

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PAKLİTAKSEL'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Pınar BİLGİCİ**

**Danışmanlar
1. Prof. Dr. Birkan YAKAN
2. Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PAKLİTAKSEL'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Pınar BİLGİCİ**

**Danışmanlar
1. Prof. Dr. Birkan YAKAN
2. Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TLY-2016-6810 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**OCAK 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Pınar BİLGİCİ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Paklitaksel’in Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Resveratrol’ün Koruyucu Etkisinin İncelenmesi”Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Pınar BİLGİCİ

Danışman

1. Prof.Dr. Birkan YAKAN

2. Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Birkan YAKAN

Prof. Dr. Birkan YAKAN ve Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU danışmanlığında **Pınar BİLGİCİ** tarafından hazırlanan “**Paklitaksel’in Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Resveratrol’ün Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2018

JÜRİ

İmza

1. Danışman : Prof.Dr. Birkan YAKAN (Histoloji Embriyoloji AD)
2. Danışman : Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU (Histoloji Embriyoloji AD)
- Üye : Doç. Dr. Arzu YAY
- Üye : Yrd. Doç. Dr. Tülay MORTAŞ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, planlanmasında, yürütülmesinde ve lisansüstü eğitimim boyunca bana göstermiş olduğu hoşgörü, saygı ve yardımseverliğinden ötürü değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Birkan YAKAN' a ve Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU' na, yüksek lisans eğitimim aşamalarında kaliteli ve seviyeli bir ortam içerisinde benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarımız Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR' a ve bölüm hocalarımız Doç. Dr. Arzu YAY, Yrd. Doç. Dr. Derya KARABULUT ve tez çalışmamın deneysel aşamasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Emin KAYMAK, Betül YALÇIN, Emel ÖZTÜRK ve Ayça KARA' ya ve diğer bölüm arkadaşlarıma, Kapadokya MYO'daki çalışma arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince sevgilerini, maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen, bana bu yolda göstermiş oldukları destek ve davranışlarıyla her zaman gurur duyduğum canım iki anneme ve kıymetli eşim Taner'e ve dünyalar güzeli kızım Elif Azra'ya

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürler...

Pınar BİLGİCİ

PAKLİTAKSEL’İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE RESVERATROL’ÜN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Pınar BİLGİCİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2018

Danışman: Prof.Dr. Birkan YAKAN ve Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU

ÖZET

Kemoterapi ilaçlarının; spermatogenez, sperm kalitesi ve kan-testis bariyerine verdiği zararlar sonucu infertiliteye neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Resveratrol, patojenik mikroorganizmalara karşı bitkilerce sentezlenen polifenolik bir fitoaleksindir. Bu çalışmada bitkisel tedavi süreci ile kemoterapi ilaçlarının birlikte kullanılmasının hastaya sağlayacağı fayda ve zararları belirlemek için, erkek genital sistemi üzerinde paklitakselin meydana getirdiği hasarın Resveratrol (RES)’ ün koruyucu etkisiyle azaltılması amaçlanmıştır.

Çalışmada Wistar albino erkek sıçanlar her grupta 10'ar hayvan olacak şekilde kontrol, paklitaksel (PAC) (10mg/kg), resveratrol (RES) (10mg/kg) ve paklitaksel+resveratrol (PAC+RES) (10mg/kg -10 mg/kg) olarak 4 gruba ayrıldı. Dekapitasyon işleminden sonra testis dokusu çıkarıldı, rutin histolojik doku takibi yöntemi uygulandı. Dokuların genel yapı ve özelliklerinin belirlenmesi için Hematoksilen-Eozin ve apoptozisi değerlendirmek için TUNEL metodu kullanıldı. Biyokimyasal parametre olarak testis dokusunda malondialdehyde (MDA), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) değerlerine bakıldı.

Sonuç olarak, dokular histopatolojik olarak değerlendirildiğinde diğer gruplardan farklı olarak PAC grubunda germinal epitelde düzensizlikler ve nekrotik tübüllerin sayısında artış, intersitisyel bağ dokusu alanlarında genişleme ve hemoraji gözlemlendi. TUNEL yöntemi sonuçlarına göre PAC grubunda TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol, RES ve PAC+RES gruplarıyla kıyaslandığında artış gösterdi. Bu sonuçlar; testis dokusunda PAC' in oluşturduğu oksidatif stresin RES' ün meydana getirdiği antioksidan etkiyle azaltılabileceğini gösterdi. Testis dokusundaki MDA, CAT ve SOD değerleri biyokimyasal açıdan değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Paklitaksel, Resveratrol, Testis, Sıçan

**A RESEARCH ON EFFECTS OF RESVERATROL ON RAT TESTICAL TISSUES WHICH
WAS DAMAGED WITH PACLITAXEL**

Pınar BİLGİCİ

**Erciyes University, Institute of Medical Sciences Department of Histology and Embryology
MSc Thesis, Ocak 2018**

Supervisor: Prof. Dr. Birkan YAKAN and Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU

ABSTRACT

Cancer, defined as the disease of genes controlling the multiplication, differentiation and death of cells, is one of the most important human health problems. Chemotherapy drugs; spermatogenesis, sperm quality and damage to the blood-testis barrier have been shown to result in infertility. Resveratrol is a polyphenolic phytoalexin synthesized by plants against pathogenic microorganisms. In this study, it was aimed to reduce the damage caused by paclitaxel (PAC) on the male genital system by the protective effect of Resveratrol (RES), in order to determine the benefits and harms that would be provided to the patient by the combination of herbal treatment process and chemotherapy drugs.

In the study, Wistar albino rats were divided into 4 groups as control, paclitaxel (PAC) (10 mg / kg), resveratrol (RES) (10 mg / kg) and paclitaxel + resveratrol (PAC + RES) (10 mg / kg-10 mg / kg). After the decapitation procedure, testicular tissue was removed and a routine tissue follow-up procedure was performed. General structure and properties determination for Hematoxylin-Eosin and apoptosis evaluate was used to the TUNEL method. Malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) values were measured as biochemical parameters.

As a result, when MDA, CAT and SOD values were evaluated biochemically, there was no significant difference between the groups. Histopathologically, the number of germinal epithelial irregularities and necrotic tubules was increased in the PAC group, unlike the other groups. According to the results of the TUNEL method, the number of tunellite-positive cells in the PAC group increased when compared to all other groups. These results; the oxidative stress of PAC linings in the testicles could be reduced by the antioxidant effect of resveratrol

Keywords: Paclitaxel, Resveratrol, Testes, Rat

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.TESTİS.....	3
2.1.1. Testis Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Testis Anatomisi	6
2.1.3. Testis Histolojisi	8
2.1.3.1. Seminifer tübüller	10
2.1.3.2. Sertoli Hücreleri.....	10
2.1.3.3. Spermatojenik hücreler	11
2.1.3.4. İnterstisyel Alan ve Leydig hücreleri	13
2.1.4. Erkek Üreme Sistemi Fizyolojisi.....	14
2.2. Paklitaksel	15
2.2.1.Hücre Döngüsünü Bloke Etmek	16
2.2.2. Apoptozis.....	17
2.3. Resveratrol	17

3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1.1. Doku Takibi.....	20
3.1.2. Hematoksilen - Eozin Boyama.....	20
3.1.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru.....	21
3.1.4. TUNEL Yöntemi.....	22
3.1.5. Biyokimyasal Analizler.....	22
3.1.5.1. Malondialdehit (MDA) düzey tayini	22
3.1.5.2. Süperoksit dismütaz (SOD) aktivite tayini.....	23
3.1.5.3. Katalaz (CAT) aktivite tayini	23
3.1.6. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	24
4.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru Sonuçları.	24
4.3. TUNEL Değerlendirmesi	30
4.4. Biyokimyasal Bulgular.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
6. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ABP:	Androjen bağlayıcı protein
CAT :	Katalaz
DEKAM :	Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
DOX:	Doxorubicin
ELİSA :	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FDA :	Food and Drug Administration
FSH:	Folikül stimüle edici hormon
H&E :	Hematoksilen & Eozin
ip :	İntraperitoneal
JTBS :	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru
LH:	Lüteinize edici hormon
MDA :	Malondialdehit
MIS:	Müllerian inhibe edici hormon
MTX:	Metotreksat
PAC:	Paklitaksel
PBS:	Fosfat buffer saline
RES:	Resveratrol
ROS:	Reaktif oksijen türevleri
SF :	Serum fizyolojik
SOD :	Süperoksit dismutaz
TDF:	Testis belirleyici faktör Triphosphate
TUNEL :	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Paklitakselin organik çözücülerdeki çözünürlük değerleri (46)	16
Tablo 3.1.	Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği.....	20
Tablo 3.2.	Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği.....	21
Tablo 4.1:	Johnsen Testiküler Biyopsi Sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.....	30
Tablo 4.2:	Apoptotik Hücre Sayım Sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.....	31
Tablo 4.3:	Doku örneklerinde ortalama CAT, SOD ve MDA ölçüm sonuçları.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:	Testis organ gelişim evrelerinin şematik diyagramı	5
Şekil 2.2:	Farklılaşmamış Gonadın Testise Dönüşmesi.....	7
Şekil 2.3:	Erkek üreme sistemi	8
Şekil.2.4:	Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizim	11
Şekil 2.5:	Seminifer tübüllerin bir parçası.	9
Şekil 4.1:	Kontrol grubuna ait testis dokusu	27
Şekil 4.2:	Kontrol grubuna ait testis dokusu.....	27
Şekil 4.3:	PAC grubuna ait testis dokusu.	28
Şekil 4.4:	PAC grubuna ait testis dokusu.....	29
Şekil 4.5:	PAC+RES grubuna ait testis dokusu.....	30
Şekil 4.6:	PAC+RES grubuna ait testis dokusu.....	30
Şekil 4.7:	RES grubuna ait testis dokusu.....	31
Şekil 4.8:	RES grubuna ait testis dokusu.....	32
Şekil 4.9:	Kontrol grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama.....	32
Şekil 4.10:	PAC grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama.....	33
Şekil 4.11:	PAC+RES grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama.....	33
Şekil 4.12:	RES grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama.....	34

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kemoterapotik ajanlar çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmakta olup; alkilleyiciler, antimetabolitler, mitotik inhibitörler, antibiyotikler, enzimler, hormonlar ve hormon antagonistleri gibi çeşitli kategorilere ayrılırlar ve bu ajanların etki mekanizmaları birbirinden farklıdır (1).

Paklitaksel meme, ovaryum, akciğer, baş-boyun ve özofagus kanserleri gibi epitelyal orjinli kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan taksan grubu bir kemoterapotik ajandır. Son zamanlarda lenfoma ve germ hücreli tümörler gibi genç yaşta ortaya çıkan kanserlerin tedavisinde de başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Paklitaksel anti-tümör özelliğini mikrotübüller üzerinden göstermektedir. Mikrotübüller, α ve β alt ünitelerinden meydana gelir, tubulin heterodimerlerinin dinamik bir denge içinde polimerleşmesinden oluşan hücresel submikroskobik yapılardır. Bu yapılar, esas olarak hücre bölünmesi sırasında mitotik apareyin oluşumunda rol oynamakla birlikte; hücre içi transport, sinyal iletimi, hareket yeteneği ve hücre şeklinin korunmasını içeren çok sayıda vital interfaz reaksiyonlarından da sorumludurlar. Paklitaksel hücresel tubulin yapısına bağlanıp, hücre bölünmesi ve diğer hücresel fonksiyonlarda önemli bir kademe olan mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübül yapısını stabil hale getirmektedir (2,3). Bunun sonucu olarak, hücrelerin G2/M fazında birikmesi ile hücre siklusu bloke olmaktadır ve böylece kontrolsüz bir şekilde çoğalan kanserli hücrelerin bölünmesi durdurulmaktadır (3).

Son verilere göre, özellikle etkili bir antikanser ajan olan paklitakselin tek hedefi tubulin yapısı değildir. Aynı zamanda, apoptoz işlemini bloke eden bcl-2 adında bir proteine de bağlanmaktadır. Bu nedenle PAC, bölünen hücrelerin ortadan kaldırılması üzerinde çift yönlü bir rol üstlenmektedir. Birincisi, toplanmış mikrotübülleri stabilize etmesi ve

böylece mitozu duraklatmasıdır. İkincisi de, bcl-2'yi inhibe etmesi ve apoptozun ilerlemesine izin vermesidir (4).

Kemoterapi ilaçlarının veriliş amacı, hızla bölünen kanserli hücrenin bölünmesini engellemektir. Ancak ilaç, hızlı olarak bölünen malign hücreler yanında bağırsak ve ağız mukoza epiteli, kemik iliğinin hematopoietik hücreleri, kıl folikülü hücreleri, testisin germinatif epiteli, embriyo ve fetüs hücreleri gibi normal yapıdaki hücrelerdeki bölünmeyi de engeller. Bu nedenle kemoterapi ilaçlarının tedavi edici etkisinin yanı sıra ağrı, yorgunluk, bulantı-kusma, ruhsal değişiklikler, iştahsızlık, nefes darlığı, cilt ve tırnaklarda değişiklikler, ağızda yara, ellerde uyuşma gibi yan etkilere neden olduğu yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir (5,6). Bunun yanı sıra kemoterapi ilaçlarının; spermatogenez, sperm kalitesi, germ hücreleri ve kan-testis bariyerine verdiği zararlar ile erkek bireylerde infertiliteye neden olduğuda bilinmektedir (7).

Kemoterapi uygulanan hastalarda, kemoterapinin oksidatif stres artışına ve antioksidanlarda kayba yol açabildiği bildirilmiştir. Bu nedenle kemoterapi sırasında antioksidan etkili maddelerinde kullanılması tavsiye edilmektedir (8).

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engellemeleri yanında protein, nükleik asitler ve karbonhidratların korunmasını sağlarlar. Serbest radikaller ve reaksiyon ürünleri biyomoleküller, fagositler ve myofibroblastların aktivitelerini artırır (2). Resveratrol (RES); travmatik zedelenme, UV ışığına maruz bırakılma ya da mantar enfeksiyonuna yanıt olarak bazı bitkiler tarafından sentezlenen non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir (9,10). Fitoaleksinler, patojenik mikroorganizmalara karşı bitkiler tarafından korunma amaçlı sentezlenen kimyasal maddelerdir, bu maddelere bitkisel antibiyotikler de denilebilir (9-11). Yapılan çeşitli çalışmalarda RES'ün lipid peroksidasyonunu azalttığı, miyokardiyal hasarı onardığı, nöroprotektif etki gösterebildiği ileri sürülmektedir (2,12-14).

Kanserde, klasik tedavi yöntemlerinin yanı sıra, özellikle bitkisel kökenli maddelerin kullanıldığı tamamlayıcı tedavi yöntemleri de günümüzde denenmektedir. Biz de bu yeni tedavi yöntemlerinden yola çıkarak, kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılan PAC'in testis üzerinde oluşturması muhtemel hasarlarının RES kullanarak ne kadar önlenileceğini araştırmak istedik.

