark 2004).

Bu çalışmada da, vücut ağırlığı bakımından ilk ölçüm ve son ölçümler arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,8211$, $p>0,05$); ancak TAİ bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,01$, $p<0,05$). Gruplar karşılaştırıldığında CP'in testis ağırlığını azalttığı saptandı.

Sıçanlara CP verilmesi ile gonadotropinler ve steroid hormonlarda hızlı bir artışın olduğu daha önce rapor edilmiştir (Le Blanc ve Waxman 1988, Maines ve ark 1990). Bu etkinin mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada CP ile tedavi edilen sıçanlarda hipofizer FSH ve LH düzeyleri

yüksek bulunmuş ve GnRH verilmesi ile FSH ve LH düzeyleri daha da artmıştır (Maines ve ark 1990).

Araştırmacılar CP'nin neden olduğu serum testosteron düzeyindeki düşmenin GnRH ile geriye dönebildiğini göstermişlerdir. Böylece ilacın testise veya testiküler hormon metabolizmasına değil, hipotalamus düzeyinde etkili olduğu sonucuna varmışlardır (Maines ve Mayer 1985). Bu düşünceyi destekleyen bir çalışmada, CP'e bağlı serum testosteron düşüklüğünün, sıçan testislerindeki LH reseptörlerinin ve sitokrom P-450'nin depresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Maines ve ark 1990).

Azouri ve ark (1989) sıçan testislerinde mikrozomal p-450 konsantrasyonunda benzer azalmayı rapor etmişlerdir. Bu azalma ile birlikte plazma testosteron düzeyleri de düşük bulunmuştur.

Andersson ve arkadaşları (2004) yaptıkları bir çalışmada, spermatogenik disfonksiyonun genelde Leydig hücrelerinin disfonksiyonu ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Spermatogenik bozuklukları olan insanlarla ilgili yapılan birçok çalışmada, testosteron seviyesinin açık olarak çok düşük olduğu veya normal sınırların en alt limitinde olduğu ve buna yüksek seviyede LH'ın eşlik ettiği saptanmıştır (Nieschlag ve ark 1979).

Leydig hücrelerinin disfonksiyonunun spermatogenik disfonksiyona sebep olduğu rodentler üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, normal ratlarda spermatogenik hasar, radyasyona maruz bırakılma, vit A eksikliği, kriptorşidizm veya hidroksiüre gibi kemoterapötik ajanların kullanılması ile oluşturulmuştur. Bu çalışmalarda düşük testosteron konsantrasyonu ile eşlik eden yüksek LH seviyeleri bulguları da tespit edilmiştir (Rich ve Kretser 1977, Rich ve ark 1979).

Bu çalışmada da, gruplardaki farelerin plazma testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında sonuçların yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü. CP grubunda diğer gruplara oranla plazma testosteron seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğu bulundu ($p<0,001$). Aynı zamanda, CP+Zn grubunun da Kon ve Zn grubundan anlamlı derecede farklı olduğu tesbit edildi. Kon ve Zn grubunda plazma testosteron seviyesinin aynı olduğu bulundu**.**

Yapılan bu çalışmada, CP toksisitesine karşı hücre dışı savunma sisteminin bir elemanı olan Zn kullanılmıştır.

Amerika'daki Ulusal Bilimsel Akademi Gıda ve Beslenme Konseyi Zn'nin esansiyel bir besin maddesi olduğunu bildirmiş ve parenteral nutrisyon sıvılarına katılmasını zorunlu kılmıştır (Powell 2000, Afonne ve ark 2002, Arcasoy 2002, Belgemen ve Akar 2004). Günümüzde Zn'nin metabolik olaylarda, protein, karbonhidrat, enerji, nükleik asit, lipid ve hem sentezinde, gen ekspresyonunda, immun sistem matürasyonunda, doku sentezi ve embriyogenezisde önemli roller üstlendiği bilinmektedir (Afonne ve ark 2002, Arcasoy 2002).

Tüm canlılar için esansiyel olduğu yüz yılı aşkın bir süreden beri bilinen Zn'nun, insan sağlığı bakımından öneminin anlaşılması ancak son yıllarda olmuştur.

Zn'nin serbest radikal oluşumu ve oksidatif stresten koruyucu rolü vardır (Belgemen ve Akar 2004, Bashandy ve ark 2006, Jacquillet ve ark 2006). Yapılan çalışmalarda Zn'nin interstisiyal hücrelerden potasyum (K) ve glutamik oksalasetik transaminaz (GOT) kaybını azaltarak kadmiyumun sıçan testisi üzerindeki sitotoksik ve kanserojen etkisini azalttığı ileri sürülmektedir (Karataş 1998, Jurczuk ve ark 2004).

Hücre içindeki metabolik olaylar sırasında ortaya çıkan serbest radikallerin dokuyu hasara uğratmasını önleyen koruyucu bir mekanizma mevcuttur (Jiang ve ark 1994, Jamba ve ark 1997). Doku hasarı ve hücre ölümünün nedeni, serbest radikallerin etkili bir şekilde ortamdan uzaklaştırılamamasına bağlanmaktadır. Zn'nin esansiyel biyokimyasal fonksiyonlarından biri de antioksidan görevidir. Zn; oksijen ve organik moleküllerden elektron transferini önler, organik serbest radikalleri stabilize eder ve böylece organik serbest radikal reaksiyonlarını sonlandırır (Bashandy ve ark 2006, Jacquillet ve ark 2006).

Zn; oksidasyona karşı sülfidril gruplarını korur, transisyon metaller tarafından reaktif oksijen oluşumunu inhibe eder. Makromolekül kompleks ve organeller üzerine, bugünkü bilgilerimize göre Zn; genel bir stabilize etme etkisine sahiptir. Örnek olarak, memelilerin sperminin kuyruk kısmında bulunan keratinin yapısını oksidatif hasarlardan korur. Zn'nin stabilizasyon ve antioksidasyon üzerindeki etkileri arasındaki bilgilerimiz henüz tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte

oksidatif/peroksidatif hasarı minimale indirdiği bir çok çalışmada açık bir şekilde gösterilmiştir (Claveria ve ark 2000).

Yapılan çalışmalar, Zn'nin proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak ya da lipidlerdeki, proteinlerdeki ve DNA'daki Fe ve Cu bağlanma bölgelerini işgal ederek, reaktif oksijen türevleri (ROT)'nin oluşmasını ve hücre Zn bileşenlerini okside etmelerini engellediğini göstermiştir (Elsenhans ve ark 1994, Elgazar ve ark 2005).

Zn'nin testislerde ve aksesuar cinsiyet bezlerinde yüksek konsantrasyonda bulunması üreme fizyolojisinde önemli rolleri olduğunu göstermektedir (Liu ve ark 1997). Zn'nin sperm membran bütünlüğünü sağladığı, sperm motilitesini artırdığı, sperm kuyruğunun helezonik hareketini düzenlediği bilinmektedir (Perk ve ark 1990). Erişkin erkek testisinde Zn konsantrasyonu yüksek oranda bulunmakta ve ejekulattaki spermatozoanın yaşam süresini Zn'nin uzattığı düşünülmektedir (Bedwal ve Bahuguna 1994, Suzik ve ark 1994).

Prasad ve ark (1996) Zn'nin esas etkisinin germinal epitelyumda olduğunu ifade etmektedirler. Zn, testislerde tübüler kompartmanda germinal elemanların ve bunların en gelişmiş şekli olan spermatozoonlara bağlı olarak epididimise taşınır, gerek germinal hücrelerin gelişmesi gerekse germinal epitelin devamlılığı için gereklidir. İnterstisyel kompartmanda bulunan Zn, Leydig hücreleri, bağ dokusu ve damarların fonksiyonunu etkilemektedir (Gunn ve ark 1963).

Orisakwe ve ark (2001) çalışmalarında, düşük doz civanın testislerde dejeneratif lezyonlara neden olduğunu ve Zn tedavisinden sonra normal morfolojik yapılarına döndüklerini göstermişler. Zn'nun farelerde civa indüklü testiküler hasarı önleyeceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada, Zn grubuna ait testis doku örneklerinin Kon grubuyla aynı yapısal özellikleri taşıdığı görüldü. Işık mikroskobik incelemelerde, gerek bazal lamina gerekse seminifer tübül sınırları düzgün, tübül germ hücrelerinin düzenli bir organizasyon içerisinde oldukları gözlendi. İnterstisyel aralıktaki Leydig hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu ve damarların normal yapısını korudukları tebit edildi. Zn grubundaki plazma testosteron seviyesinin diğer gruplara kıyasla yüksek olduğu gözlemlendi.

Bax boyanması yönünden değerlendirildiğinde, Zn grubunun testis dokularında negatif boyanma olduğu görüldü. TUNEL yöntemi uygulanmış kesitler incelendiğinde ise, Zn grubunda çok az apoptotik hücreye rastlandı.

Sonuç olarak; CP ile beraber Zn verilen deney hayvanlarının testislerinde, CP grubunda görülen dejenere tübül epiteline göre, çaplarını korumuş ve normale yakın düzgün tübüler yapılar ve seminifer tübül epitelindeki tüm spermatogenik hücreler ve Sertoli hücrelerinin normale yakın korunmuş olduğu gözlendi. CP+Zn'li grupta yalnızca epitel hücreleri arasında yer yer vakuollü bir görünüm ve lipid damlacıkları gözlenmiştir. İnterstisyel alanda ise CP gruba oranla normal sayıda ve yapıda Leydig hücrelerinin yer almış olması gibi bulgular bu gruptaki etkilenmenin, CP grubu deney hayvanlarının testis dejenerasyonlarına göre önemli oranda azaldığını gösteriyordu. Ayrıca bu grupta apoptotik hücre sayısı CP grubuna kıyasla daha az bulundu. Testis dokusunda minimal Bax boyanması olduğu görüldü.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sisplatin insanlarda baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek gibi bir çok solid tümörde etkili bir antitümöral ilaç olarak kullanılmaktadır Bunların toksisiteleri ve taşıdıkları minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla göz ardı edilir. Çeşitli organ ve sistemlere olan toksisiteleri yanında risklerden biri üreme yaşındaki bireylerin over veya testis hasarına bağlı olarak üreme yeteneklerinin kaybedilmesidir. Özellikle testis hücreleri mitotik, mayotik morfojenik çeşitli süreçlere girdiklerinden kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olarak seçilir, bu yüzden de kolayca hasarlanırlar.

Çinko, biyomembranlar için önemli bir bileşen, membran yapısı, fonksiyonları ve birçok enzimin aktivasyonu için temel bir elementtir. Biyolojik membranların ve iyon kanallarının stabilitesini ve bütünlüğünü korur. Nükleik asit veya diğer gen düzenleyici proteinlerde yapısal element olarak rol oynar. Redoks aktivitesinin olmaması nedeniyle bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir. Çinkonun serbest radikal oluşumu ve oksidatif stresten koruyucu rolü vardır.

Bu çalısmada, sisplatin'in sıçan testisi üzerinde nasıl bir toksik etki oluşturduğu ve çinkonun ise bu toksik etkide nasıl bir görev üstlendiği histolojik olarak araştırılmıştır.

Deney süreci sonunda yapılan istatistiksel analizlere göre;

Testis ağırlık indeks'i bakımından gruplar karşılaştırıldığında sisplatin grubundaki deney hayvanları ile çinko ve sisplatin+çinko grubu deney hayvanları arasında anlamlı bir fark bulundu.

Grupların birbirleri arasında, testiste gözlenen, seminifer tübül hücre hasarı, Leydig hücresindeki farklılıklar, spermatogenez hasarı ile ilgili olarak yapılan değerlendirmelerine göre, bu gruplardan sadece sisplatin'li gruptaki deney hayvanları ile diğer üç grup (kontrol grubu, çinko grubu ve sisplatin+çinko deney grubu) arasında anlamlı bir fark bulundu. Kontrol grubu ile sisplatin+çinko deney grubu arasında ise herhangi bir fark görülmedi.

Apoptozisi göstermek için yapılan immünohistokimyasal Bax boyaması ve TUNEL metodu sonucuna göre; gruplar karşılaştırıldığında sisplatin grubu ile diğer üç grup arasında anlamlı bir fark olduğu gözlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada beş gün boyunca toplam 10 mg/kg verilen sisplatin'in testis dokusu için oldukça toksik olup apoptozis'i indüklediği ve histolojik yapıyı bozduğu saptandı. Esansiyel bir mineral olan ve antioksidan etkiye sahip çinkonun ise bir ay boyunca verilmesi sonucu sisplatinin testiste oluşturduğu bu hasarları önemli ölçüde düzelttiği görüldü.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSPLATİN TOKSİSİTESİNİN SIÇAN TESTİSİNDE YARATTIĞI HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERE ÇİNKONUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Burcu GÜLTEKİN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Tıp)

DOKTORA TEZİ/KONYA-2013

Sisplatin (CP) çeşitli kanser vakalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Ancak, nefrotoksisite, hepatotoksisite, ototoksisite gibi kullanımını kısıtlayan çeşitli yan etkilere sahiptir. Bazı çalışmalar, CP uygulaması ile serbest radikal oluşumunun ve dolayısıyla oksidatif hasarın arttığını göstermiştir. Bu bulgular, oksidatif stresin CP toksisitesinde önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Diğer yandan, birçok çalışma antioksidan ajanların CP toksisitesini önleyebileceğini göstermiştir.

Çinko (Zn), antioksidan etkili bir enzim olan süperoksit dismutazın ve dokuları serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan metallotiyoneinlerin yapısında yer alır. Zn fazlalığının apoptozisi inhibe ettiğini, Zn eksikliğinin ise uyardığını gösteren bir çok çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmada, sisplatin'in sıçan testisi üzerinde oluşturduğu toksik etkinin antioksidan özelliği olan çinko ile ne derece düzelebileceği araştırılmak istenmiştir.