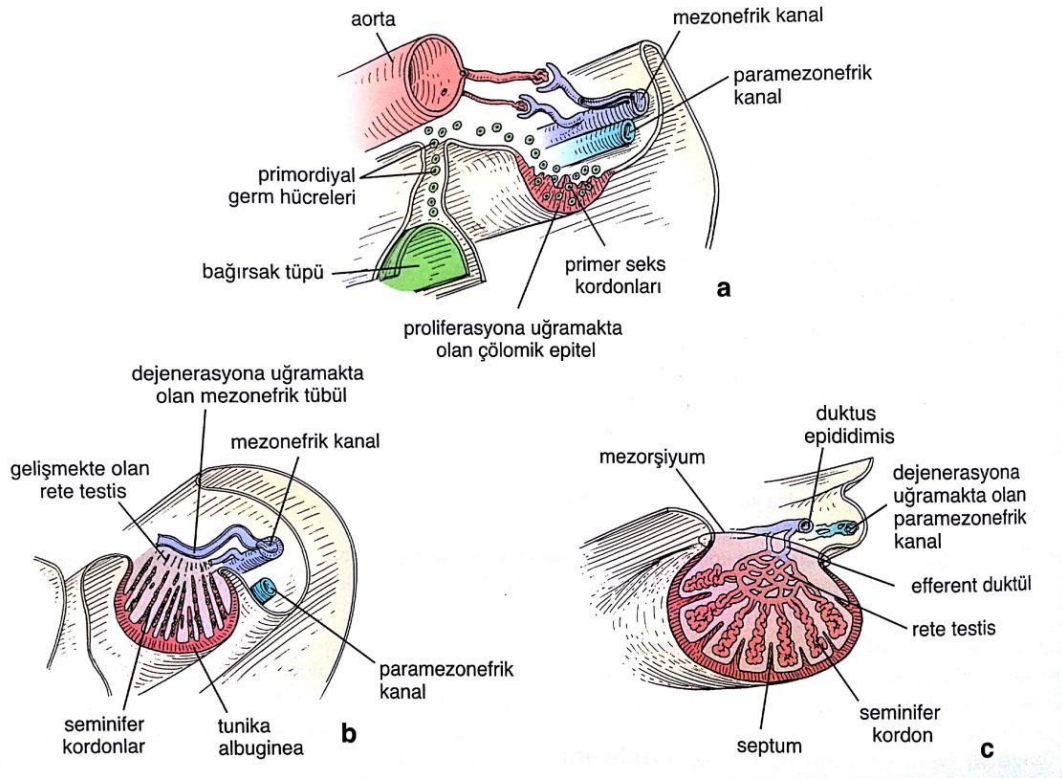
2. GENEL BİLGİLER

2.1.TESTİS

Erkek üreme sistemi testislerden, testis içi ve dışı genital kanallardan, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır. Genital kanal sistemi tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatoryusu içerir. Yardımcı bezler ise veziküla seminalis, prostat ve bulboüretral bezlerdir (15).

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Genetik cinsiyet, fertilizasyon esnasında Y kromozomunun bulunup bulunmamasına göre tayin edilir. Buna rağmen gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar, erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir (16). Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonadal kabartılar halinde ortaya çıkarlar. Gelişimin 6. haftasına kadar bu gonadal sırtlar içinde germ hücreleri yoktur. Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde vitellus kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında ve allantoise yakın bir yerde belirirler. Ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler 5. haftanın başında primitive gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Böylece henüz farklılaşmamış fetal gonad gebeliğin 6. haftasında ortaya çıkmış olur. (17,18). Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı (Şekil 2.1) de gösterilmiştir.

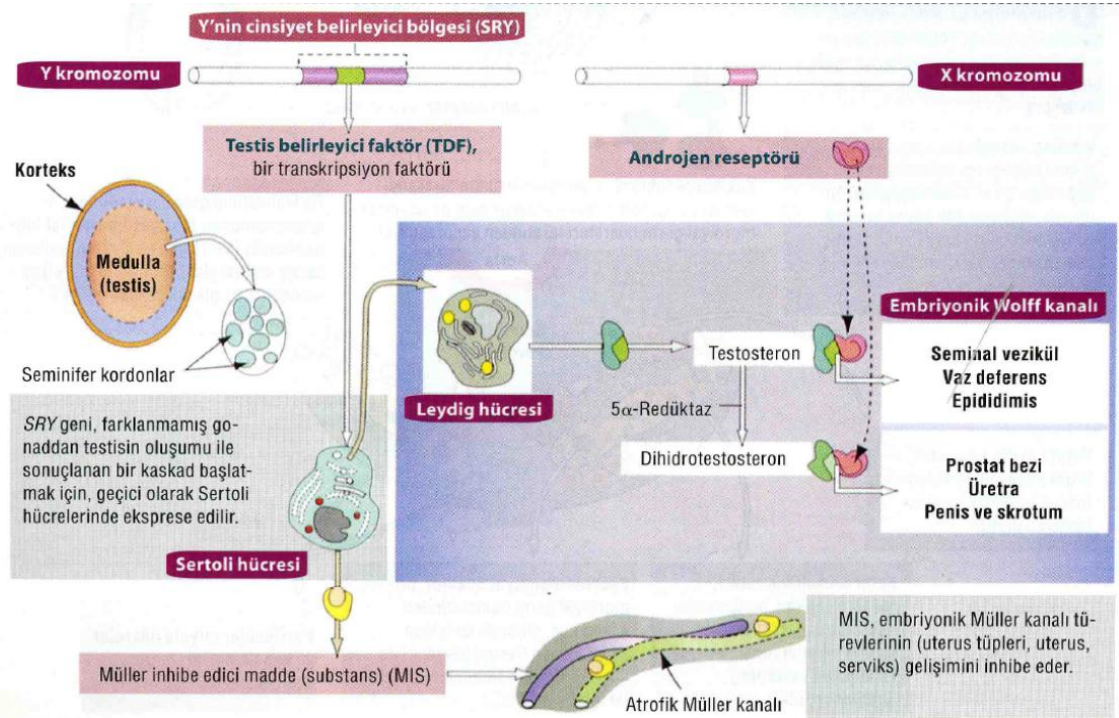


Şekil 2.1. Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı (a. 5 haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonad evresi, b. Primer cinsiyet kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşması, c. Testiküler gelişiminin son evreleri (22)) .

Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomu gereklidir fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleştiği saptanmıştır. Y kromozomu, farklılaşmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Y kromozomu tarafından düzenlenen TDF, testiküler farklılaşmayı sağlar bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri

Vitellus kesesi duvarındaki endodermal primordial germ hücrelerinin 3. haftada allantoisi aşarak barsağın arka kısmında mezenter kökünün (Radix mesenterii) sağında ve solunda mezonefrozun medialindeki mezoteldeki gonadal kabartı (Plica genitalis) içine girmesi ve buradaki hücreleri indüklemesi (5. haftanın başı) ile gonad taslakları gelişmeye başlar. Embriyonun erkeklik veya dişilik yönünde gelişmeye başlaması 7. haftadan itibaren gerçekleşir. Erkekte veya dişide primordial hücrelerin etrafını plika içindeki mezodermal hücreler sarar. Endodermal primordial hücrelerden germinal hücreler (gonositler = erkekte spermatogoniumlar, dişide oogoniumlar), mezodermal hücrelerden ise destek hücreleri (erkekte Sertoli hücreleri, dişide ise folikül hücreleri) gelişir (18). Testisler genellikle, seks kromozom kompleksinde normal bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda gelişir (19). Primer seks kordonları uzayarak farklılaşmamış gonad medullasına kadar iner. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomozlar yapar ve rete testisi oluştururlar. Gonad taslakları dışında Tunica albuginea geliştikten sonra seks kordonları seminifer tübüllere ve düz tübüllere (Tubuli recti) farklılaşırlar (Şekil 2.2). Seminifer tübüller, intertisyal hücreleri oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. Bu hücreler 8. haftada mezonefrik kanalların ve dış genital organların erkeklik yönünde farklılaşmasını uyaran androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenodion salgırlar. Testosteron üretimi, embriyonik ve fetal gelişimin 8 ile 12. haftaları arasındaki dönemde en yüksek miktarlara ulaşan human koryonik gonadotropin tarafından uyarılır. Fetal testis ayrıca, antimüllerian hormon veya müllerian inhibe edici madde (MIS) olarak bilinen bir glikoprotein üretir. Sertoli hücreleri, destek hücreler olan bu hücreler testisin yüzey epitelinden gelişir. Spermatogonia, primordiyal sperm hücreleri olan bu hücreler primordiyal germ hücrelerinden farklılaşırlar (18). Fetal testiste seminifer epitelin büyük bir kısmını oluşturur. Rete testis, efferent kanalcıklara dönüşen 15-20 kadar mesonefrik tübül ile devam eder. Bu kanalcıklar, duktus epididimise dönüşen mezonefrik kanalla bağlantı kurar (19).



Şekil 2.2. Farklılaşmamış Gonadın Testise Dönüşmesi (22) .

2.1.2. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi speomatozoonların üretiminden sorumlu olan ve erkek cinsiyet hormonlarını üreten bir çift testisten, üretilen spermatozoonların depolanıp iletilmesinden sorumlu olan genital kanallar, seminal sıvıyı salgılayan yardımcı genital bezlerden ve spermayı dışı genital kanala aktaran penisten oluşur (20). Genital organlar erkek ve kadında; iç ve dış olmak üzere iki bölüme ayrılır. Üreme hücrelerini oluşturan genital bezlere ve bu hücreleri ileten yollara iç genital organlar ve üreme hücrelerinin birleşmesini sağlayan organlara da dış genital organlar adı verilir (21). Erkek üreme sistemi anatomisi Şekil 2.3' de gösterilmiştir (22).

1) Erkek iç genital organlar (organa genitalia masculina interna);

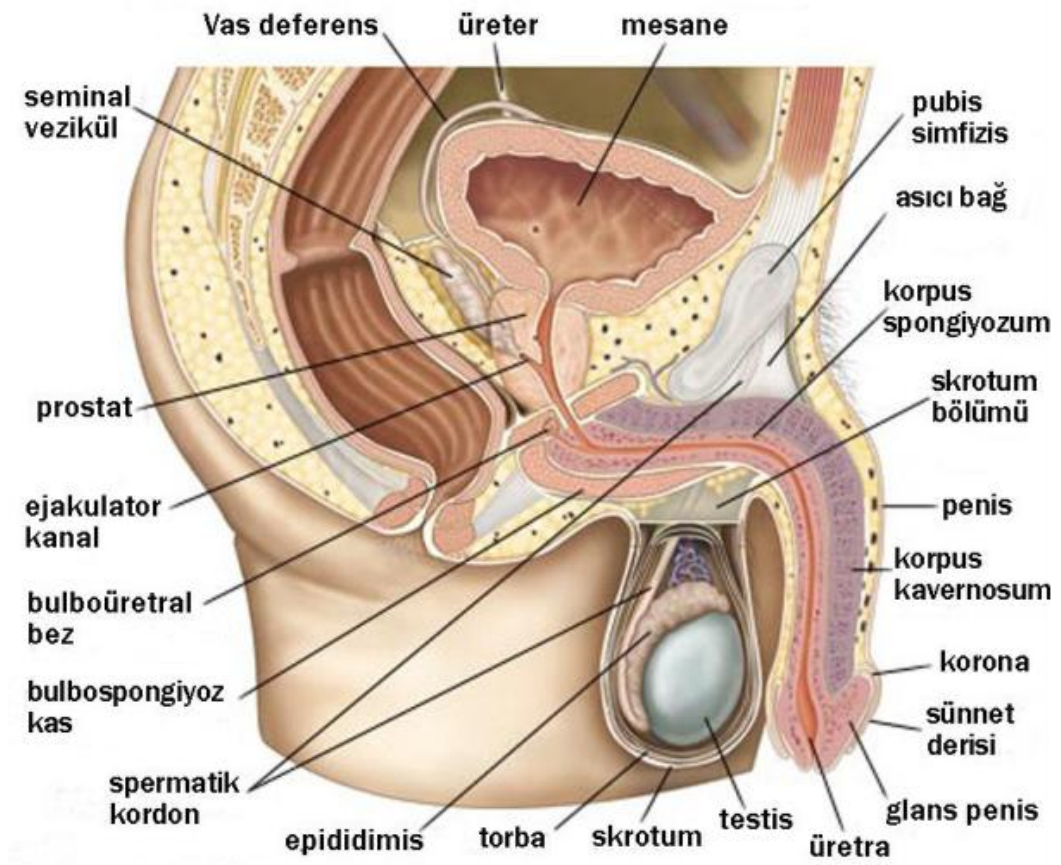
1. Testis
2. Epididymis
3. Funiculus spermaticus
4. Ductus deferens
5. Vesicula seminalis
6. Ductus ejaculatorius
7. Gl. bulbourethralis

8. Gl. Prostatica

2) Dış genital organlar (organa genitalia masculina externa);

1. Penis

2. Scrotum'dur (23, 24).



Şekil 2.3. Erkek üreme sistemi (22)

Erkek üreme sisteminin temel fonksiyonu sperm üretip, bu spermilerin dişi vaginası'na iletilmesini sağlamaktır. Bu işlemi yapabilmesi için 4 farklı tipte yapıya sahiptir. Bu yapılar testisler, yardımcı kanallar, yardımcı bezler ve penis'tir. Testisler, sperm ve primer erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu üretir. Yardımcı kanallar, testislerdeki ya da yardımcı bezlerdeki salgıları depolayıp penis'e taşırlar. Yardımcı bezler ise sperm penis'e taşınması için uygun ortamı oluşturacak olan sıvıyı üretirler. Bu sıvı ve spermier semen adını alır ve penis, semeni vagina'ya taşımaya aracılık eder (24, 25).

Testisler, yarım ay biçimindeki epididymis'in eklenmiş olduğu tunica albuginea adı verilen sıkı bağ dokusundan yapılmış kalın bir kapsül ile sarılı, oval şekilli bir çift organdır. Skrotum denilen deriden bir kese içinde funiculus spermaticus ile asılı durur (20, 27). Üreme sezonu boyunca içerisinde testisler yer aldığı için büyür, fakat nonreproduktif dönemde rodentlerde ve diğer bazı memelilerde testisler vücut boşluğuna çekilir. Birçok memelide sperm hücreleri karın içindeyken oluşan yüksek ısı sırasında tam olgun değildir; sperm oluşumunun son aşaması için skrotumdaki biraz daha düşük olan sıcaklık gereklidir (26).

Deri ve bağ dokunun altında, içerisinde testisi bulunduran kremaster boşluklar yer alır. Kremaster poşu duvarı, gövde duvarı musculus abdominis transversus'un uzantısı olan kremaster kasından oluşur. Sıçanlarda kremaster kası testisin peritoneal boşluğa geri çekilmesinde görev aldığı için iyi gelişmiştir. Kremasterik poşların içerisindeki boşluk peritoneal kavitenin kaudal bir uzantısıdır ve vaginal kavite olarak adlandırılır. Kremasterik keseye (poşa) ulaşmak için vaginal kavite muskuler abdominal duvar içerisinde geçmek zorundadır. Bu geçiş inguinal kanal olarak adlandırılır.

Hilal şeklindeki epididimis testisi kısmen kuşatır. Seminifer tübüllerde üretilen sperm hücreleri testisin kraniyal ucunda rete testis denen ağı oluşturan mikroskobik tubullere geçer. Sıçanda, testisin kraniyal ucundaki rete testis kısmı epididimisin başından testise doğru uzanan kordon benzeri bir yapı şekillendirir. Sperm hücreleri epididimiste ilerlemeye devam eder ve duktus deferense (sperm kanalı) girer. Bir grup aksesuar genital bez uretraya bağlanmış durumdadır.

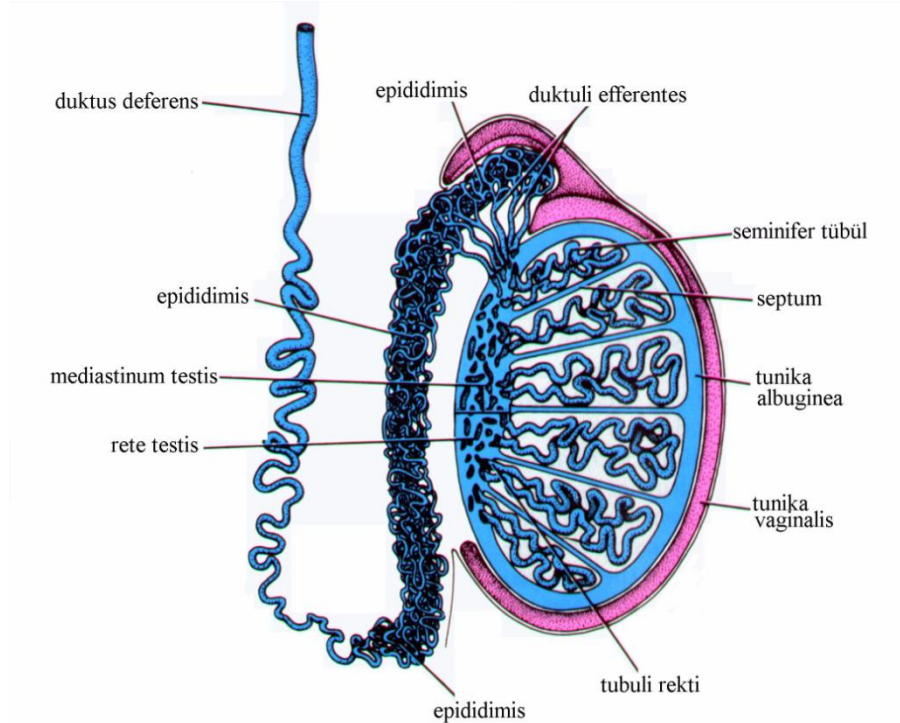
Bunlar prostat hariç birer çift halinde bulunan veziküla seminalis ve bulboüretal bezlerdir. Bu bezlerin salgıları ejakulasyon boyunca sperm hücrelerini taşıyan, aktive eden, onlar için bazı besinleri sağlayan ve vajinanın hafif asidik ortamını nötralize eden maddeler içeren seminal sıvıyı oluşturur. Sıçanların veziküla seminalis ve bulboüretal bezleri sadece ejakulasyonun sonuna doğru salgılarını bırakırlar (26).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testisler, tunica albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunica albuginea'nın testisin arka yüzünde kalınlaşmasıyla mediastinum testis adı verilen yapı oluşur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar, bezi testis

lopçukları/bölmeleri denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Bu uzantılar kesintisiz değildir ve çoğunlukla bölmeler birbirleriyle bağlantılıdır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testis androjenlerini salgılar (29, 30).

Testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Her bir tübül sonlanırken lümeni daralır ve düz tübüller ya da *tübülü rekti* adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin *rete testis* denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan *rete testis*, 10-20 *duktuli efferentes* ile *epididimisin* baş kısmına bağlamıştır (31, 32) ve üreme yollarının yapısı Şekil 2.4 şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizim (22)

2.1.3.1. Seminifer tübüller

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir *germinal* ya da *seminifer epitel*den oluşur. Seminifer tübülü saran *tunica propria* birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal lamina'ya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özelliklerini gösteren yassılaştırmış *myoid hücre*lerden oluşur. Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir: *Sertoli* ya da *destek hücreleri* ile *spermatogenik seriyi* oluşturan hücreler (33).

2.1.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, Sertoli hücresinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar kaba endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin görülür. Seminifer tübüllerde yan yana duran Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu bağlantılar seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki bölmeye ayırır. Spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar.

Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri “gap junction” denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır (33, 34).

Sertoli hücre fonksiyonları

1- Gelişen sperm hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek,

- 2- Spermiyogenez sonunda oluşan sitoplazma artıklarını fagosit etmek,
- 3- Spermiyasyonu yani seminifer tübül lümenine olgun spermin salınımını sağlamak,
- 4- Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak,
- 5-Seminifer tübül lümeninde spermatogenez için gerekli olan testosteron konsantrasyonunu arttıran androjen bağlayıcı proteini (ABP) üretmek ve salgılamak.
- 6-Hipofiz bezinden folikül uyarıcı hormon (FSH) salınmasını önleyen inhibin hormonunu salgılamak,
- 7-Anti-Müllerian hormonu üretmek ve salgılamak. Bu hormon üreme organlarının gelişimi sırasında Müller kanallarının gerilemesini sağlar (33, 34).

Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını ışıınımı gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler. Memelilerde spermatozoonların salınımı muhtemelen hücre hareketlerinin bir sonucudur. Bu hareket Sertoli hücrelerinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlanır (34).

2.1.3.3. Spermatojenik hücreler

Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bu erkek germ hücreleri sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler.

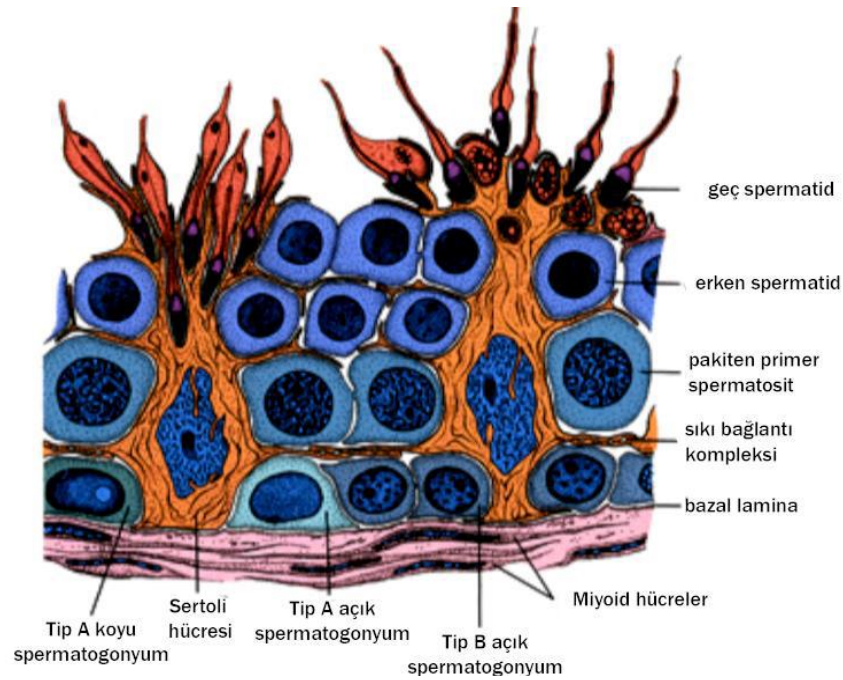
Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılabilir; spermatositogenez olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatogonyumların ardı ardına iki kez bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki kez bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin olduğu evre ise mayoz adını alır.

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel öncül bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın

hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Ergenlik çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalmaya başlar. Oluşan yeni hücreler iki yol ile birbirini izlerler. A tipi spermatogonyumlar kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da devam eden mitotik bölünmeler sonucu farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar (31). İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu renkli boyanan koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir (Şekil 2.5).

Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur.

İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür. Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur ve her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitelyum siklusu germinal epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter. Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır (31).



Şekil 2.5. Seminifer tübülün bir parçası. Seminifer epitel 2 tip hücreden oluşmuştur: Spermatogenik seri hücreleri ve destek ya da Sertoli hücreleri (22) .

2.1.3.4. İnterstisyel Alan ve Leydig hücreleri

Testisin serminiferöz tübülleri arasındaki boşluklar; Leydig hücreleri, bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve bu kapiller kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verirler. İnterstisyel alanın, lenf damarlarından zengin olması, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. İnterstisyum Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içermektedir. Leydig hücre toplulukları, kan damarları ve lenfatik kanal veya sinuzoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir (35).

Gruplar halinde tunika albuginea, epididimis, spermatik kordon ve mediastinumda da gösterilmiştir. Testosteron hormonu üretilmesi ve salgılanmasından sorumludurlar. Neuroendokrin fonksiyonları; Leydig hücrelerinin büyümesi, gelişmesi ve işlevleri Lüteinize edici hormon (LH) un tropik etkisine bağlıdır. LH'ın yokluğu Leydig hücrelerinin küçülmesine ve testosteron üretiminin durmasına yol açarken, LH'ın

salgılanması Leydig hücrelerini uyarak hipertrofiye olmalarını sağlar. Leydig hücreleri testosteron ürettiği müddetçe LH üzerinde negatif geri bildirim ile hormonal homeostaz sürdürülür. Yükselen testosteron seviyeleri LH üzerinde negatif geri bildirim oluşturarak LH salınımını durdurur ve takiben testosteron seviyeleri düşer (36).

Leydig hücrelerinin hormonu olan testosteronun başlıca fonksiyonları: normal seksüel davranışların sergilenmesi, yardımcı üreme bezleri ve sekonder erkeklik karakterlerinin gelişmeleri ile fonksiyonlarının sürdürülmesinin başlatılması, spermatogenezisin kontrolü (FSH ile birlikte), hipofiz ve hipotalamusa negatif feedback etkisi, genel anabolik etkiler ve doğumdan önce wolf kanalının varlığını koruma ve onun duktus deferens ile epididimise farklılaşması olarak sıralanabilir (37). Parakrin olarak oksitosin, substans-P, β -endorfin ve benzeri salgılar. Endokrin fonksiyonlarından dolayı kılcıl damarlarla ilişkili değişen boyutlarda topluluklar yaparlar. İki çekirdekli olabilirler. Tipik steroid salgısı yapan hücrelere benzerler. Bu hücrelerde salgı granülü bulunmaz, üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir (38).

2.1.4. Erkek Üreme Sistemi Fizyolojisi

Erkek üreme fonksiyonlarının esas görevi spermatogenezis’le spermatozoon’u oluşturmaktır ve bununla birlikte spermatogenezis için gerekli olan testosteron hormonunun salgılanması önemlidir. Testesteron hormonu testislerde interstial alanda yerleşmiş olan Leydig hücreleri tarafından salgılanır. Bu hormon sperm yapımındaki germinal hücrelerinin bölünme ve gelişimi için gereklidir. Bunun yanında testis içindeki a. testicularis ve v. testicularis’ler birbirlerine paralel bir şekilde seyir halindedirler ve bu da ters akım halinde olup, ısı ve testosteron alış verişini sağlar. Testislerin skrotum’da asılı olmasıyla sıcak havalarda gevşeyip sarkması ve soğuk havalarda m. cremaster kasının kasılmasıyla vücuda yaklaşmasıyla testisin ısı değişkenlerinden ve diğer etkenlerden etkilenmesi önlenmiş olur. Tüm bu faktörler sperm oluşumu için oldukça önemlidir (39-41).

FSH hipofiz bezinden salgılanır ve Sertoli hücrelerini uyandır. Bu uyarı olmadan spermatogenezis olayı gerçekleşmez. Bunun yanında aynı şekilde hipofizden salgılanan LH, Leydig hücrelerini uyarak testosteron salınımını sağlar (40, 42).

Yardımcı bezlerden salgılanan sıvı içinde spermin beslenmesini sağlayan fruktoz, uretral ve vaginal asiditeyi nötrleştiren alkali ortam ve fosfolipidler semen içinde spermin hareketini artırıcı etki göstermektedir. Semen 3-4 ml kadar olup, içerisinde ortalama 300-500 milyon sperm bulunur. Semen pH'sı yaklaşık olarak 7,5 civarındadır. Yapısında bulunan hyaluronidaz enzimi vaginanın muköz salgısını eritip, sperm hareketlerini artırıcı etki yapar (40, 43). Sperm akrozomunda fazla miktarda hyalüronidaz ve proteolitik enzimler depolanır. Hyalüronidaz, granüloza hücrelerindeki hücreleri bir arada tutan hyalürolik asit polimerlerini monomerlerine ayırır. Proteolitik enzimler ise yumurtaya bağlı olan yapısal elemanların proteinlerini sindirir. Ovum fallop tüplerine atıldığında etrafında çok sayıda granüloza hücre tabakası bulunur ve sperm ovuma ulaşmadan önce bu tabakayı geçmek zorundadır. Daha sonra ovumun çevresinde kalın bir örtü olan zona pellusida'yı aşmalıdır. İşte bu enzimler sperm'in ovuma ulaşması için önemli enzimlerdir. İlk sperm ovuma girdikten sonra, oosit zarlarından kalsiyum salınımı başlar ve buna bağlı birçok kortikal granül ekzositozla oositin perivitelin boşluğuna bırakılır. Bu granüller daha fazla spermin oosite girmesini engeller (40).

2.2. Paklitaksel

PAC, *Taxus brevifolia* adlı pasifik porsuk ağacından çıkarılan önemli bir anti-tümör ajandır (44). İlk olarak kemoterapiye dirençli meme ve ovaryum kanserli hastalarda palyatif olarak kullanılmıştır ancak günümüzde metastatik meme kanserinin ilk basamak tedavisi olarak kullanılmaktadır (44).

PAC, beyaz renkte kristal toz yapıdadır. Oldukça lipofilik yapıdadır. Erime sıcaklığı 216-217°C'dir. Kimyasal açık adı '5 β , 20-epoksi-1,2 α , 4, 7 β , 10 β , 13 α -hekzahidroksitaks-11-en-9 on 4, 10- diasetat 2-benzoat-13 ester (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilizoserin'dir. Molekül formülü C₄₇H₅₁NO₁₄, moleküler ağırlığı 853,9 dalton'dur (45).

PAC' in sudaki çözünürlüğü 0,3 μ g/ml'dir. Ancak çeşitli organik çözücülerde nispeten daha fazla çözünürlük göstermektedir. Tablo 2.1 de PAC' in çeşitli organik çözücülerdeki çözünürlük değerleri verilmiştir (46).

Tablo 2.1. Paklitakselin organik çözücülerdeki çözünürlük değerleri (46)

Organik çözücü	Çözünürlük (µg/ml)
2-propanol	14
Asetonitril	20
Diklorometan	20
Etanol	46
Metanol	12
İzopropanol	12
Triasetin	75
Metilen klorür	19

PAC yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanmaktadır (%88-98). Ortalama dağılım yarı-ömrü 0,34 saat; eliminasyon yarı-ömrü 5,8 saattir (47). PAC oral yoldan absorbe olmamaktadır. Yapılan çalışmalarla PAC'in nonlinear farmakokinetik özellik gösterdiği belirlenmiştir. PAC büyük oranda P-450 aracılı mitekondriyal hepatik metabolizmaya uğrar ve %10'undan daha azı değişmeden idrarla atılır (48).

Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda 6 saatlik infüzyonu takiben en yüksek PAC konsantrasyonu akciğer, karaciğer ve dalakta eser miktarda da beyin ve testislerde biriktiği gösterilmiştir (48). PAC antitümör etkisini hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir (49).