Sıçanlar; I. Grup (n=8) Kontrol, II. Grup (n=12) Sisplatin (cis-Platinum) tedavisi alan, III. Grup (n=8) Çinko (Zinksulfat) ve IV. Grup (n=12) Sisplatin+Çinko olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (Kon); 30 gün boyunca izotonik salin solusyonu intraperitonal (ip.), sisplatin grubuna (CP); 5 gün cis-platinum(günlük 2 mg/kg) ip., çinko grubuna (Zn); 30 gün boyunca çinko sülfat (3 mg/kg) ip. ve sisplatin+çinko grubuna (CP+Zn) ise; çinko sülfat (3 mg/kg) 30 gün ve cis-platinum (günlük 2 mg/kg) ip. 5 gün verildi. Sıçanların testis dokuları alındıktan sonra rutin histolojik takipleri yapılıp immünohistokimyasal teknikler uygulandı.

Testis Ağırlık İndeks'i bakımından gruplar karşılaştırıldığında CP grubundaki deney hayvanları ile Zn ve CP+Zn grubu deney hayvanları arasında anlamlı bir fark bulundu. Gruplar; testiste gözlenen, seminifer tübül hücre hasarı, Leydig hücresindeki farklılıklar, spermatogenetik hasar olarak karşılaştırıldığında ise, bu gruplardan sadece CP'li gruptaki deney hayvanları ile diğer üç grup

(Kon grubu, Zn grubu ve CP+Zn grubu) arasında anlamlı bir fark bulundu. Kon grubu ile CP+Zn deney grubu arasında ise herhangi bir fark görülmedi. Apoptozisi göstermek için yapılan immünohistokimyasal Bax boyaması ve TUNEL metodu sonucuna göre; gruplar karşılaştırıldığında CP grubu ile diğer üç grup arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü.

Sonuç olarak, bu çalışmada CP uygulamasının süresi ve dozu göz önüne alındığında, testis dokusu için oldukça toksik olup apoptozisi indüklediği ve histolojik yapıyı bozduğu saptandı. Esansiyel bir mineral olan ve antioksidan etkiye sahip olan Zn'nun ise sisplatinin testiste oluşturduğu bu hasarı önemli ölçüde önlediği görüldü.

Anahtar Sözcükler: Apoptozis , çinko, sisplatin, testis

7. SUMMARY

INVESTIGATION OF EFFECTS OF ZINC ON HISTOLOGIC CHANGES CAUSED BY CIS-PLATIN TOXICITY IN RATS' TESTICLES (AN EXPERIMENTAL STUDY)

Cis-Platin (CP) is one of the major chemotherapeutic agents commonly used in the treatment of cancer cases; however, it has many side effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity and autotoxicity which restricts the use. Various studies have shown the formation of free radicals and thus oxidative stress increase due to CP administration. These findings indicate that the oxidative stress plays an important role in CP toxicity. On the other hand, many studies have shown that antioxidative agents as zinc may prevent CP toxicity.

Zinc (Zn) takes a place in the structure of metallothioneins which protects tissues from harmful effects of free radicals and super oxide dismutase, an enzyme with antioxidative effect. Many studies have been performed to show that access of Zn inhibits and its shortage stimulates apoptosis.

In this study, it is aimed to investigate to what extent the toxic effect, caused by CP in rats' testicles, can be repaired by Zn, which has an antioxidative feature.

Rats were grouped into four as: Group I (n=8), controls; Grup II (n=12), treated with CP (cis-platinum); Grup III (n=8), treated with Zn (Zinc sulphate); and Grup IV (n=12), treated with CP+Zn. In control group, isotonic saline solution was intraperitonally (ip.) administered for 30 days; in CP group, cis-platinum (2 mg/kg/day) ip. for 5 days; in Zn group, zincsulphate for 30 days as (3 mg/kg) ip.; and in CP+Zn group, zincsulphate (3 mg/kg/day) for 30 days and cis-platinum (2 mg/kg/day) ip. for 5 days. After sampling tissues from rats' testicles, routine histologic examinations were carried out, and immunohistochemical techniques were used.

In comparison between the groups as to Testicle Weigth Index, a significant difference was found between rats in CP group and those in Zn and CP+Zn group. However, when the groups were compared as to cell injuries of seminiferous tubules, differences in Leydig cells and spermatogenetic injuries, a significant difference was observed only between the rats in CP group and other three groups (controls, Zn and CP+Zn groups), but no difference was found between controls and CP+Zn group. TUNEL method and immunohistochemical Bax staining is performed to show apoptosis; as a result, a significant difference is seen between CP and other three groups.

Conclusively, CP administration, considering its duration and dose, as in this stud, is determined to be quite toxic for testicle mucsles, to induce apoptosis and to break down histological structure. However, Zn, as an essential mineral and featuring an antioxidative effect, is seen to prevent the injury caused by CP, to a large extent.

Key Words: Apoptosis, cisplatinium, testicle, zinc

8. KAYNAKLAR

1. Abe T, Hutson JM. Calcitonin gene related peptide injected ectopically alters gubernacular migration in the flutamide-treated rat with cryptorchidism. Pediatr Surg Int. 1994; 9:551-4.

2. Adham IM, Emmen JMA, Engel W**.** The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. Mol Cell Endocrinol. 2000; 160 (1): 11-16.

3. Afonne OJ, Orisakwe OE, Ekanem IA. Zinc protects chromium- induced testicular injury in mice. Indian Journal of Pharmacology. 2002; 34: 26-31.

4. Agarwal A, Said TM. Role of sperm choramatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod. Uptade 2003; 9: 331-45.

5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. 2003; 79: 829-43.

6. Akşit H, Bildik A. Derleme Apoptozis, YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008; 19(1): 55- 63.

7. Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Perspec Mamm Cell death (ed. C. S. Potten), pp. Oxford University Press, London. 1987: 289–258.

8. Amr A, Alaaeldin AH, Amr K, Sayel D. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. Asian J Androl. 2008; 10(2): 291-297.

9. Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Wegman P, Selby PB. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutat Res-Fund Mol. 1995; 330: 115-181.

10. Andersson AM, Jorgensen N, Larsen LF, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:3161–67.

11. Appenroth D, Fröb S, Kertsen L, Splinter FK, Winnefwld K. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. Arch Toxicol. 1997; 71: 677-683.

12. Arcasoy A. Çinko ve Çinko Eksikliği, Ankara Talasemi Derneği Yayınları, 2.Baskı. 2002; 1-23.

13. Arıncı K, Elhan A.Anatomi.Cilt 1-2. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999; 28-6.

14. Arends M, Wyllie AH. Apoptosis: mecanism and roles in pathology. Int Rev Exp Pathol 1991; 32: 223- 254.

15. Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. Biol Reprod. 2000; 62: 680–690.

16. Ariyaratne HBS, Mason JI, Mendis-Handagama SMLC. Effects of triiodothyronine on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal rat. Biol Reprod. 2000(a); 63: 493-502.

17. Ariyaratne HBS, Mason JI, Mendis-Handagama SMLC. Effects of thyroid and luteinizing hormone on the onset of precursor cell differentiation into Leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis. Biol Reprod. 2000(b); 63: 898-904.

18. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. Science. 1998; 281:1305-1308.

19. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yilmaz S, Ceribaşi AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. Reprod Toxicol. 2006; 42-47.

20. Ayaşoğlu E. Apoptoz. T Klin Tıp Bilimleri Dergisi. 2001; 21: 57- 62.

21. Azouri H, Bidart JM, Bohuon C. In vivo toxicity of cisplatin and carboplatin on the Leydig cell function and effect of the human choriogonadotropin. Biochem Pharmacol. 1989; 38: 567-571.

22. Babu E, Gopalakrishnan VK, Sriganth IN, Gopalakrishnan R, Sakthisekaran D. Cisplatin induced nephrotoxicity and the modulating effect of glutathione ester. Mol Cell Biochem. 1995; 144:7-11.

23. Badary OA, Nagi MN, Al-Sawaf HA, Al-Harbi MM, Al-Bekairi AM. Effect of L-histidinol on cisplatin nephrotoxicity in the rat. Nephron. 1997; 77: 435-439.

24. Bamberger AM, Ivell R, Balvers M, Kelp B, Bamberger CM, Riethdorf L, Loning T. Relaxin-like factor (RLF): A new specific marker for Leydig cells in the ovary. Int J Gynecol Pathol. 1999; 18 (2): 163-8.

25. Bankroft JD, Gamble M. Theory and Histological Techniques. 5th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002. p. 436.

26. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stres in human spermatozoa. Hum Reprod. 2000; 15:1338-44.

27. Bashandy SA, Alhazza IM, Mubarak M. Role of zinc in the protection against cadmium induced hepatotoxicity. Int J Pharmacol. 2006; 2(1) : 79-88.

28. Batra N, Nehru B, Bansal MP. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. Reprod Toxicol. 1998; 12(5): 535–540.

29. Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia. 1994; 50(7): 626-640.

30. Belgemen T, Akar N: Çinkonun yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2004; 57(3): 161-166.

31. Bergh A, Ola C, Erik L. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. Biol Reprod. 2001; 64: 13–20.

32. Bergman RA, Afifi AK, Heidger PM. Histology. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996.

33. Berthelsen JG. Sperm counts and serum follicle stimulating hormone levels before and after radiotherapy and chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. Fertil Steril. 1984; 41(2): 281-6.

34. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB, Kal HB, Rooij DG. Apoptosis regulation in the testis: involvement of Bcl- 2 family members. Mol Repr Development. 2000; 56: 353- 359.

35. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis patern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. J Androl. 1998; 19:487- 497.

36. Bogin E, Marom M, Levi Y. Changes in serum, liver and kidney of cisplatin treated rats, effect of antioxidants. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1994; 32: 43-51.

37. Bompart G. Cisplatin induced changes on cytochrome P-450, lipid peroxidation and some P-450 related specific catalytic activities in rat liver. J Toxicol Clin Exp. 1990; 10:375-383.

38. Boran Ç, Ozkan U. The Effect of zinc therapy on damaged testis in pre- pubertal rats. Pediatr Surg Int. 2004; 20: 444–448.

39. Borch RF, Pleasants ME. Inhibition of cis-platinum nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in rat model. Proc Natl Acad Sci. 1979; 76: 6611-6614.

40. Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. Expert Opin Investig Drugs. 2009; 18: 1197-1218-Y2.

41. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. Free Radic Biol Med. 1990; 8(3): 281-91.

42. Carlson BM. Patten's Foundations of Embriyology. 6th Ed: Mcgraw-Hill Inc, 1996.

43. Carter MD, Hollander MB, Lipshultz LI. In the medicine cabinet, clues to infertility. Contemp Urol. 1993; 5: 51-63.

44. Chandra RK, Mcbean LD. Zinc and immunity. Nutrition. 1994; 10: 79-80.

45. Chase DJ, Payne AH. Changes in distribution and androgen production of Leydig cells of two population during sexual maturation in the rat. Endocrinology. 1983; 112: 29-34.

46. Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR. Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown Norway rat. J Androl. 1994; 15 (6): 551-557.

47. Cheurg TH, Chung TK, Lo KW. Apoptosis-related proteins in CIN and squamous cell carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol. 2002; 86(1): 14-8.

48. Chirina YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. Exp Tox Path. 2009; 61:223-242 -Y6.

49. Claveria C, Corbella R, Martin D, Diaz C. Protective effects of zinc on cadmium toxicity in rodents. Biol Trace Elem Res. 2000; 75(1-3): 19.

50. Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for renewal of spermatogonia. Am J Anat. 1962; 111: 111-29.

51. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. J Histochem Cytochem. 1997; 45: 923-934.

52. Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. Am J Surg Pathol. 1997; 21: 88- 101.

53. Çelik ÖK, Aras A, Tuğan D, Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M, Haydaroğlu A. Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. T Klin J Med Sci. 2004; 24:142-146.

54. Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-n-nonylphenol in rats: Number of Sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. Pharm Toxicol. 2002; 90 (2): 59.

55. David BM. Trace elements. In: Carl AB, Edward RA (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia. W. B. Sounders Company; 1999. p .1029-1055.

56. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and carcinogenicity. Mutat Res-Rev Gen Tox. 1988; 195: 45- 77.

57. Dellmann HD, Brown EM. Textbook of Veterinary Histology. 3rd ed. Philadelphia: Lea&Febiger; 1987. p. 286-312.

58. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. Cell Mol Life Sci. 2001; 58: 356- 370.

59. Deray G, Dubois M, Beaufils H, Cacoub P, Anouar M, Jaudon MC, Baumelou A, Jouanneau C, Jacobs C. Effects of nifedipine on cisplatinum induced nephrotoxicity in rats. Clin Nephrol. 1988; 30: 146-50.

60. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. Cardiol Clin. 2001; 19: 57-74.

61. Drasga RE, Einhorn LH, Williams SD, Pastel DN. Fertility after chemotherapy for testicular cancer. J CIin Oncol. 1983; 1: 179-183.

62. Dubskaia T, Vetoshkina TV, Goldberg VE. The mechanism of the hepatotoxicity of complex platinum compounds. Exp Clin Parmacol. 1994; 57:38-41.

63. Düzgüner V. Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda Çinkonun Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı, Hatay; 2005.

64. Eindhalmer CI, Eliasson R. Zinc and magnesium in human spermatozoa. Int Fertil. 1972; 17: 173-160.

65. Elgazar V, Razanov V, Stoltenberg M, Hershfinkel M, Huleihel M, Nitzan YB, Lunenfeld E, Sekler I, Silverman WF. Zinc-regulating proteins, ZnT-1, and metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. J Histochem Cytochem. 2005; 53(7): 905–912.

66. Elsenhans B, Kolb K, Schumann K, Forth W. The longitudional distribution of cadmium, zinc, copper, iron and metallothionein in the small intestinal mucosa of rats after administration of cadmium cloride. Biol Trace Element Res. 1994; 41: 31-46.