PAC hücreler üzerindeki etkisini iki yolla yapmaktadır:

2.2.1.Hücre Döngüsünü Bloke Etmek:

PAC, kanser tedavisinde kullanılan, etkisini mikrotübüller üzerinde gösteren Vinca alkaloidleri olarak bilinen vinkristin ve vinblastin'den farklı olarak tübülün proteinlerine bağlanarak mikrotübül yapısını engellemek yerine stabilize ederek hücre bölünmesini durdurmaktadır. Paklitaksel β tubulinde N-terminal 31 amino asite bağlanarak (rao-2) hücrelerin G2/M evresinde kalmasına neden olmaktadır. Hücre siklus sırasında mitotik faza geçemeyen hücreler bölünememekte ve G1 kontrol noktası tarafından apoptozise yönlendirilmektedir (49).

2.2.2. Apoptozis:

PAC' in apoptozis etki mekanizması ilk olarak 1993 yılında insan lenfosit lösemi hücrelerinde gösterilmiştir. Ardından bu konuda farklı hücre hatlarında ve çeşitli in vivo hayvan modelinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Apoptozis programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır. Hücre ve dokuların mekanik bir etki ve hasar olmaksızın belirli moleküler işlemler ve sinyaller sonrası hücrelerin kendiliğinden ölmesidir. PAC' in hücrelerin mitotik evreye geçmelerini engellemesi sonucu hücreler bölünememektedir. Mitotik evrede kalan hücre sayısındaki artış o hücreleri apoptozise yönlendirici sinyaller oluşmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda yapılan çeşitli çalışmalarla Paklitakselin bcl-2 adı verilen ve apoptozisi bloke eden proteine bağlanarak onu inhibe ettiğini göstermektedir. Böylece apoptozisin devam etmesine izin vermektedir. Paklitakselin aynı zamanda, sıçan testislerinde spermatogenez, sperm kalitesi, germ hücreleri ve kan-testis bariyerine verdiği zararlar ile erkek bireylerde infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (50, 51).

2.3. Resveratrol

RES, travmatik zedelenme, UV ışığına etkin bırakılma ya da mantar enfeksiyona yanıt olarak bazı bitkiler tarafından sentezlenen non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir (52, 53). Fitoaleksinler, patojenik mikroorganizmalara karşı bitkilerce korunma amaçlı sentezlenen kimyasal maddelerdir, bu maddelere bitkisel antibiyotikler de denebilir (52-54). Stilbenlerin alt grubunda yer alan resveratrol 3,4,5-trihidroksi stilben yapısındadır. Trans izomerlerinin biyolojik etkileri, cis izomerlerinden daha yüksektir (55, 56).

RES' ün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir. RES, hücre membranlarını koruyarak yaşayan hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmaktadır (57).

RES kaspas-3 aktivasyonunu, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımını ve kaspas-9 aktivasyonunu indükler. Resveratrol aynı zamanda proapoptotik Bax ekspresyonunu ve onun mitokondride translokasyonunu artırır (54).

RES' ün farklı dokularda farklı etkinliği vardır. Bu etkiler:

- Kalp Sağlığı Üzerine Etkileri

- Antioksidan Etkileri
- Antikanserojen Etkileri
- Antienflamatuar Etkileri
- Östrojenik Etkileri
- Antitrombosit Etkileri
- Anjiyogenezis Etkileri
- Hepatoprotektif Etkileri
- Herpes Simpleks Virüsü Üzerine Etkileri

RES' ün antikanserojen etkisinin, apoptotik hücre aktivasyonunu baskılamak şeklinde olabileceği bildirilmiştir. Apoptotik hücre aktivasyonu; ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 aktivitelerinin baskılanması ile gerçekleşir. Sonuç olarak kanser oluşumunun engellenmesi sağlanır (57).

Normal dokuda RES etkisinin araştırıldığı bir çalışmada testislerin makroskopik görünüm ve ağırlık açısından farklılık göstermediği, ancak RES verilen grupta spermatozoa sayısının daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada anormal spermatozoa oranının daha düşük, serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu değişikliklerin nedeninin hipotalamus-hipofiz-gonad aksının RES tarafından uyarılması olduğu bildirilmektedir (58).

RES'ün germ hücreleri ve spermatozonlar üzerinde doz değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada RES'ün lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği ve semenin kriyopreservasyonu ya da IVF-ICSI gibi mekanik teknikler için spermleri reaktif oksijen türevlerinin (ROS) saldırılarına karşı daha iyi koruyabilen özelliği sebebiyle yeni sperm kültür mediumlarına eklenmesinin yararlı olabileceği bildirilmiştir (59).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, her grupta 10 adet olacak şekilde Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen ortalama 60 günlük Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde $21 \pm 3^\circ \text{C}$ ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında bakım odalarında izin verilen ölçüde standart besin ve su ile yetiştirildi. Deney aşamasına kadar mümkün olduğu kadar stressiz ortamda barınmaları sağlandı. Deneye başlamadan önce hayvanların ağırlıkları ölçüldü ve ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde deney gruplarında 10'ar adet sıçan bulunduruldu (71). Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından **TLY-2016-6810** nolu proje ile desteklenmiştir.

Grup 1: Kontrol grubu hayvanlara 4 hafta boyunca her gün intraperitoneal (i.p.) olarak serum fizyolojik uygulandı.

Grup 2: PAC grubu deney hayvanlarına 10 mg/kg paklitaksel haftada 1 gün ve 4 hafta boyunca i.p. olarak uygulandı.

Grup 3: PAC+RES grubu deney hayvanlarına, 10 mg/kg tek doz paklitaksel uygulanmasından önceki günlerde 10 mg/kg/ip resveratrol verildi ve 4 hafta devam edildi.

Grup 4: RES grubu deney hayvanlarına, 4 hafta boyunca günde bir kez 10 mg/kg/ip resveratrol verildi.

3.1. Deneysel Prosedür

Tüm prosedürler etik kurallara uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Grup 1'e (kontrol grubu) 4 hafta boyunca her gün serum fizyolojik i.p. olarak verildi. Grup 2'ye haftada 1 gün PAC (10 mg/kg) tek doz i.p. olarak 4 hafta boyunca (toplam 4 doz) uygulandı. Grup 3'e deneyin başlangıcından itibaren 4 hafta boyunca her gün RES (10mg/kg) i.p.

olarak yapıldı. Grup 4'e ise deneyin başlangıcından itibaren haftanın 6 günü RES (10mg/kg) ve 7. gün PAC (10mg/kg) i.p. olarak 4 hafta boyunca yapıldı. Deneyin sonunda sıçanlar xylazin ve ketamin anestezisi altında dekapite edilerek sol testisler histopatolojik değerlendirmeler için formaldehite alındı, sağ testis örnekleri ise biyokimyasal analizlerde kullanılmak için -80 °C 'de saklandı.

3.1.1. Doku Takibi

Deneklerden elde edilen testisler %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilende şeffaflaştırma işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Yapılan bu işlemler Tablo 3.1 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Formaldehit	48 saat	8	Absolü alkol	1 saat
2	Akarsu	2 saat	9	Absolü alkol	2 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen I	30 dakika
4	%70 Alkol	1 gece	11	Ksilen II	30 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen III	30 dakika
5	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafin	1 gece
6	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

3.1.2. Hematoksilen - Eozin Boyama

Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler lamlara alındı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler Hematoksilen&Eozin (Tablo 3.2) boyası ile boyanarak önce artan alkol serilerinden ve daha sonra ksilolden geçirilerek entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda incelendi.

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	13	Akarsu	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	14	Eozin	5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	15	Akarsu	5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	16	%50 Alkol	1 dakika
5	Absolu Alkol I	10 dakika	17	%70 Alkol	1 dakika
6	Absolu Alkol II	10 dakika	18	%80 Alkol	1 dakika
7	%96 Alkol	10 dakika	19	%96 Alkol	1 dakika
8	%80 Alkol	10 dakika	20	Absolu Alkol I	1 dakika
9	%70 Alkol	10 dakika	21	Absolu Alkol II	2 dakika
10	%50 Alkol	10 dakika	22	Ksilen I	20 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen II	20 dakika
12	Hematoksilen	8 dakika	24	Kapatma	

3.1.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Bu skorlamaya göre, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, tübülün içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif bir şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı. Histolojik incelemelerin sonuçları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında bulunan iki uzman histolog tarafından yapıldı. Her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 20'şer farklı tübül 20'lik objektifle iki kör gözlemci tarafından incelendi. Her grup için ayrı ayrı 100 adet tübül Tablo 3.3'de belirtilen kriterlere göre değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için SPSS paket programı kullanıldı.

Tablo 3.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması.

Skor	Histolojik Bulgular	Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüler kesitte hiçbir hücre yoktur.	6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur.
2	Sadece sertoli hücreleri vardır.	7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.	8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatosit vardır.	9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır.
5	Fazla sayıda spermatosit mevcuttur.	10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur.

3.1.4. TUNEL Yöntemi

Parafin bloklardan alınan 4-5 µm'lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamalar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip preparatlar distile su ile 3 defa ikişer dakika yıkandı. PBS ile iki defa 5'er dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. 10 dakika asit alkolde -20 °C' de bekletildi. Tekrardan iki defa PBS' de 5' er dakika yıkandı. Equabriton buffer solüsyonundan damlattıktan sonra karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi. Önceden hazırlanan Reaktion Buffer-TDT enzim solüsyonu dokular üzerine damlatılarak karanlık tank içerisinde 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra preparatlar üzerine stop buffer damlatılarak tekrar 37 °C' de 10 dakika etüvde bekletildi. Etüvden çıkan doku örnekleri 2 defa 5' er dakika PBS' de yıkanır. Önceden hazırlanan bloking solüsyonu preparatlar üzerine damlatıp 20 dakika oda sıcaklığında 10 dakika etüvde bekletilir. Etüvden alınan dokular tekrar iki defa 5' er dakika PBS ile yıkandı ve 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile zıt boyama yapılarak Olympus BX-51 flüoresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda görüntülendi. Apoptotik indeks için her kesitte on farklı alandaki TUNEL pozitif apoptotik hücreler sayıldı.

3.1.5. Biyokimyasal Analizler

3.1.5.1. Malondialdehit (MDA) düzey tayini

Deney sonunda -80°C derecede saklanan testis doku örnekleri oda ısısında bir süre bekletildikten sonra PBS içinde homojenize edildi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde +4°C 'de 12000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi ve supernatantları alındı. Alınan supernatantlar MDA analizi için kullanıldı. Aktif Diagnostik Lab.'dan temin edilen

ELİSA kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı [Rat malondialdhehydhe (MDA) ELISA Kit. 96 plate senredbio Seri:201-11-0157]. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.5.2. Süperoksit dismütaz (SOD) aktivite tayini

Deney sonunda -80°C 'de saklanan testis doku örnekleri oda ısısında bir süre bekletildikten sonra PBS içinde homojenize edildi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi ve supernatantları alındı. Alınan süpernatantlar SOD analizi için kullanıldı. Aktif Diagnostik Lab.'dan temin edilen ELİSA kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı [Rat Super Oxidase Dimutase (SOD) ELISA Kit. 96 plate senredbio Seri:201-11-0169]. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.5.3. Katalaz (CAT) aktivite tayini

Deney sonunda -80°C derecede saklanan testis doku örnekleri oda ısısında bir süre bekletildikten sonra PBS içinde homojenize edildi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi ve supernatantları alındı. Alınan süpernatantlar CAT analizi için kullanıldı. Aktif Diagnostik Lab.'dan temin edilen ELİSA kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı [Rat Catalase (CAT) ELISA Kit. 96 plate senredbio Seri:201-11-5106]. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 22 yazılım programında yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi. Bütün skorlar ANOVA yöntemiyle değerlendirildi. Post hock analiz için Tukey testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

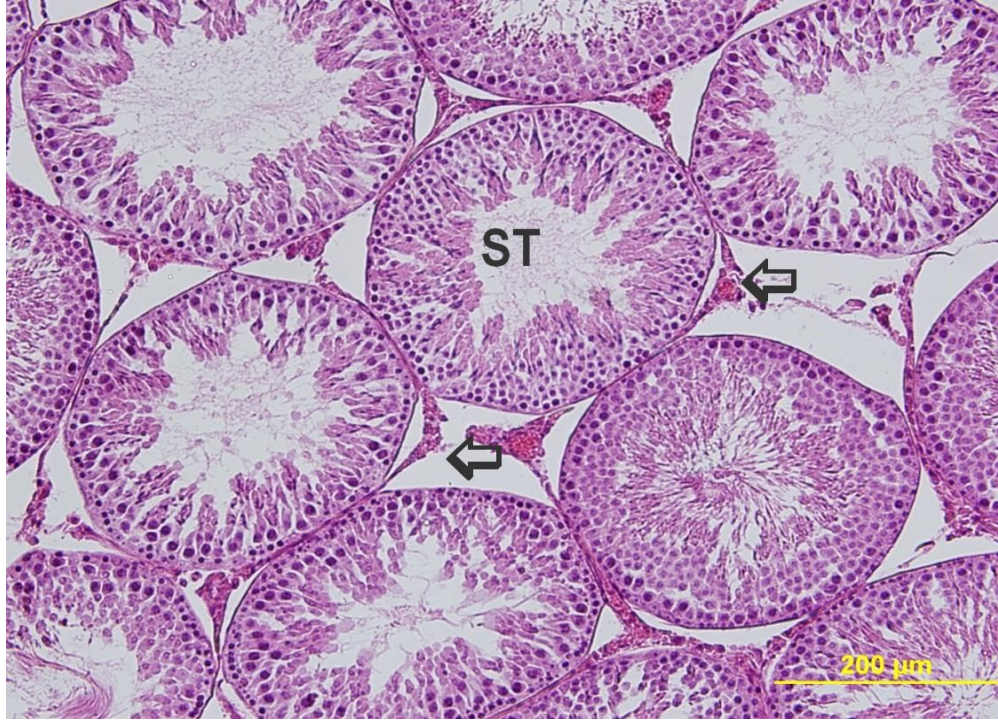
4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının davranışları çalışma boyunca enjeksiyon uygulaması esnasında takip edildi. Deneysel çalışmada uygulanan yöntem ve enjeksiyonların sıçanların davranışları üzerine etkilerinin olup olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak deneyde kullanılan kimyasalların sıçanlar üzerinde herhangi bir davranışsal değişime yol açmadığı saptandı. Kontrol ve deney grubundaki sıçanların günlük su ve besin ihtiyaçlarını benzer şekilde tükettiği belirlendi. Testis dokularında Johnsen tübüler biyopsi skorlanması, apoptotik hücre sayımı ve ELİSA yöntemi ile biyokimyasal parametreler göz önüne alınarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen tübül görüntüleri histopatolojik olarak iki uzman histolog tarafından yorumlandı.

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait testis dokusu dıştan kalın bir bağ dokusu olan tunika albuginea ile çevrelenmiş durumdaydı. Damardan zengin yapıda olan tunika vasküloza organın içine doğru bağ dokusu bölmeler göndererek intertisyel alanları meydana getirmişti. Seminifer tübüller etrafındaki bağ dokusu içinde bol miktarda kan damarı ve hücreler gözlemlendi (Şekil 4.1).

Tübül duvarı spermatojenik ve destek hücrelerini içeren 4-8 katlı epitel yapısındaydı. Spermatojenik hücreler tübül epitelinin çoğunluğunu oluşturacak şekilde değişik gelişim aşamalarında gözlenmekteydi. Bazal membran üzerine oturan ilk sıra hücreler belirgin olarak seçilebilen spermatogonyumlarken, daha iri yapısı ve belirgin çekirdeği ile primer spermatositler seminifer tübül epitelinin orta hatlarında yerleşim göstermekteydi. Çapları küçük ve çekirdekleri daha koyu boyanmış olan sekonder spermatositler lümene daha yakın olarak belirlendi. Gelişmekte olan spermatidler ise, Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içine gömülü koyu boyanan baş kısımları ve lümene doğru uzanan kuyruk yapısı ile dikkati çekmekteydi (Şekil 4.2).



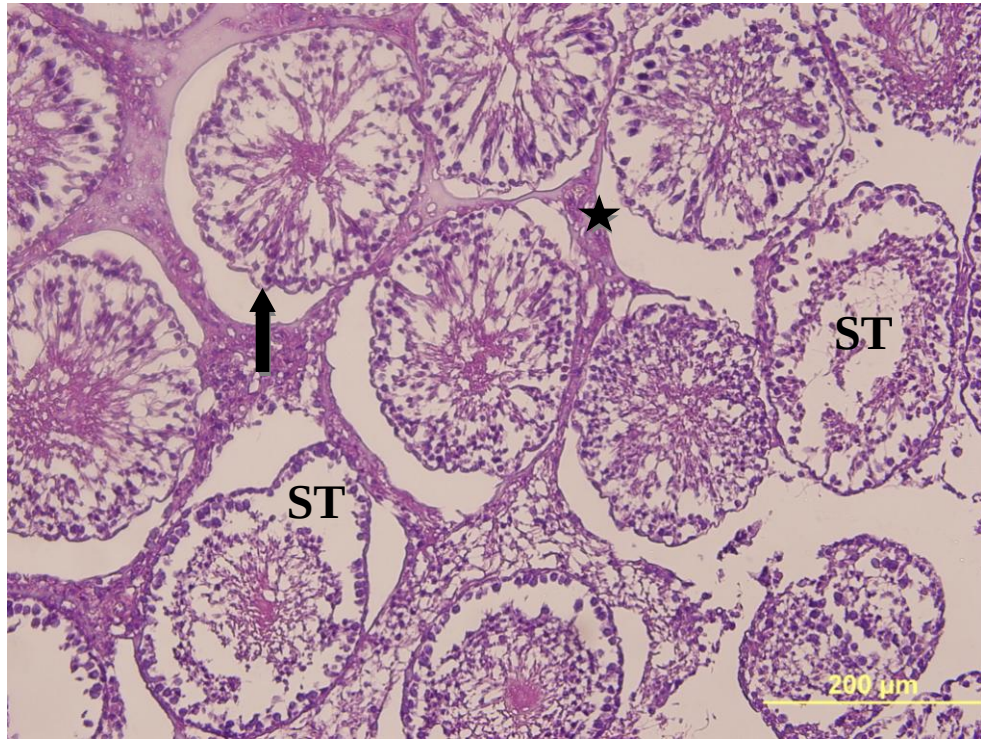
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait testis dokusu. ST: seminifer tübül, Ok: interstisyel alan. H&E boyama (x20).



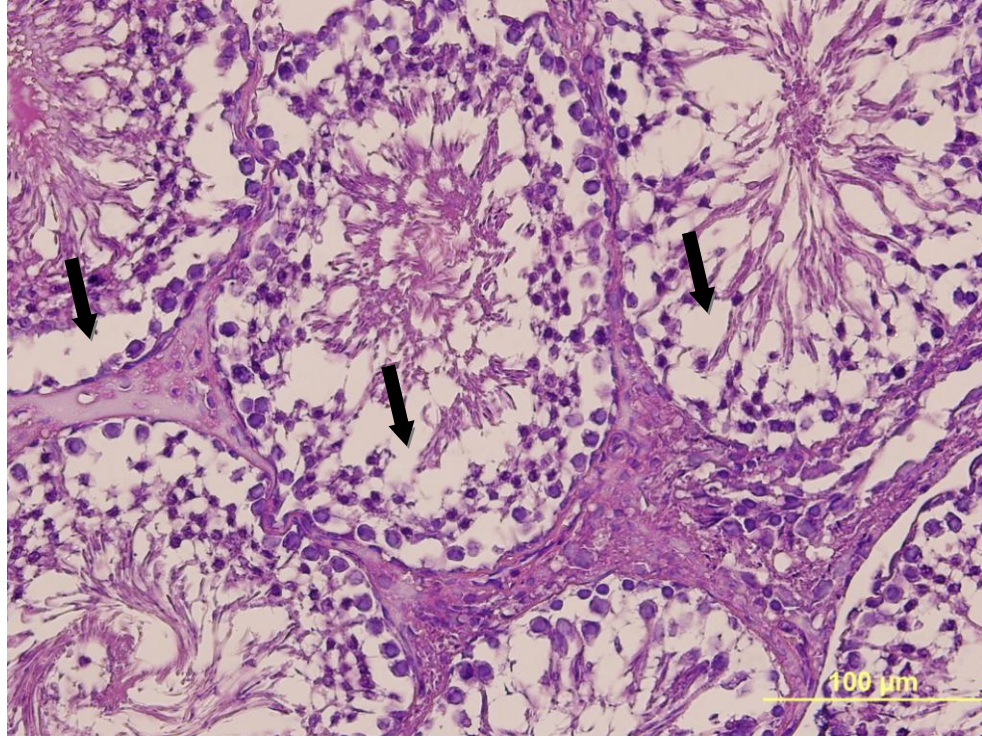
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Spermatogoniumlar (ok) primer ve sekonder spermatositler (ok başı) ile ve spermatidler (yıldız) ile gösterilmiştir. H&E boyama (x40)

PAC grubuna ait testis dokusu kontrol grubuna benzer olarak dıştan kalın bir bağ dokusu olan tunika albuginea ile çevrelenmişti. Geniş intertisyel bağ dokusunun çevrelediği seminifer tübül yapılarında da belirgin düzensizlikler, tübülleri çevreleyen bazal membran yapısında yer yer incelme alanları ve ondüle benzeri kıvrımlar gözlemlendi (Şekil 4.3).

Seminifer tübülü oluşturan spermatojenik hücre serisinde intersellüler boşluklar ve bazaldan apikale doğru dizilim gösteren hücre serilerinde kayıplar izlendi. Kontrol ve RES grubundan farklı olarak PAC grubunda nekrotik yapıda seminifer tübül yapılarına rastlandı. Sertoli hücrelerinin seminifer tübüldeki yerleşimleri belirgin değildi. Baş kısımları ile Sertoli hücrelerinin sitoplazmasına yerleşim gösteren spermatidler klasik görüntü sergilemiyordu. Kontrol grubundan farklı olarak interstisyel alanda ödem gözlemlendi (Şekil 4.4).



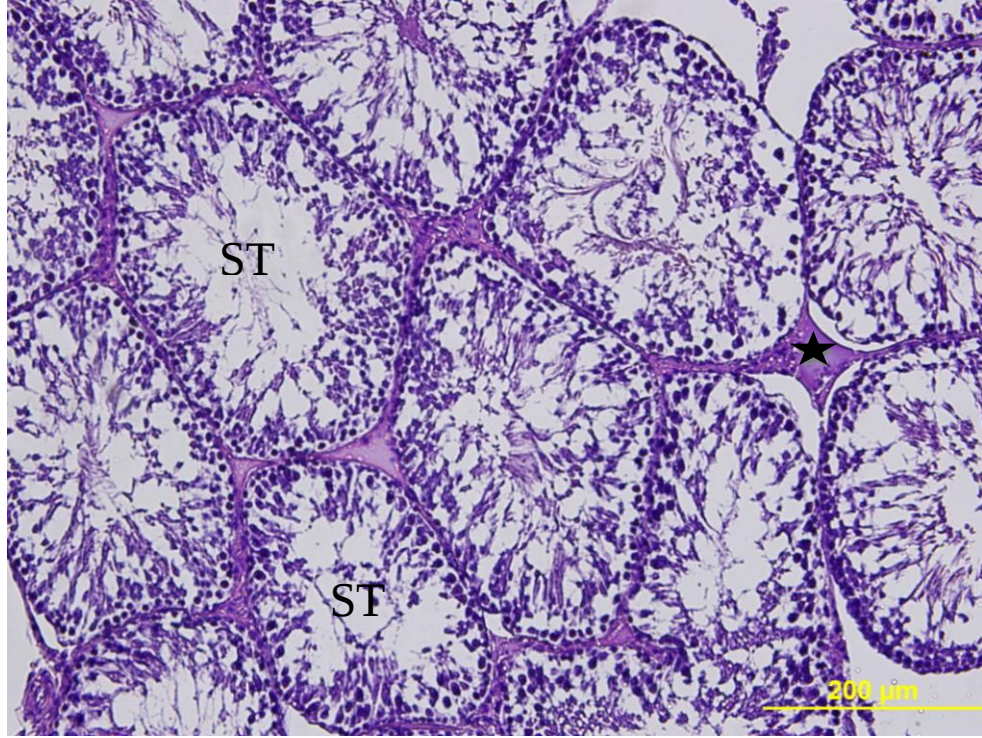
Şekil 4.3. PAC grubuna ait testis dokusu. Bazal membran yapısındaki incelme ve kıvrımlar ok ile gösterilmiştir. Genişlemiş bağ dokusu (interstisyel) alanları (yıldız) ve seminifer tübül (ST). H&E boyama (x20)



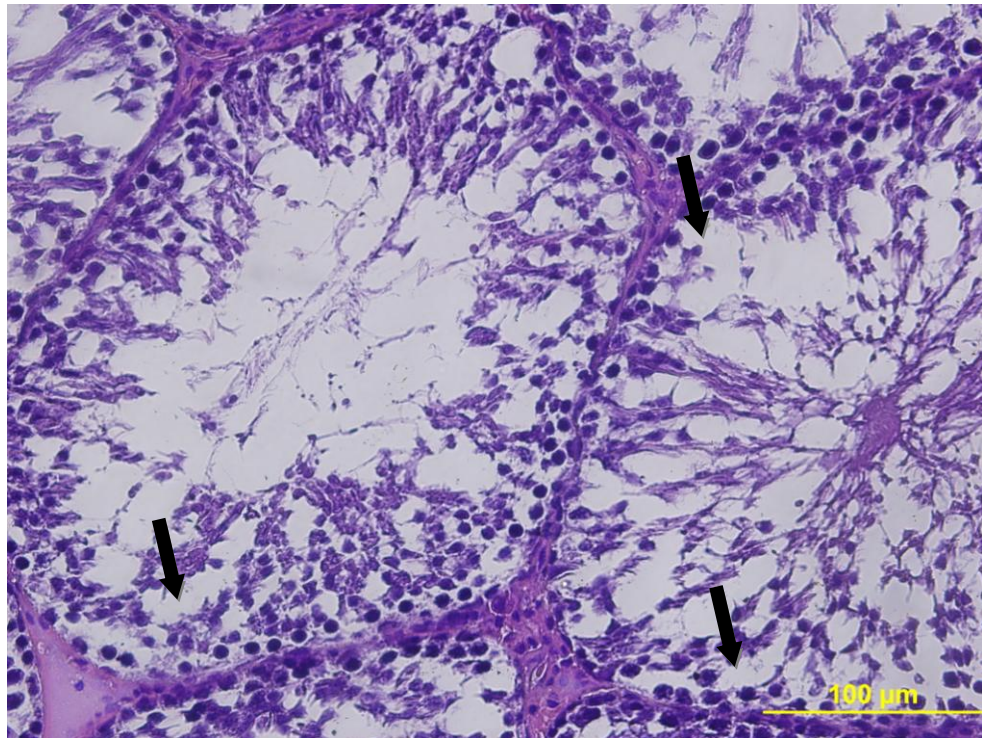
Şekil 4.4. PAC grubuna ait testis dokusu. Hücre kayıpları ve nekrotik yapılar (ok) gösterilmiştir. H&E boyama (x40)

PAC+RES' ün birlikte verildiği gruplarda testis dokusu histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, diğer gruplarla benzer olarak kalın bir bağ dokusu kapsül olan tunika albuginea ile çevrelenmişti. İntertisyel alandaki bağ dokusu bölmeleri PAC grubundakine göre incelmış olarak belirlendi. Bazal membran yapısındaki incelme bölgeleri ve ondüle benzeri kıvrımlar gözlenmedi. İlaveten bağ dokusu ile çevrelenmiş olan seminifer tübül yapılarında şiddetli olmamakla birlikte düzensizlikler mevcuttu (Şekil 4.5).

Seminifer tübül lümeninde kompartman yapısı meydana getiren spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve Sertoli hücrelerinin diziliminde düzelmeler belirlendi. Tübüllerde gelişmekte olan spermatidler kontrol grubundaki şeklini tam olarak kazanamasa da Sertoli hücrelerinin yerleşim bölgeleri PAC grubuna göre daha belirgindi (Şekil 4.6).