67. Erdemli E, Ergeneci D, Atahan Ş, Işıkay L. Cisplatinin sıçan böbrek ve testisleri üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası. 1999; 52:3.

68. Ergin M. Apoptosis. Arşiv. 2002; 11, 495-504.

69. Erol Ö, Kaan A. Klinik Androloji. Birinci Baskı. Ankara: AÜ Basımevi; 2000; 526-531.

70. Eşrefoğlu M: Genel ve Özel Histoloji. Malatya: Pelikan yayıncılık; 2004; 305-312.

71. Favier A. Is zinc a cellular mediator in the regulation of apoptosis? In: Bröther P, Collery PH, Etienne JC, Khassanova L, Libbey J, Negretti V eds. Metal Ions in Biology and Medicine. 1998; 5: 164-167.

72. Fawcett DW. The Cell: An atlas of Fine Structure. Philadelphia, London: W.B. Saunders Company; 1966.

73. Fawcett DW. Histology. 20th Ed. Chapman & Hall; 1994.

74. Florea AM, Büsselberg D. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. NeuroToxicology. 2009; 30:803–810.

75. Friberg L. Cadmium and the kidney. Environ Health Perspect. 1984; 54:1–11.

76. Friedlander RM, Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000; 1407: 770-776.

77. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol. 1992; 119: 493- 501.

78. Ge RS, Hardly MP. Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells. Endocrinology. 1998; 139: 3787-3795.

79. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP (2005) Gene expression in rat Leydig cells during development from the progenitor to adult. Biol Reprod. 2005; 104: 037499.

80. Goren MP. Cisplatin nephrotoxicity affects magnesium and calcium metabolism. Med Pediatr Oncol. 2003; 41:186-189.

81. Gotoh S, Mine M, Ishizaka K, Kaneoya H, Yokokawa M. Changes in lanthanum permeability of rat Sertoli cell tight junction after CDDP administration [in Japanese]. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. 1990; 81:45-48.

82. Goyer RA: Clarkson TW, Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons. 6th. Ed. USA : McGraw-Hill Companies Inc., Medical Publishing Division; 2001.

83. Greggi-Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. Protective effect of vitamin C against cisplatin induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: A dose dependent study. Pharmacol Res. 2000; 41:405-411.

84. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 1999; 13: 1899-1911.

85. Guitton N, Brovazin-Jousseaume V, Dupaix A, Jegou B, Chenal C. Radiation effect on rat Sertoli cell function in vitro and in vivo. Int J Radiat Biol. 1999;75: 327-33.

86. Gunn SA, Gould TC, Aderson WA, Gables C. Zinc in rat testis. Arch Pathol. 1963; 75:33-39.

87. Gülbahçe HE, Lindeland AT, Engel W. Metastatic leydig cell tumor with sarcomatoid differentiation. Arch Pathol Lab Med. 1999; 123:1104-1107.

88. Gürsoy E, Koptagel E. Embriyoloji Atlası: Esnaf Ofset Matbaacılık; 1997.

89. Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. J Reprod Immunol. 2002; 57: 3-18.

90. Handagama C, Ariyaratne S. Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis. Biol Reprod. 2001; 65: 660-671.

91. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. Cancer Ther. 2003; 1:47-61.

92. Hanneman J, Baumann K. Cisplatin induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxidants and radical scavengers. Toxicology. 1988; 51:119-132.

93. Hardly MP, Zirkin BR, Ewing LL. Kinetic studies on the development of the adult population of leydig cells in testes of prepubertal rat. Endocrinology. 1989; 124: 762-770.

94. Harima Y, Harima K, Shikata N. Bax and Bcl-2 expression predict response to radiotherapy in human cervical cancer. J. Cancer Res Clin. 1998; 124(9):503-10.

95. Harima Y, Nagata K, Harima K. Bax and Bcl-2 protein expression fallowing radiation therapy versus radiation plus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical cancer. Cancer. 2000; 88(1):132-8.

96. Harris ED. Cellular Transporters for zinc. Nutr Rev. 2002; 60(4):121-24.

97. Hassa O, Aştı RN. Embriyoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum Basın Yayın; 1997. s: 7-10.

98. Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve İvivo Laboratuar Uygulamaları. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi; 2003.

99. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: The effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. Pediatr Res. 1996; 40: 351- 356.

100. Hilton DA, Love S, Barber R. Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hibridization using digoxigenin-labeled poly-A oligonucleotide probs to detect thymidine-rich DNA sequences. J Histochem Cytochem. 1997; 42: 13-20

101. Huang HFS, Pogach LM, Nathan E, Giglio W. Acute and chronic effects of cisplatinum upon testicular function in the rat. J Androl. 1990; 11:436–445.

102. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anat Rec. 1978; 190: 905–906.

103. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonodal Cell Apoptosis. Recent Prog Horm Res. 1996; 51: 432- 45.

104. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J. Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. Biol Repr. 1999; 61: 393- 399.

105. Ivan D. Clinical evaluation of the infertile couple. In: Pathology of Infertility. Mosby- Year Book. 1993;7-42.

106. Ivell R. Biology of the relaxin-like factor (RLF). Rev Reprod. 1997; 2:133–138.

107. Ivell R, Bathgate RAD. Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). Biol Reprod. 2002; 67: 699-705.

108. Jacquillet G, Barbier O, Cougnon M, Tauc M, Namorado MC, Martin D, Reyes JL, Poujeol P. Zinc Protects Renal Function During Cadmium Intoxication in The Rat. Am J Physiol Renal Physiol. 2006; 290:127-137.

109. Jamba L, Nehru B, Bansal MP. Selenium supplementation during cadmium exposure: changes in antioxidant enzymes and the ultrastructure of the kidney. J Trace Elem Exp Med. 1997; 10:233–242.

110. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and Relevance to Urologists. Brit J Urol. 2000; 86: 598- 606.

111. Jıang HM, Han GA, Li BQ, Gao HF, Yu YN, Sun SA. Study on the Antagonism of Zinc and Selenium to Cadmium-Induced Lipid Peroxidation in Rats. Acta Academ Med Shandong. 1994; 32(2):25-129.

112. Johnson KE. Histology and Cell Biology. 2nd Ed. USA: Harwal Publishing Company; 1991. s. 295-304.

113. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. Cell Mol Life Sci. 2000;57:1229-1235.

114. Junqueira LC, Carneiro J (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S). Temel Histoloji. 10th Ed. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 2006:431-47.

115. Jurczuk M, Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Gaaz M. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. Food Chem Toxicol. 2004; 42: 429–438.

116. Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. Hum Exp Toxicol. 2004; 23:29–34.

117. Kakava K, Shikone T, Otani T. Apopitosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell cancer and adenocancer of the uterine cervix. Cancer. 1999; 15:85(8):1799- 809.

118. Karataş S. Sıçanlarda Kadmiyum Klorür'ün (CdCl2) Testis Dokusuna Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Subat (1998).

119. Kaya Dağıstanlı F, Süsleyici Duman B, Öztürk M. Protective effects of a calcium channel blocker on apoptosis in thymus of neonatal STZ-diabetic rats. Acta Histochem. 2005; 107(3):207-14.

120. Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö. Özel Histoloji Ders Notları. Adana, ÇÜ Tıp Fak Yay, 2006.

121. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Güneş Kitabevi. 1994; 1: 1047.

122. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şirketi, 1998. Cilt 1-2.

123. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli G. İnsan Embriyolojisi. 7. Baskı. İstanbul: Alfa Basım Yayım Dağıtım; 1992.

124. Kazos EA, Stalikas CD, Nanos CG, Konidari CN. Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. Chemosphere. 2007; 68(11): 2104-10.

125. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26: 239-257.

126. Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. J Reprod Fertil. 1992; 95: 825- 830.

127. Khynriam D, Prasad SB. Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. Mutat Res-Fund Mol M. 2003; 526: 9-18.

128. Klaassen DC. Casarett and Doull's Toxicology. 5th Ed. USA: The Mc Graw Hill Companies; 1996: 437-438.

129. Klaassen DC. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10. Baskı. USA: McGraw-Hill Companies Inc. Medical Publishing Division; 2001. p.700-751.

130. Klonisch T, Kauffold J, Steger K, Bergmann M, Leiser R, Fischer B, Klonisch S (2001) Canine relaxin-like factor: Unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. Biol Reprod. 2001; 64: 442-450.

131.Knight RJ, Collis MG, Yates MS, Bowmer CJ. Amelioration of cisplatin- induced acute renal failure with 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. Br J Pharmacol. 1991; 104: 1062-1068.

132. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death (Review). Trends Genet. 1995; 11: 101- 105.

133. Krinke GJ. The Laboratory Rat. 1st Ed. Switzerland: Academic Press; 2000. s: 150-152, 311-312.

134. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Rev Met. 2008; 44(3):205- 21.

135. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Köhler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. Arch Toxicol. 1998; 72:536-540.

136. Kukner A, Oner J, Oner H, Ozan E. Effect of the vitamin E on expression of apoptosis- related proteins in immobilized rat testis. J Anim Vet Adv. 2010; 9(1): 180-185.

137. Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. J Biol Chem. 2002; 277(35): 31283-6.

138. Kuran O. Sistematik Anatomi. İstanbul: Filiz Kitabevi; 1983. p. 512-4.

139. Kuş İ, Zararsız İ, Akpolat N, Ögetürk M, Kuş MA, Özen OA, Sarsılmaz M. Deneysel formaldehit zehirlenmesinde omega-3 yağ asitlerinin testislerdeki antiapoptotik etkileri. Fırat Tıp Dergisi. 2008; 13(3) :162-166.

140. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E. TUNEL Apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. J Histochem Cytochem. 1998; 46: 327-334.

141. Lange PH, Narayan F, Vogelzang NJ, Shafer RB, Kennedy BJ, Fraley EL. Return of fertility after treatment for nonseminomatous testicular cancer: changing concepts. Urol. 1983; 129:1131-1135.

142. Lawen A., Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. Curr Opin Struct Biol. 2000; 10: 649-55.

143. Le Blanc GA, Waxman DJ. Feminization of rat hepatic P-450 expression by cisplatin. J Biol Chem. 1988; 263:15732-15739.

144. Leeson CR, Leeson TS. Histology. 4th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1981.

145. Leibbrandt MEI, Grushenka HIW, Metz AL, Oziba AA, Haskins JR. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat proximal tubule cells. Kidney Int. 1995; 48:761-770.

146. Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. Int Urol Nephr. 1999; 31(3): 361- 370.

147. Liu Y, Franklin RB, Costello LC. Prolactin and testosterone regulation of mitochondrial zinc in prostate epithelial cells. Prostate. 1997; 30: 26-32.

148. Liu J, Liu Y, Habeebu SSM, Klaassen CD. Metallothionein (Mt)-null mice are sensitive to cisplatin induced hepatotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 1998; 149: 24-31.

149. Madasu R, Ruckenstein MJ, Leake F, Steere E, Robbins T. Ototoxic effects of supradose cisplatin with sodium thiosulfate neutralization in patients with head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997; 123:978-981.

150. Meijerink JPP, Mensink EJBM, Sedlak TW, Slöetjes AW, Wang K, Witte T at al. Heamatopoietic malignancies demont rate loss of function mutations of BAX. Blood. 1998; 91:2991-7.

151. Maines MD, Mayer RD. Inhibition of testicular cytochrome P-450-dependent steroid biosynthesis by cis-platinum. J Biol Chem. 1985; 260: 6063-6068.

152. Maines MD, Sluss PM, Mumtaz I. Cis-platinum-mediated decrease in serum testosterone is associated with depression of luteinizing hormone receptors and cytochrome P-450 SCc in rat testis. Endocrinology. 1990; 126: 2398-2406.

153. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. Comp Biochem Physiol Part C. 2002; 132:123-128.

154. Meistrich ML, Finch M, Da Cunha MF, Hacker U, Au WW. Damaging effects of 14 chemotherapeutic drugs in mouse testis cells. Cancer Res. 1982; 42: 122-131.

155. Meistrich ML, Chawla SF, Da Cunha MF, Johnson SL, Plager C, Papadopoulos NE, Lipshultz LI, Benjamin RS. Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. Cancer. 1989; 63: 2115-2123.

156. Meistrich ML, Wilson G, Mathur K, Lillian MF, Rodriguez MA, McLaughlin P, Hagemeister FB. Rapid recovery of spermatogenesis after mitoxantrone, vincristine, vinblastine, and prednisone chemotherapy for Hodgkin's disease. J Clin Oncol. 1997; 15: 3488–3495.

157. Mills RG. The pathological changes in the rat testes in epidemic pneumonia. J Exp Med, 1919; 30: 505 – 529.

158. Molenaar R, Rooij DG, Rommerts FFG, Vander Molen HJ. Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not follicle stimulating hormone. Endocrinology. 1986; 118: 2546-2554.

159. Mora LO, Antenus LMG, Francescato HDCF, Bianchi MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells. Mutat Res. 2002; 518: 65-70.

160. Mozetti S, Ferrandina G, Morore M. Expression of Bcl-2, Bax and Bcl-xl in endometrial and cervical tissue. Cancer Detect Prev. 2000; 24(6): 536-41.

161. Muppidi J, Porter M, Siegel RM. Measurement of apoptosis and other forms of cell death (Review). Curr Protoc Immunol. 2004; 3(3): 17.

162. Nefic H. Anticlastogenic effect of vitamin C on sisplatin induced chromosome aberration in human lymphocyte cultures. Mutat Res. 2001; 498: 89-98.

163. Nieschlag E, Wickings EJ, Mauss J. Endocrine testicular function in vivo and in vitro in infertile men. Acta Endocrinol. 1979; 90: 544–51.

164. Nonomura M, Okada K, Hida S, Yoshida O. Does a gonodotropin-releasing hormone analogue prevent cisplatininduced spermatogenic impairment? Urol Res. 1991; 19: 135-140.

165. Nozu K, Dufau ML, Catt KJ. Estradiol receptor-mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. J Biol Chem. 1981; 256 (4); 1915- 1922.

166. Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. Am J Anat 1956; 99: 391-413.

167. Oltvai ZN, Miliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a concerved homolog Bax that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74: 609-19.

168. Orisakwe OE, Afonne OJ, Nwobodo E, Asomugha L, Dioka CE. Low dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. Eur J Obstet Reprod Biol. 2001; 95(1): 92-6.

169. Orrenius S, Zhivotovsky B, and Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium- apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4: 552-565.

170. Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. Anat Rec. 1982; 203 (4): 485-92.

171. Otalla M, Suomalainen L, Pentikainen MO, Kovanen P, Tenhunen M, Erkkila K et al. Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. Biol Reprod. 2004; 70: 759-67.

172. Özalpan A. Temel Radyobiyoloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları; 2001. p. 1-218.

173. Öztürk M. editör: Yılmazer S, Öztürk M. Işık Mikroskopide İmmünoişaretleme Yöntemleri. Uygulamalı Ultrastruktürel İmmunohistokimya Kurs Kitapcığı: p48-74, 6- 8 Mayıs 1998 İstanbul.

174. Öztürk F. Apopitoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9 (2): 143-148.

175. Özyurt H, Sögüt S, Yılmaz HR, Kotuk M, Akyol Ö, Yıldırım Z. Sıçanlarda sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede plazma SOD, ADA ve XO enzim aktiviteleri ile MDA, NO düzeyleri ve bunlar üzerine CAPE'nin etkileri. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kongre Özet Kitabı: s.439, 24-27 Haziran 2002, Ankara.

176. Pagano G, de Biase A, Deeva IB, Degan P, Doronin YK, Laccarino M, Oral R, Korkina LG. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. Life Sci. 2001; 68: 1735-1749.

177. Perk H, Şahin A, Bedük Y, Durak İ. İnfertil hastalarda çinko sülfat tedavisi ve sonuçlarının değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi. 1990; 8(6): 549-551.

178. Petering DH, Loftsgaarden J, Schneider J, Fowler B. Metabolism of Cadmium, Zinc and Copper in the Rat Kidney: The Role of Metallothionein and Other Binding Sites. Environ Health Persp. 1984; 54: 73-81.

179. Petorak İ. Medikal Embriyoloji. İstanbul: Beta Basım Dağıtım A.Ş; 1986. P. 220-3.

180. Pogach LM, Lee Y, Goıild S ve ark. Characterization of cis-platinum-induced Sertoli cell dysfunction in rodents. Tox App Pharm. 1989; 98:350-361.

181. Powell SR. The Antioxidant properties of zinc. J Nutr. 2000; 130(5): 1447-1454.

182. Prasad SA. Zinc: An overview. Nutrition. 1995; 11(1): 93-99.

183. Prasad SA, Mantzoros CS, Berk FWJ, Hess JN, Brewer GJ. Zinc status and serum testosterone levels of healthy adults. Nutrition. 1996; 12(5):344-8.

184. Purvis K, Clausen OPF, Hansson V. LH Contamination may explain FSH effect on rat Leydig cells. J Reprod Fertil. 1979; 56: 657-665.

185. Rich KA, Kretser DM. Effect of differing degrees of destruction of the rat seminiferous epithelium on levels of FSH and androgen binding protein. Endocrinology. 1977; 101:959–74.

186. Rich KA, Kerr JB, Kretser DM. Evidence for Leydig cell dysfunction in rats with seminiferous tubule damage. Mol Cell Endocrinol. 1979; 13: 123–35.

187. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. Embo J. 1997; 24: 2262- 2270.

188. Rosen RC, Kostis JB, Jekelis AW. Beta-blocker effects on sexual function in normal males. Arch Sex Behav. 1988; 17: 241-55.

189. Rostan EF, DeBuys HV, Madey DL, Pinnel SR. Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. Int J Dermatol. 2002; 4: 606-11.

190. Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. Urol Clin North Am. 1995; 22(1):107-8.

191. Russell LD, Etlin AR, Hikim APS at Clegg ED. Histological and histopatological evaluation of the testis. St. Louis: Cache River Press; 1990. p. 286.

192. Russell LD, Russell JA. Short- term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. Am J Anat. 1991; 192: 142- 168.

193. Russell LD, De Franca LR, Hess R, Cooke P. Characteristics of mitotic cells in developing and adult rat testes with observations on cell lineage. Tissue Cell. 1995; 27: 105-128.

194. Sadler TW (Çeviri: Başaklar C). Langman's Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık; 1996: 273-4.

195. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 8th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

196. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Change of lipid peroxide levels in rat tissues after cisplatin administration. Tox Lett. 1991; 57: 159-166.

197. Saner G, Neyzi O, Ertuğrul T. Mikroelementler (Çinko). 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. p. 174-175.

198. Santovito G, Irato P, Piccinni E, Albergoni V. Relationship between metallothionein and metal contents in red–blooded and white-blooded antarctic teleosts. Polar Biol. 2000; 23: 383-391.

199. Sawhney P, Gıammona CJ, Meıstrıch ML and Rıchburg JH. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J mice. Journal of Andrology. 2005; 26: 1.

200. Schmieder RE, Rockstroh JK, Messerli FH. Anti-hypertensive therapy: to stop or not to stop? JAMA. 1991; 265: 1566-71.

201. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews. 1993; 14:133- 144.

202. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanism of cytochrome C release by proapoptotic Bcl-2 family members. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 304: 437- 444.

203. Seaman F, Sawhney P, Giammona CJ, Richburg JH. Cisplatin- induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. Apoptosis. 2003; 101–108.

204. Seikh-Hamad D, Timmins K, Jalali Z. Cisplatin induced renal toxicity: possible reversal by N-cotylcysteine treatment. J Am Soc Nephrol. 1997; 8: 1640-1644.

205. Sharpe RM. Regulation of Spermatogenesis, in the Physiology of Reproduction. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven. New York: Raven Press; 1994. p. 1364- 1434.

206. Sheikh-Hamad D, Cacini W, Buckley AR, Isaac J, Truong LD, Tsao CC, Kishore BK. Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. Arch Toxicol. 2004; 78: 147-155.

207. Shetty G, Meistrich ML. Hormonal apporoaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. J Natl Cancer Inst Monogr. 2005; 34: 36-9.

208. Shimada H, Nagano M, Yasutake A, Imamura Y. Wistar-Imamichi Rats Exhibit a Strong Resistance to Cadmium Toxicity. J Health Sci. 2002; 48 (2): 201-203.

209. Simon B, Lee SJ, Partridge AH, Runowicz CD. Preserving fertility after cancer. Cancer J Clin. 2005; 55: 211-28.

210. Simula AP, Priestly BG. Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three in vivo assays. Mutat Res-En Mut RS. 1992; 271: 49-58.

211. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. J Clin Endoc and Metab. 1998; 83: 152.