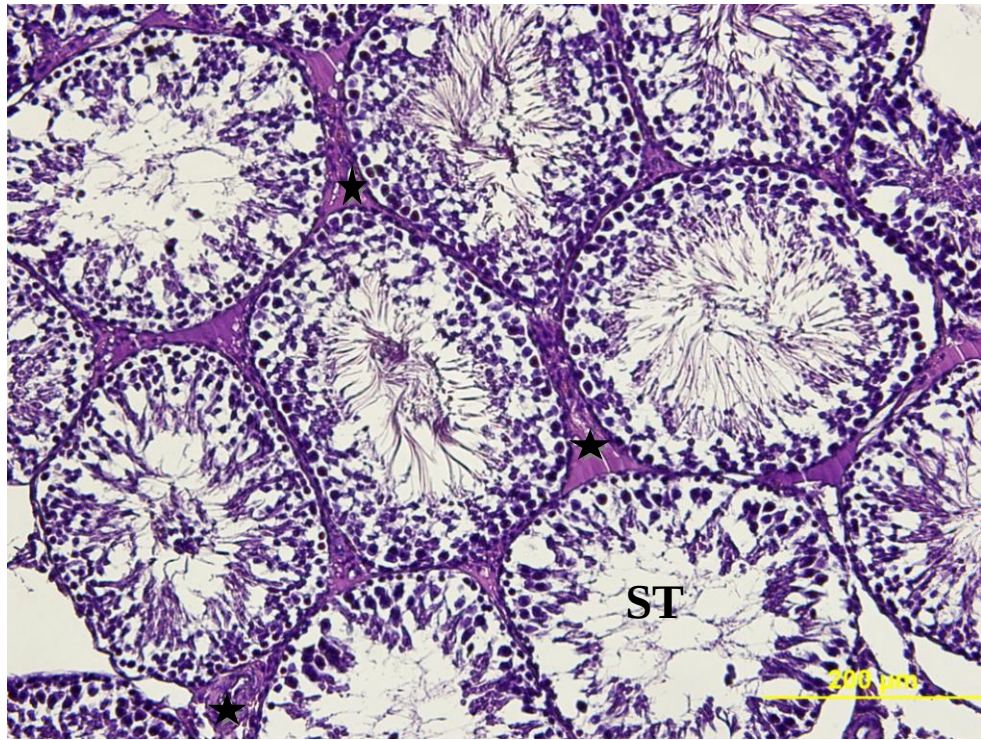
Şekil 4.5. PAC+RES grubuna ait testis dokusu. Genişlemiş bağ dokusu (interstisiyel) alanları (yıldız) ve seminifer tübül (ST). H&E boyama (x20)



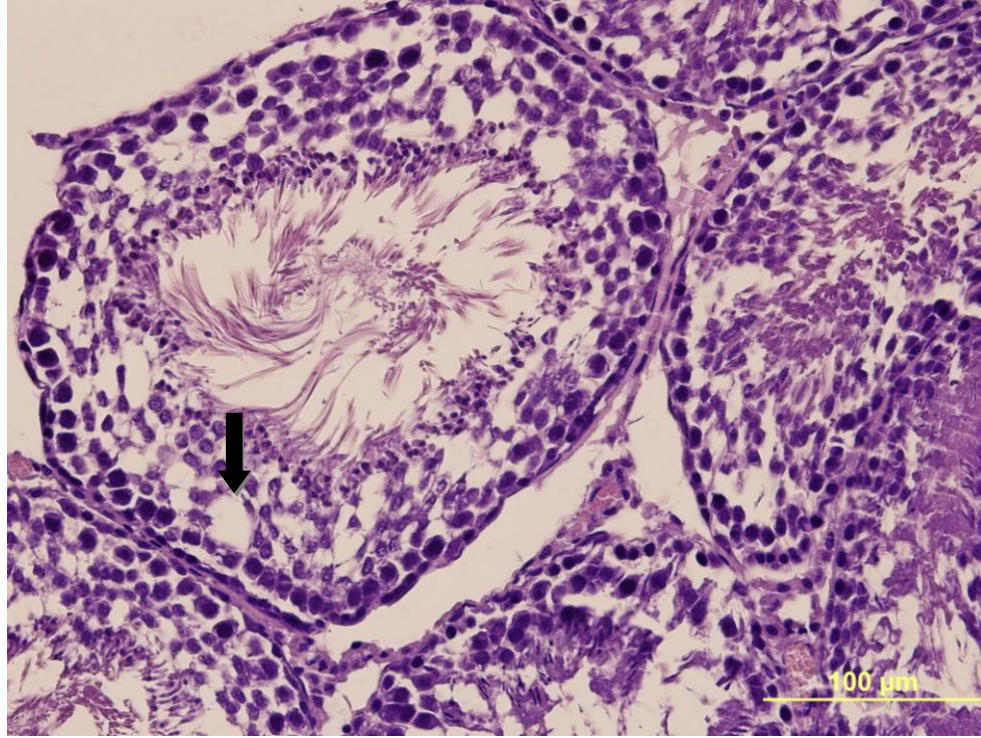
Şekil 4.6. PAC+RES grubuna ait testis dokusu. Hücre kayıpları (ok) gösterilmiştir H&E boyama (x40)

RES grubuna ait testis dokusu da kontrol grubunda olduğu gibi dıştan kalın bir bağ dokusu olan tunika albuginea ile çevrelenmiş durumdaydı. Damardan zengin yapıda olan tunika vasküloza organın içine doğru bağ dokusu bölmeleri göndererek kontrol grubuna göre genişlemiş intertisyel alanları meydana getirmişti. Seminifer tübüller etrafındaki bağ dokusu alanlarında genişlemeler ve düzensizlikler gözlemlendi (Şekil 4.7).

Seminifer tübülü oluşturan spermatojenik hücreler tübül epitelinin çoğunluğunu oluşturmalarına rağmen, bazaldan apikale doğru dizilim gösteren spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve Sertoli hücreleri arasında oluşturulan kompartman yapısında bozulmalar ve vakuol benzeri genişleme alanları gözlenmekteydi. Gelişmekte olan spermatidler baş kısmı Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında ve kuyruk lümende olacak şekilde gözlemlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. RES grubuna ait testis dokusu. Genişlemiş bağ dokusu (interstisiyel) alanları (yıldız) ve seminifer tübül (ST) ile gösterilmiştir. H&E boyama (x20)



Şekil 4.8. RES grubuna ait testis dokusu. Spermatojenik hücre serilerindeki döküntü alanları ok ile gösterilmiştir. H&E boyama (x40)

4.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru Sonuçları

Seminifer tübüllerdeki germinal epitelin değerlendirildiği Jonsen Tübüler Biopsi sonuçlarına göre kontrol, PAC, RES ve PAC+RES grupları için elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda kontrol grubu ile antioksidan olarak RES uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken, PAC ve PAC+RES verilen deney grubu ile kontrol grubunun Jonsen Tübüler Biopsi sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

Tablo 4.1: Johnsen Testiküler Biyopsi Sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

n:100	Kontrol grubu	RES grubu	PAC grubu	PAC+RES grubu	P
Johnsen biyopsi skoru	9.16 $\pm$ 0.80	8.85 $\pm$ 0.84	6.26 $\pm$ 1,24 ^a	6.93 $\pm$ 1.09 ^b	0,05

Gruplar arasındaki farklılıklar a ve b ile gösterilmiştir.

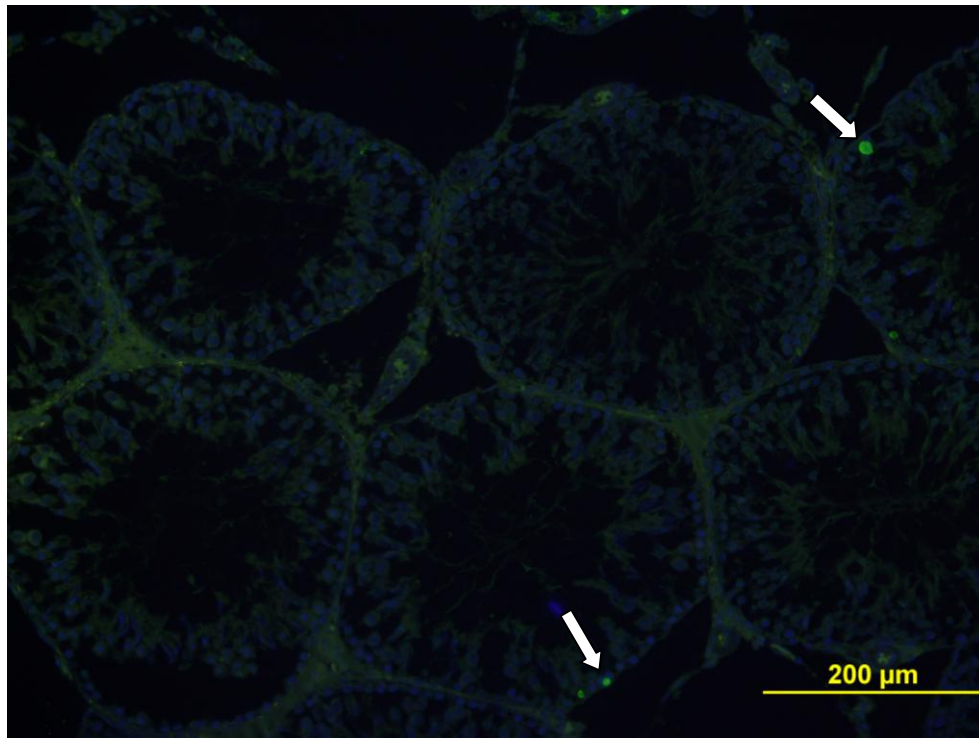
4.4. TUNEL Değerlendirmesi

Çalışmada PAC' in apoptoz üzerine etkisi ve antioksidan özellikteki RES' ün olası koruyucu özelliklerini belirlemek üzere, apoptoz çalışmalarında DNA parçalanmasını tespit amacıyla kullanılan TUNEL yöntemini uyguladık.

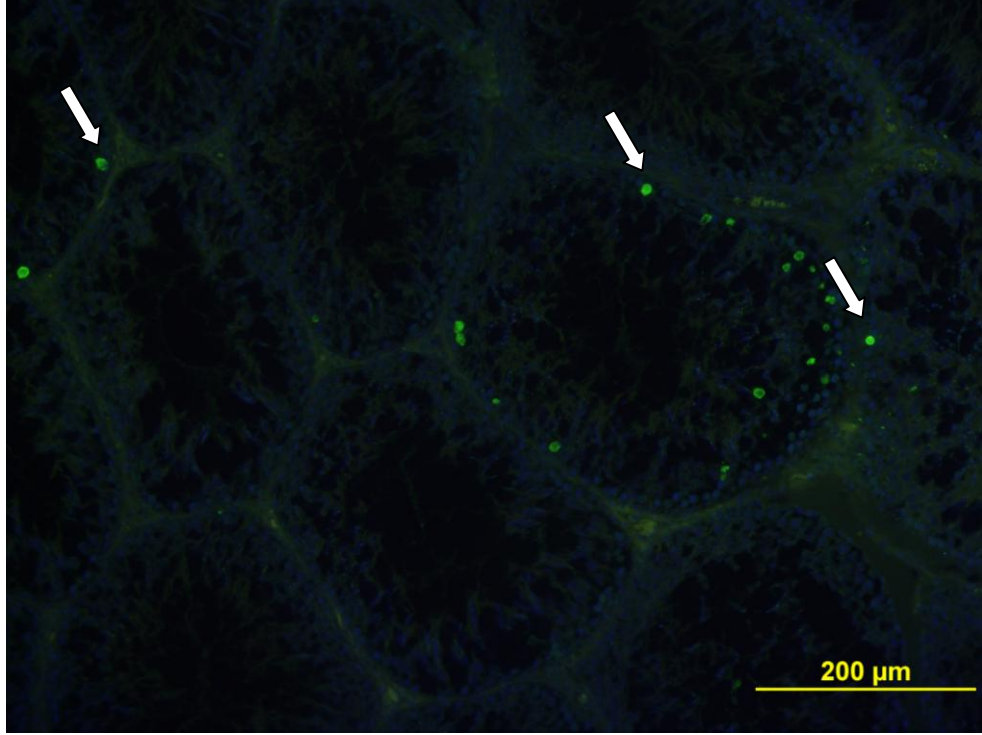
Apoptotik hücreler genellikle spermatogenetik seriye ait hücrelerde belirlendi. Kontrol, RES ve PAC+RES gruplarında apoptotik hücreler sıklıkla spermatogonyum ve primer spermatosit hizasında gözlenirken, PAC grubunda seminifer tübül lümenini çevreleyen hücre serisinin tamamında gözlemlendi. Apoptotik hücre sayımı sonuçları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Apoptotik hücre sayımı sonuçlarına göre kontrol grubu, PAC+RES grubu ve RES grubu arasında anlamlı fark olmamasına rağmen PAC uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.2: Apoptotik Hücre Sayım Sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

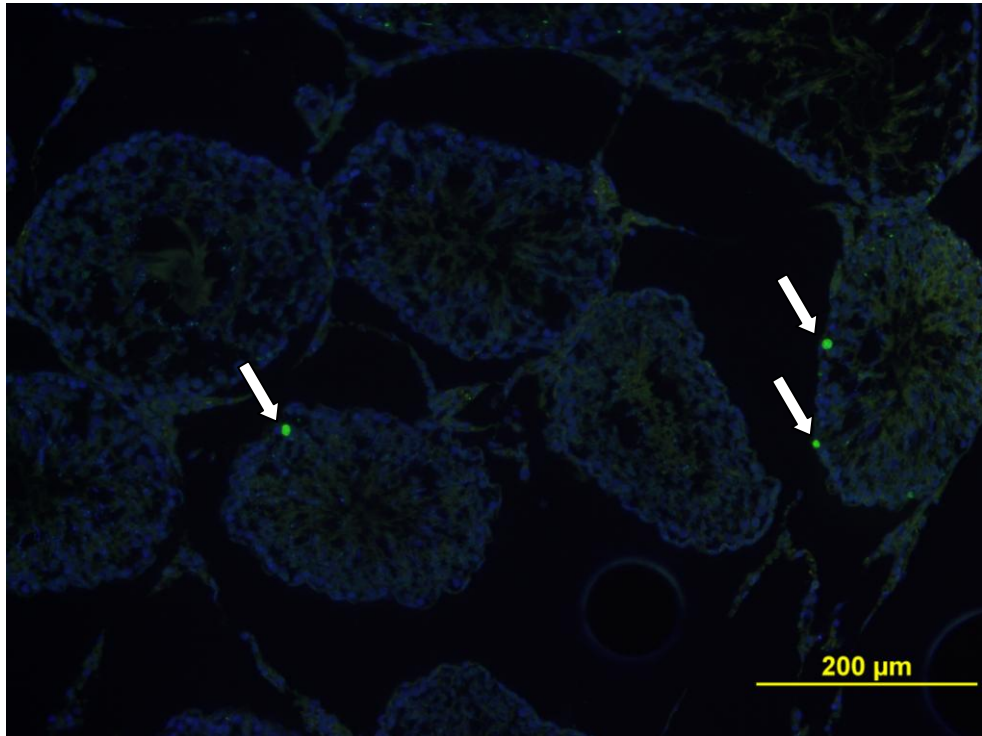
	Kontrol grubu	RES grubu	PAC grubu	PAC+RES grubu	<i>p</i>
TUNEL pozitif hücre sayısı	0.22 $\pm$ 0.57	0,68 $\pm$ 1,30	1,66 $\pm$ 2.08*	0.68 $\pm$ 1,36	0,05



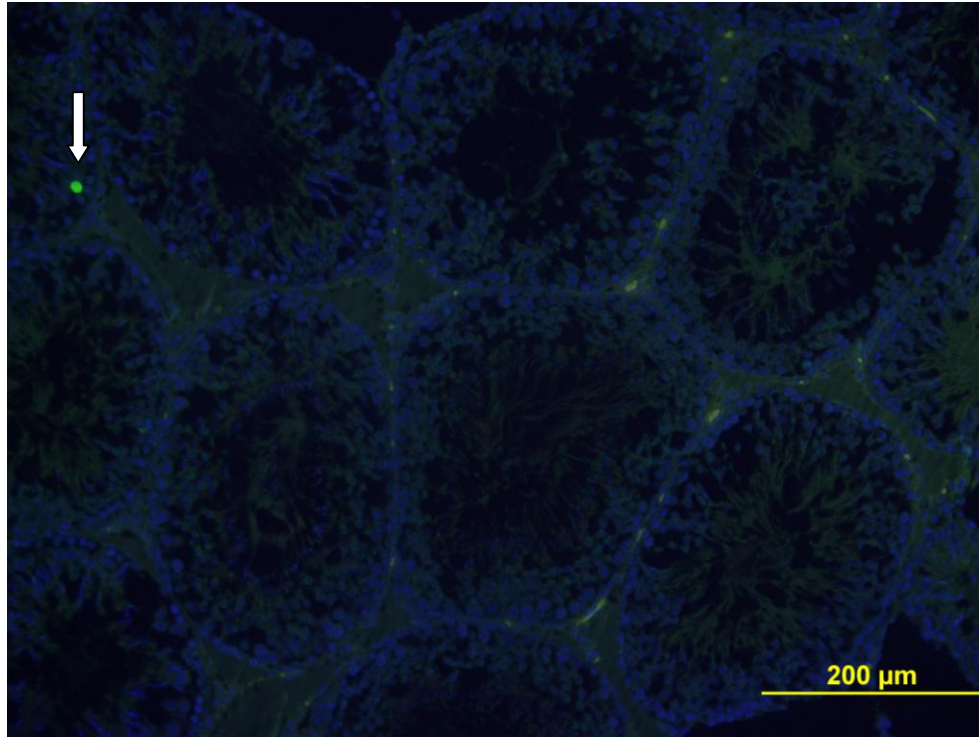
Şekil 4.9: Kontrol grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama. TUNEL pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.



Şekil 4.10: PAC grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama. Tunel pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.



Şekil 4.11: PAC+RES grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama. Tunel pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.



Şekil 4.12: RES grubuna ait testis kesitinde TUNEL boyama. TUNEL pozitif hücre(ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Elde edilen testis dokusunda MDA, CAT ve SOD enzim aktiviteleri biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, kontrol grubunun ortalama CAT seviyesi $4,22 \pm 0,62$, 4 hafta boyunca sadece resveratrol uygulamasına maruz kalan grubun ortalama değeri $4,43 \pm 1,61$, 4 hafta boyunca haftada bir kez paklitaksel uygulanan grupta ortalama değeri $4,40 \pm 1,29$ ve her iki uygulamanın birlikte yapıldığı grupta $4,17 \pm 0,60$ olarak belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($p > 0,05$). ELİSA yöntemi kullanılarak elde edilen SOD ve MDA değerleri (Tablo 4.2) de gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0,05$).

Tablo 4.3: Doku örneklerinde ortalama CAT, SOD ve MDA ölçüm sonuçları

Gruplar	CAT	SOD	MDA	P
Kontrol grubu	$4,22 \pm 0,62$	$0,32 \pm 0,7$	$0,18 \pm 0,6$	$p > 0,05$
RES grubu	$4,43 \pm 1,61$	$0,30 \pm 0,12$	$0,20 \pm 0,06$	
PAC grubu	$4,40 \pm 1,29$	$0,33 \pm 0,6$	$0,16 \pm 0,9$	
PAC+RES grubu	$4,17 \pm 0,60$	$0,45 \pm 0,43$	$0,30 \pm 0,41$	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanserli hücrelerin normal hücrelere göre hızlı büyümesi ve çoğalması nedeniyle çoğu kemoterapötik ilaç, bu tür özellik taşıyan hücrelerin tahrip edilmesi için geliştirilmiştir. Ancak ilaç, hızlı olarak bölünen malign hücreler yanında bağırsak ve ağız mukoza epiteli, kemik iliğinin hematopoietik hücreleri, kıl folikülü hücreleri, testisin germinatif epiteli, embriyo ve fetüs hücreleri gibi normal yapıdaki hücrelerdeki bölünmeyi de engeller (60, 61). Örneğin erkek infertilitesi ve hatta sterilitesi kemoterapötik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği olumsuz faktörlerden birisidir (61, 62). Spermatogenezisteki hatalar, sperm kalite parametrelerindeki bozukluklar, ejakülasyon bozukluğu, hipotalamus-hipofiz-gonad eksenindeki fonksiyon bozukluğu, cinsel işlev bozukluğu gibi olumsuz durumlar kemoterapötiklerin üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler arasında gösterilmektedir (60, 61, 63). Testisteki Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen kemoterapik ilaçlara dirençli iken, germinal epitel bu ilaçlara duyarlılık göstermektedir. Ancak kullanılan kemoterapinin dozu ve uygulama sürelerine bağlı olmakla birlikte, eğer germinal epiteldeki kök hücreler sağlam kalırsa, tedavinin sonlandırılmasından sonra belirli zaman periyodunda spermatogenezisin geriye dönebildiği araştırmalar ile gösterilmiştir (61, 64). Öte yandan farklı yapıdaki kemoterapötiklerin sağlıklı erkeklerin üreme sistemindeki yan etkilerini tespit etmek ve bu olumsuz etkilere karşı koruyucu önlemler almak amacıyla çalışmalar yapılmış ve halen de yapılmaktadır (64). Bu çalışmaların pek çoğunda kemoterapötiklerin genellikle oksidatif stresle ilişkili veya ilişkisiz DNA hasarı oluşturma mekanizmasıyla erkek üreme sisteminde yan etkilere sebep olduğu, dolayısıyla da farklı yapıdaki birçok antioksidan maddenin koruyucu rollere sahip olduğu bildirilmektedir (64, 65).

PAC meme, ovaryum, akciğer, baş-boyun ve özofagus kanserleri gibi epitelyal orjinli kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan taksan grubu bir kemoterapotik ajandır ve etkisini mikrotübüllerin depolimerizasyonu sağlayarak mikrotübül yapılarını stabil edip

mitozu durdurarak gösterir. PAC' in aynı zamanda, sıçan testislerinde spermatogenez, sperm kalitesi, germ hücreleri ve kan-testis bariyerine verdiği zararlar ile erkek bireylerde infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (7).

Samouilidou ve ark. 4 hafta boyunca haftada bir kez 12,4 mg/kg paklitaksel uyguladıkları sıçanların yarısını uygulama bittikten 6 gün, diğer yarısını da 11 hafta sonra dekapite ederek reproduktif parametreleri incelemişlerdir. Kısa süre sonra dekapite edilen hayvanlarda prostat bezi, epididimis ve testis ağırlıkları ile sperm yoğunluğu ve motilitesinde azalmalar, testisin histolojik yapısı incelendiğinde ise Leydig hücrelerinde dejenerasyon, spermatogonium, spermatosit ve spermatidlerde azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen uzun süre sonra dekapite edilen hayvanlarda ise sperm yoğunluğundaki azalma hariç diğer parametrelerde önemli düzelmelerin ortaya çıktığı gözlenmiştir (65).

Bizim çalışmamızda da, deney hayvanlarına 10 mg/kg paklitaksel haftada bir gün i.p. olarak uygulandıktan 4 hafta sonra dekapite edildi ve paklitaksel grubunda lümene yakın alanlarda intersellüler boşluklar ve yer yer hücre kayıpları izlendi. Bazı tübüllerde nekroz, seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epitelinde düzensizlik gözlemlendi. Sadece PAC uygulanan sıçanların testis dokularında germinal epitelde vakuol oluşumu ve spermatojenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Gelişmekte olan spermatidler, klasik görüntülerini kaybetmiş olarak gözlemlendi ve Sertoli hücrelerinin seminifer tübüldeki yerleşimleri belirgin değildi ve seminifer tübül lümeninde döküntü alanlarına rastlandı.

Borovskaya ve ark. (68) yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara 7,6 mg/kg paklitaksel uygulaması sonucunda epididimisten aldıkları smear örneklerinde motil sperm hücrelerinin sayısının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığını saptamışlardır.

Borovskaya ve ark. (69) yine yaptıkları bir çalışmada, sıçan deney başlangıcından itibaren 3 gruba ayırarak 2, 3 ve 6 ay boyunca ip. olarak PAC uygulamışlardır. 2 ay sonra dekapite edilen sıçan testis dokularını kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında % 59 oranında spermatogonyum sayısında azalma olduğu gösterilmiş ancak Sertoli hücrelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Üç ay sonra dekapite edilen sıçan testis dokularında spermatogonyumlarda ve olgun sperm hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında %72 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Altı ay sonra dekapite edilen

sıçan testis dokularında ise total sperm sayısında ciddi azalma olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile PAC uygulamasının uzun süre yapıldığı deney hayvan gruplarında testis üzerindeki olumsuz etkilerinin arttığı gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da tek doz PAC (10 mg/kg) uygulanması, sıçan testislerinde önemli ölçüde hasar oluşturmuştur. Bu hasar çoğunlukla spermatojenik seri hücrelerinde dağılma şeklinde gözlemlendi. Johnsen tübüler biyopsi skoru sonuçlarına göre paklitaksel grubunu diğer gruplarla karşılaştırdığımızda skorlamada istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (Tablo 4.2). TUNEL yöntemi ile pozitif apoptotik hücre sayımı sonuçlarına göre kontrol grubu, PAC+RES grubu ve RES grubu arasında anlamlı fark olmamasına rağmen, PAC uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (Tablo 4.3). PAC' in seminifer tübül epitelinde meydana getirdiği hasarın antioksidan özellikte olan RES tarafından azaltıldığı gözlenmiştir. Bizim elde ettiğimiz deney sonuçları benzer çalışmalarda sıçan testis dokusunda PAC 'in oluşturduğu hasar ile paralellik göstermektedir.

Işık ve ark. (60) sıçan testisi üzerinde metotreksat (MTX)' in etkilerini incelediği bir çalışmada 2, 4 ve 6 hafta süreyle haftada bir 0.7 mg/kg dozunda uygulanan MTX' ın; özellikle spermatosit ve spermatidlerde öldürücü hasar yarattığı, ancak; germinal epitelin kök hücrelerini oluşturan spermatogonyumların en az etkilenen hücre grubunu oluşturdukları, böylece; MTX' in testis dokusu üzerindeki etkilerinin geri dönüşümlü olduğu düşüncesini ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. PAC uygulaması sonucunda spermatosit ve spermatidlerde öldürücü hasar ortaya çıkarken, spermatogonyumların en az etkilenen hücre grubunu meydana getirdiği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, PAC ile RES verilen gruplarda dokunun histolojisinde, DNA hasar tayininde PAC grubuna göre PAC+RES grubunda iyileşmeler olduğu tespit edilmiştir.

Dygai A.M ve ark. PAC uyguladıkları sıçan testis dokularında kontrol grubu ile kıyasladığında spermatogonyumların sayılarının azaldığını ve Sertoli hücre sayısının artış gösterdiğini ve total sperm sayısının PAC uygulanan deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı göstermişlerdir (70).

Borovskaya T.G ve ark. 7,6 mg/kg PAC uyguladıkları sıçan testis dokularında morfolojik ve fonksiyonel sperm parametrelerini incelediklerinde, PAC grubunda kontrol grubuna kıyasla total spermatozoon sayısının azaldığını, anormal spermatozoon sayısının artış gösterdiğini ve hareketli spermatozoon sayısında azalma görüldüğünü saptamışlardır (71).

Sarıözkan ve ark. PAC' in ve Dosetaksel (DTX)' in testis ve sperm hücreleri üzerindeki hasar oluşturunca etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 4 mg/kg PAC uygulamasının sperm hareketliliği ve sperm konsantrasyonunu azalttığı, seminifer tübül epitelindeki spermatojenik seri hücrelerin bozulduğunu ve anormal sperm sayısının artış gösterdiğini saptamışlardır (72).

Antioksidanlar çeşitli hastalıkların oluşmasında tetikleyici rol oynayan “oksidatif stres” sonucu açığa çıkan serbest radikallerin üretilmesini engelleyerek canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelerdir (73).

Resveratrolün antioksidan aktiviteye sahip olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır. Resveratrol, hücre membranlarını koruyarak yaşayan hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmaktadır (74-77).

RES'in doğal antioksidan etkisi ROS artışının azalması, mitokondride oluşan süperoksit radikallerin temizlenmesi ve fenton reaksiyon ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibe olması gibi 3 farklı mekanizma ile gerçekleşir (75) . İn vitro koşullarda potansiyel antioksidan etki göstermemesine karşın, canlı organizmada RES'in etkili bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (57). RES kalp, beyin ve böbrekteki iskemi/reperfüzyon koşullarında NO sentezini uyarır ve oksidatif stresi azaltır (50, 59).

Burkitt M.J ve ark. RES etkisini inceledikleri bir çalışmada, testislerin makroskopik görünüm ve ağırlık açısından farklılık göstermediğini, ancak spermatozoa sayısının daha yüksek bulunduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada anormal spermatozoa oranının daha düşük, serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinin daha yüksek olduğu da gösterilmiştir. Bu değişikliklerin nedeninin hipotalamus-hipofiz-gonad aksının RES tarafından uyarılması olduğu bildirilmektedir (61). RES'ün germ hücreleri ve spermatozoonlar üzerinde doz değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada RES'ün lipit

peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği ve semenin kriyopreservasyonu ya da IVF-ICSI gibi mekanik teknikler için spermeleri reaktif oksijen türevleri (ROS)'nin saldırılarına karşı daha iyi koruyabilen özelliği sebebiyle yeni sperm kültür mediumlarına eklenmesinin yararlı olabileceği bildirilmiştir (81).

Diyabetik sıçanlar üzerine yapılan başka bir çalışmada düzenli olarak günlük alınan resveratrolün lipid peroksidasyonunu azalttığı, sıçan hipokampus ve frontal korteksinde antioksidan özellik gösterdiği gözlemlenmiştir (82).

Sıçanlarda Cisplatin'in kardiyotoksitesi üzerinde yapılan bir çalışmada, RES' in miyokardiyal hasarı azalttığı, laktat dehidrogenaz artışını önlediği, antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı ve MDA artışını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, RES' in kanser hücrelerinde cisplatin ile oluşan sitotoksositeye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (14). Yine başka bir çalışmada testiste germ hücre apoptozisini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (13).

2001 yılında yapılan bir çalışmada da RES içeren üzüm çekirdeği ekstraktlarının glial hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir (12). Aynı zamanda RES 'in nöronal oksidatif stres ve nitrozatif stres ile beyinde nöroblastoma hücrelerindeki mitokondriyal hasara karşı koruyucudur ve oksidatif stresi süpürücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (2).

Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada RES'in, kadmiyum klorürün testislerde neden olduğu lipid peroksidaz artışını azalttığı ve azalan süperoksid dismutaz (SOD) seviyesini yeniden artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca RES'in antioksidan etkisi ile testiste azalmış olan antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunu artırdığı ve artmış olan proapoptotik Bax ve p53 gen ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir (80).

Jang ve ark. kanserin üç önemli evresi olan başlatma (initiation), yükseltme (promotion), ilerleme (progression) evreleri ile ilgili olayların inhibisyonuna ve in vitro olarak birçok farklı kanser hücre tipinde apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini tanımlamışlardır (81).

Türedi ve ark. (82) 21 günlük bir çalışmalarında erkek sıçanlara antikanserojen ilaç olarak kullanılan Doxorubicin (DOX) tek doz 10 mg/kg intraperitoneal olarak uygulamış ve antioksidan olarak günlük 20 mg/kg RES ip uygulayarak testis dokularını incelemiştir. RES ve DOX birlikte uygulanan gruplarda seminer tübül epitellerindeki hasarın sadece DOX verilen gruba oranla anlamlı olarak azaldığı

görülmüştür. TUNEL yöntemi sonucunda DOX grubu ile karşılaştırıldığında RES ve DOX birlikte uygulanan grupta anlamlı olarak apoptotik pozitif hücrelerin azaldığı gösterilmiştir.

Forgacs ve ark. fare primer Leydig hücre kültürünün testosteron üretimine Resveratrol'un etkisini incelemişlerdir. Primer Leydig hücre kültürleri, 48 saat süresince 1,56-200 μ M konsantrasyonda Resveratrol" e maruz bırakılmıştır. Sonuçta 12,5-50 μ M Resveratrol" un testosteron üretimini arttırdığı belirlenmiştir (82).