212. Snell RS. Clinical anatomy. 3rd ed. Boston: Brown and Company; 1986. p. 168-75.

213. Sögüt S, Özyurt H, Kotuk M, Yılmaz HR, Yıldırım Z, Akyol Ö. Sıçanlarda Cisplatinle oluşturulan nefrotoksisitede plazma SOD, ADA, XO aktiviteleri ile MDA ve NO düzeyleri üzerine erdosteinin etkisi. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kongre Özet Kitabı: p24-27, 2002, Ankara.

214. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem. 2000; 69: 217-45.

215. Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Eur J Pharmacol. 2002; 451:203–8.

216. Suziki T, Suziki K, Nakajima K, Otaki N, Yamanaka H. Metallothionein in human seminal plasma. Int J Urol. 1994; 1(4): 345-348.

217. Şahintürk V, Güçlü C, Bayçu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. Asian J Androl. 2007; 9(1): 117–124 .

218. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü Baskı. Ankara: Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti; 1998.

219. Tal R, Botchan A, Hauser R, Yogev L, Paz G, Yavetz H. Follow-up of sperm concentration and motility in patients with lymphoma. Hum Reprod. 2000; 15(9):1985-8.

220. Tanimoto A, Hamada T, Higashi K, Sasaguri Y. Distribution of cadmium and metallothionein in CdCl2-exposed rat kidney: Relationship with apoptosis and regeneration. Pathol Int. 1999; 49(2): 125.

221. Tanyel FC. A reevaluation of the mechanism of testicular descent: reasons for failed descent or ascent. J Pediatr Surg. 2000; 35:1147-9.

222. Tanyolaç A. Özel Histoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum Basın Yayın; 1999. s: 132-143.

223. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. Mol Endocrinol. 1993; 7(5):643- 50.

224. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahedi N, Kroemer G.Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. Methods Mol Biol. 2008; 445: 29-76.

225. Taylor MF, Boer-Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, Morris ID. Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethane sulfonate to the adult male rat is a fas-mediated process. Endocrinology. 1999; 140:3797-3804.

226. Teerds KJ, Closset J, Rommerts FFG, De Roij DG, Stocco DM, Colenbrander B, Wensing CJG, Hennen G. Effects of pure FSH and LH preparationson the number and function of Leydig cells in immature hypophysectomized rats. J Endocrinol. 1989; 120: 97-106.

227. Teerds KJ, De Rooij DG, De Jong FH, Van Haaster LH. Development of the adult type leydig cells cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. Biol Reprod. 1998; 59: 344-350.

228. Teerds KJ, Boer-Brouwer M, Dorrıngton HJ, Balvers M, Ivell R. Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. Biol Reprod. 1999; 60(6): 1437-45.

229. Theneshkumar S, Lorito G, Giordano P, Petruccelli J, Martini A, Hatzopoulos S. Effect of noise conditioning on cisplatin-induced ototoxicity: a pilot study. Med Sci Monit. 2009; 15: 173-177.

230. Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. T Klin J Med Sci. 2003; 23: 499- 508.

231. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. JNIH Res. 1991; 3: 75.

232. Tunçdemir M, Öztürk M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. J Mol Histol. 2008; 39(6): 605-16.

233. Uehara T, Watanabe H, Itoh F, Inoune S, Koshida H, Nakamura M, Yamate J, Maruyama T. Nephrotoxin of a novel antineoplastic platinum complex, nedaplatin: a comparative study with cisplatin in rats. Arch Toxicol. 2005; 79: 451-460.

234. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol Rev. 1993; 73: 79-118.

235. Van Geelen CM, De Vries EG, Le TK, Van Weeghel RP, De Jong S. Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD 95 receptor in colon carcinoma cell lines. Br J Cancer. 2003; 89: 363-73.

236. Vickers AEM, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. Kidney slices of human and rat to charactarize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. Toxicol Pathol. 2004;32: 577-590.

237. Waalkes MP. Cadmium Carcinogenesis in Review. J Inorg Biochem. 2000; 79(1-4): 241-244 .

238. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. (1988). Pattern of cell death. Methods Arhieve Exp Pathol. 1988; 13: 18-54.

239. Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker PJ. Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s. Environ Health Persp Suppl. 1994; 102(2).

240. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stres is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. Fertil Steril. 2003; 80: 531-5.

241. Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L. The Immunobiology of Zinc. Immunol Today. 1997; 18(11): 519- 52.

242. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De Velde C, Cornelisse CJ, Van Dierendock JH. A new motheod to detect apoptosis in parafin sections: In situ endlabelling of fragmanted DNA. J Histochem Cytochem. 1993; 41: 7-12.

243. Xu DX, Zhu QX, Zheng LK, Wang QN, Shen HM, Deng LX, Ong CN. Exposure to acrylonitrile induced DNA strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa. Mutat Res Genc Tox Env. 2003; 537: 93-100.

244. Yılmaz HR, Söğüt S, Özyurt H, Iraz M, Yıldırım Z, Akyol Ö. Sıçanlarda sisplatinle oluşturulan nefrotoksisitede metabolik enzim aktivitelerine kafeik asit fenetil ester'in etkisi. Van Tıp Dergisi. 2004; 11(1): 1-6.

245. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. J Androl. 1997; 18: 159-165.

246. Zhang X, Yamamota N, Soramoto S, Takenaka I. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testis. Arch Andrology. 2001; 46: 43-49.

247. Zicca A, Cafaggi S, Mariggio MA, Vanonozzi MO, Ottone M, Bocchini V, Caviglioli G, Viale M. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. Eur J Pharmacol. 2002; 442: 265-272.

248. Zunino F, Pratesi G, Micheloni A, Cavaletti E, Sala F, Tofanetti O. Protective effect of reduced glutathione against cisplatin induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug. Chem Biol Interact. 1989; 70: 89-101.

9. EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARLARI

Karar Sayısı: 2010-081	**Karar Tarihi: 30/09/2010**

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Aydan CANBİLEN ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Burcu GÜLTEKİN tarafından sunulan "*Sisplatin toksitesinin sıçan testisinde yarattığı histolojik değişimlere çinkonun etkisinin araştırılması*" başlıklı doktora tezi sekiz üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede belirtilen dört grubun sisplatin uygulanacak iki grubunda 12'şer, kontrol ve kontrol+çinko gruplarında ise 8'er olmak üzere toplam 40 sıçanın kullanılacağı, yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde "Başvuru Sahibinin Sorumlulukları" başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6da belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK Başkan	Prof.Dr.Lema TAVLI Üye	Prof.Dr.Said BODUR Üye	Prof.Dr.A.SaideŞAHİN Üye-Katılmadı
Prof.Dr.Faruk Ayhan BAŞÇİFTÇİ Üye-İzinli	Doç.Dr.Nilsel OKUDAN Üye-İzinli	Doç.Dr.H.Serdar GERGERLİOĞLU Üye	Doç.Dr.Mehmet GÜL Üye
Dr. M.Metin ŞENER Üye	Muammer GÜLKAYA Üye	Mustafa ŞİRİN Üye	

10. ÖZGEÇMİŞ

Burcu Gültekin 1978 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 2000 yılında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden mezun oldu. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji laboratuvarına uzman olarak atandı. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Histoloji – Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında yine aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.