Zhao Y. ve ark. yaptıkları bir çalışmada diabetik sıçanlara antioksidan olarak RES vermiş ve testis dokuları TUNEL metodu ile değerlendirildiğinde diabetik kontrol grubu sıçanlarla diabetik sıçanlara RES uygulanan deney grubu kıyaslandığında, pozitif apoptotik hücre sayısının RES verilen diabetik sıçanlarda azaldığı gösterilmiştir (83).

Eleawa SM ve ark. cisplatin toksisitesi ile testis dokusunda oluşturdukları hasarın RES ile engellenmesinin inceledikleri bir çalışmada cisplatin ve resveratrolün birlikte uygulandığında sperm parametrelerinde artış, seminifer tübül epitelinde cisplatin grubuna göre düzeltilmeler saptamışlardır (84).

Mendes TB, Paccola CC ve ark. varikosel olgulu sıçan testis dokularına resveratrol uygulayarak sperm motilitesinde artış, TUNEL pozitif hücre sayısında azalma belirlemişlerdir (85).

Biz de yaptığımız çalışmada PAC ile oluşturulan hasarı engellemek için deney gruplarına 10 mg/kg RES uyguladık. PAC ile birlikte RES uygulanan sıçanların testis dokularındaki seminifer tübüllerin, PAC uygulanan gruba kıyasla kısmen normal morfolojiye sahip olduğunu gözlemledik. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sayıca artış ve morfolojik olarak düzelme işaretleri gözlemlendi. Tubuli seminiferi kontorti kesitleri normale oldukça yakındı ve Sertoli hücrelerinde düzelme belirgin olarak izlendi. Bazal membran ve spermatogenik seri hücrelerinin de normale yakın olduğu gözlemlendi. JTBS skorlamasına göre PAC ile RES verilen grupta sadece PAC verilen gruba göre düzelme olduğu gözlemlendi ve RES uygulamasının seminifer tübüllerde istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağladığı gösterildi. Ayrıca PAC uygulanan gruptaki apoptotik pozitif hücre sayısı RES ve PAC'in birlikte uygulandığı grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (Tablo 4.3).

Sonuç olarak PAC birçok organı etkilediği gibi testis dokusunda da çok ciddi histopatolojik hasarlar oluşturmaktadır. Bu hasarı engellemek için koruyucu amaçlı olarak verilen RES'ün testiste koruyucu ve düzeltici olabileceği çalışmamızda gösterildi. Her ne kadar uzun zamandır kanser tedavisinde PAC' in üreme organları üzerindeki etkisi konusunda farklı çalışmalar yapılmış olsa da, testiste meydana gelen pek çok karmaşık olayın daha iyi anlaşılabilmesi ve antioksidanların PAC ile kullanımının hasta sağlığı açısından faydalarının daha iyi anlaşılabilmesi için, elde edilen bulgura ek olarak; immunofluoresan çalışmalar ve Western blot analizlerinden elde edilecek verilerle birlikte ele alınmasının literatür bilgilerine daha çok katkı sağlayacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Sabuncuoğlu S. Özgüneş, H. Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2011; Cilt 31/Sayı 2/pp.137-1
2. Lee SR, Kwak JH, Kim HJ, Pyo S (2007). Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SHSY5Y neuroblastoma cells. Bioorg Med Chem Lett, 17; (7): 1879-1882.
3. Schiff P.B. Fant J.Horwitz, S.B. "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol" Nature, 1979; 277, 665-667.
4. Schiff P.B. and Horwitz S.B. 1980, Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, Proc Natl Acad Sci USA, 77: 1561-5.
5. Aslan Ö. Vural H. Kömürcü Ş. Özet A. 2006, Kemoterapi alan Kanser Hastalarına Verilen Eğitimin Kemoterapi Semptomlarına Etkisi, C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 2006, 10(1), s 16.
6. Sabanegh, E.S. Ragheb, A.M. Male Fertility After Cancer, Urology 2009; 73: (2) 225–231
7. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji, 4. Cilt, Feryal Matbaası, Ankara 1994; 1047
8. Gülçiçek O.B. Deneysel Tıkanma İkterinde Curcuminin Oksidatif Stres Ve Hepatik Hasar İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2.Genel Cerrahi Kliniği 2008.
9. Wang T.H. Wang H.S. Soong Y.K. 2000, Paclitaxel-induced cell death, Cancer, June 1, Volume 88, Number 11, 2619-2628.

10. Amos L.A. and Löwe J. 1999, How Taxol® stabilises microtubule structure, *Chemistry& Biology*, 6: R65-R69.
11. Aggarwal B, Shishodia S, et al. Resveratrol in health and disease, CRC Press. 2005.
12. Royshowdhury S, Wolf G, Keilhoff D, Bagchi D, Horn T. Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stres. *Nitric Oxide* 2001; 5; 137-149.
13. Jiang YG, Peng T, Luo Y, Li MC, Lin YH. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2, 5-hexanedione. *Chin Med J* 2008; 121(13): 1204-1209.
14. Wang J, He D, Zhang Q, Han Y, Jin S, Qi F. Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24; 675-80.
15. Juan ME, Gonza' lez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodri' guez-Gil JE, Planas JM. Trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats. *J. Nutr* 2005;135; 4: 757-760.
16. Collodel G, Federicoa M.G, Geminiana M, Martinic S, Bonechic C, Rossic C, Figurad E, Morettia E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology* 2011; 31: 239–246
17. Özdamar S, Sorkun H. Genel Embriyoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri 2002; 4-6
18. Sadler TW. Langman's Medical Embryology, 5th Ed. William and Wilkins, Baltimore, 1985.
19. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (8. Baskı) , Yıldırım M, Dalçık H (Çeviri Editörü) , İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri, 2009: 262-265.
20. Sadler TW, Basaklar AC. Langman's Medikal Embriyoloji (9.baskı), Ankara, Palme Yayıncılık 2005: 313-354.

21. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Dogum Defektlerinin Temelleri. Müftüoglu S, Atilla P, Kaymaz F (Çeviri Editörleri), Ankara, Günes Tıp Kitabevleri 2009: 176–178.
22. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas (Altıncı baskıdan çeviri), Barış Baykal, Palme Yayıncılık, Ankara 2014: 785-802.
23. Girgin A, Alabay B, Liman N, Özfiliz N, Gülmez N ve ark. Veteriner Özel Histoloji. (Editör: Prof. Dr. Aytekin Özer), Nobel Yayın Dağıtım, 1. Baskı, Kasım 2008
24. Odar İV., Anatomi (İç organlar, hazım, solunum, urogenital, sirkülasyon sistemleri ve iç salgı bezleri), Hacettepe-Taş Kitapçılık. 1986
25. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, 3.Baskı 2. Cilt Güneş Kitapevi, Ankara. 2001.
26. Sancak B ve Cumhuri M. Foksiyonel Anatomi (Baş-Boyun ve İç Organlar), 4.baskı, Odtü Yayıncılık, Ankara. 2008.
27. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins SP, Dyson M, Dussek JE et al. Grays Anatomy, 37th edition, Edinburgh: Churchill Livingstone, Wiley. 1989.
28. Walker WF ve Homberger D, Anatomy & Dissection of the Rat. Third edition. W.H. Freeman and Company; USA.1997, s. 67-75
29. Poyraz, Ö.Sıcakkanlı hayvanlar. (Editör: Poyraz, Ö), In: Laboratuvar hayvanları bilimi. Ankara: Kardelen of set, 2000, s. 179-223
30. Bayraktaroğlu AG, Deneklerin Histolojik Özellikleri Bunların Deneyisel Çalışmalarda Sınırlayıcı Yönleri. Editör: Orhan Yücel. Journal of Clinical Analytical Medicine. Derman Tıbbi Yayıncılık.Ankara, (Electronic Journal) 2012, 33-38. Erişim: <http://www.jcam.com.tr/> 01.01.2018
31. Junqueira LC, Carneiro J.Temel Histoloji (10. Baskı), Solakoglu S, Aytekin Y. (çeviri editörü), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2009: 135-56
32. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi, Demir R. (Çeviri editörü), Ankara Palme Yayıncılık, 2006: 459-467.

33. Jangueria LC, Carneiro J, Kelley OR. Temel histoloji (Çev: Aytekin Y. Solakoğlu S. Ahışalı B.), Barış kitabevi, 1998: s.407-422.
34. Ross HM, Romrell JL. (). Histology: a text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd edition. 2006: p.603-625.
35. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text And Atlas. 6th Ed. Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2011; 784-816.
36. Junqueria LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2005; 431-448.
37. Kierszenbaum A. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. (Çeviri Editörü: Ramazan Demir). Palme Yayıncılık, Ankara, 2006, s. 531-550
38. Brackett BG. Memelilerde Üreme: Erkek Üreme Fizyolojisi Editör: Reece WO, In: Dukes Veteriner Fizyoloji, 12. Baskı, (Çeviri Editörü: Sedat Yıldız). Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. Malatya. 2008: 657-676 s.
39. Özer A, Özfiliz N, Erdost H, Zık B. Veteriner Embriyoloji. Nobel Yayınevi, 3. Baskı, Eylül 2007
40. Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp AŞ Yayınları, Ankara, 2002, s. 231-252
41. Tosun M. İnsan Gonadlarının İntrauterin Gelişiminin Histolojik Değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji (TIP) Anabilim Dalı, Doktora Tezi-Konya. 1998
42. Guyton AC, Hall JE. Çeviri Editörleri: Çavuşoğlu H. Çağlayan Yeğen B. Tıbbi Fizyoloji, 11.basım, Yüce yayımları A.Ş & Nobel Tıp Kitapevleri. 2006.
43. Ganong WF. Çev. Ed: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Tıbbi Fizyoloji, 19.baskı, Ankara. 1999.
44. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Çeviri; Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Fizyoloji, 5. Baskı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara. 2008.

45. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;111: 273–9.
46. Seidman A. Tiersten C. Hudis M. Gollub S. Barrett T. Yao J. Lepore T. Gilewski V. Currie J. Crown, Phase II trial of paclitaxel by 3-hour infusion as initial and salvage chemotherapy for metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 13 1995; 2575–2581.
47. Panchagnula R.. Pharmaceutical Aspects of Paclitaxel. . *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 172: 1-15.
48. Adams J. D. Flora K. Goldspiel B. R. Wilson J. W. Finley R. . Taxol: a History of Pharmaceutical Development and Current Pharmaceutical Concerns, *J. Nat. Cancer Inst. Monogr.* 1993; 15; 141-147
49. Lee W. L. Shiau J.Y. Shyur L. F. Taxol, Camptothecin and Beyond for Cancer Therapy. *Advances in Botanical Research*, 2012: 62.
50. Singla A. K. Garg A. Aggarwal D. Paclitaxel and Its Formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;235; 179-192.
51. Terwogt J.M.M. Nuijen B. Huinink T. Beijnen J. H. Alternative Formulation of Paclitaxel. *Cancer Treatment Reviews* 1997; 23, 87-95.
52. Horwitz S. B. 1994. Taxol (Paclitaxel): Mechanism of Action. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 5, 6: S3-6
53. Goldberg DM, Tsang E, Karumanchiri A, Diamandis E, Soleas G, Ng E, et al. Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal Chem.* 1996; 68 (10) : 1688-94.
54. Fremont L, et al. Minireview - Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66 (8): 663-673.
55. Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanasopoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki AI, Spanos M, et al. Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties *Food Control* 2006; 17 (9): 700-706.

56. Serazetdinova L, Oldach K, Lörz H, et al. Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of plant physiology* 2005; 162 (9): 985-1002
57. Burkitt MJ, Duncan J, et al. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys* 2000; 381 (2) : 253-63.
58. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*. Apr 24; 2003; 341 (8852): 1103-4.
59. Jiang H. Zhang L. Kuo J. Kuo K. Gautam S.C. Groc L. et. al. Resveratrol induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005; 4 (4): 554-61.
60. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: (5297): 218.
61. Demirci U, Benekli M, Büyükberber S, Coşkun U. Late side effects of cancer therapy. *Int J Hematol Oncol* 2010;4: 250-61.
62. Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10: 92-102.
63. Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic, basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol* 2001;15: 611-7
64. Meistrich ML. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53: 261-6. 17. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* 2010;16: 14-22.

65. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113(Suppl 1): s.2-6.
66. Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* 2008;23: 251-8.
67. Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji*, 4. Cilt, Feryal Matbaası, Ankara 1994; 1047.
68. Koehler-Samouilidou G, Kaldrymidou E, Papaioannou N, Kotsaki-Kovatsi VP, Vadarakis A. The effect of paclitaxel (taxol) on the reproductive system and the semen parameters as well as on other organs of male rats. *J Hellenic Vet Med Soc* 2001;52: 23-31.
69. Translated from *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, , June, 2009 Original article submitted October 9, 2008 :Vol. 147, No. 6, pp. 655-658
70. Dygai AM et al. Responses of Spermatogenous Tissue and Mechanisms of Their Development Upon Cytostatic Exposure. 2015;159(6):743-6.
71. Sariözkan S ve ark. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruit extract allaviates testis and sperm damages induced by taxane-based chemotherapeutics. 2017;95:1284-1294.
72. Wang W, Sun Y, Liu J, et al. ProtectiveEffect of the aflavins on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Male Rats. *Food And Chemical Toxicology* 2012; 50: 3243-50.
73. Forgacs Zs, Somosy Z, Telbisz A, Massanyi P, Lukac N, et al. Effect of resveratrol on the testosterone production of mouse primary leydig cell culture. 2004
74. De la Lastra CA ve Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35(5): 1156-60.
75. Mukherjee S, et. al. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response.* 2010; 8(4): 478-500.

76. Cadenas S ve Barja G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative. DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1531-1537.
77. Hattori R, et. al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H1988-1995.
78. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275 (5297): 218.
79. Singla A. K, Garg A, Aggarwal D.. Paclitaxel and Its Formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;235, 179-192.
80. İkizler, M. Dernek. S. Erkasap, N. Kaygısız, Z. Sevin, B. Kural, T. The Hemodynamic Efficacy of Resveratrol on Reperfüzyon Injury in Isolated Rat Hearts. 2003;11: 91-9.
81. S. Türedi et al. *Experimental and Toxicologic Pathology* 67 2015; 229–235
82. Translated from *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, Vol. 156, No. 10, pp. 470-472, October, 2013 Original article submitted June 21, 2012.
83. Y. Zhao et. al. Resveratrol attenuates testicular apoptosis in type 1 diabetic mice: Role of Akt-mediated Nrf2 activation and p62-dependent Keap1 degradation 2018; 14: 609-617.
84. Eleawa SM et al. Resveratrol Reverses Cadmium Chloride-induced Testicular Damage and Subfertility by Downregulating p53 and Bax and Upregulating Gonadotropins and Bcl-2 gene Expression 2014; 60(2):115-27.
85. Mendes TB et al. Resveratrol improves reproductive parameters of adult rats varicocelized in peripuberty 2016 ;152(1):23-35.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Pınar BİLGİCİ

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25.07.1989/ Kocasinan

Medeni Durumu: Evli

Email: pinar.cansu@kapadokya.edu.tr

İletişim Adresi: Mevlana mah. Elçibey cad. Enpark sit. B blok 1. Kat Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	E.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji	2012
Lise	İstikbal Lisesi	2006
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi	
Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD		2017

İŞ DENEYİMLERİ

YılKurum Görev

2014– Halen Kapadokya Meslek Yüksekokulu Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce