

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ (TIP)
DOKTORA PROGRAMI

**SIÇANLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN TESTİS
HASARI ÜZERİNE SİLYMARİN'İN OLASI ETKİLERİNİN
MORFOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

AYŞE GİZEM ŞAHMELİKOĞLU
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hulki BAŞALOĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Buket DEMİRCİ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20049 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışma sürecimin tamamında yanımda olup her konuda ilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Hulki BAŞALOĞLU ve Prof. Dr. Buket DEMİRCİ'ye;

Çalışma sürecim boyunca her türlü yardımlarından ötürü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı hocalarımızdan Prof. Dr. Melih AKSOY, Dr. Öğr. Üyesi Uğur UÇAN ve doktora öğrencileri Vet. Hek. Begimai AZHIBAEVA'ya;

Deney süresince ve sonrasında her daim yanımda olup yardımcı olan sevgili çalışma arkadaşlarım Nörofizyoloji anabilim dalı doktora öğrencisi Hatice Fulya YILMAZ ve Biyofizik anabilim dalı doktora öğrencisi Ayşegül TÜRKKOL'a;

Çalışmanın veri oluşturma ve değerlendirme aşamasında verdiği desteklerden ötürü Histoloji anabilim Araş. Gör. Esra GÖKMEN'e;

Biyokimya analizlerinde ve çeşitli süreçler içerisinde içtenlikle yanımda olup yardım eden Dr. Öğr. Üyesi Ayça TUZCU, Arş. Gör. Dr. Burçin İrem ABAS ve Arş. Gör. Dr. Ömer ERDOĞAN'a;

Her daim destek, ilgi ve sevgileri ile yanımda olan ve beni bilimsel anlamda destekleyen kıymetli meslektaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Eda Duygu İPEK ve Araş. Gör. Dr. Behiye SARIYILDIZ'a;

Tüm çalışma süresi boyunca hem deneysel çalışmalarına olan yardımları hem de göstermiş olduğu özveri, sabır ve destekleri için eşim Koray ŞAHMELİKOĞLU'na, bu zorlu süreçte bana moral ve destek veren sevgili kızım Deniz ŞAHMELİKOĞLU'na ve her zaman yanımda olup hiçbir fedakarlıktan çekinmeyerek beni bugünlere getiren sevgili aileme şükran ve minnet duygularımı sunarım.

Son olarak; her koşul ve şart altında manevi şahsından güç aldığım, bizlere verdiği haklar sayesinde bugünlere geldiğim, cumhuriyetimizin kurucusu Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e en derin şükran ve minnet duygularımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
1.2. Testis Anatomisi.....	3
2.2. Testis Histolojisi	5
2.2.1. Spermatogenez.....	9
2.2.1.1. Spermatogoniyal Evre	9
2.2.1.2. Spermatozit Fazı (Mayoz).....	11
2.2.1.3. Spermatozit Fazı (Spermiyogenez).....	12
2.2.1.4. Olgun Spermiumun Yapısı.....	13
2.2.1.5. Spermium Fizyolojisi	15
2.2.2. Sıçan Testis Özellikleri	16
2.2.2.1 Sıçanlarda Spermium Özellikleri	18
2.2.3. Sisplatin	19
2.2.3.1. Sisplatin'in Kimyasal Yapısı	22

2.2.3.1.2. Sisplatin Sentezi	23
2.2.3.1.3. Sisplatin'in Etki Mekanizması	23
2.2.3.1.4. Sisplatin Direnci	26
2.2.3.1.4.1. Kan Dolaşımı Yoluyla İlaç Dolaşımı Sırasında Direnç	27
2.2.3.1.4.2. İlacın Hücre Zarından İçeri veya Dışarı Akışı Sırasında Direnç	27
2.2.3.1.4.3. Sitoplazmada Bulunan Sisplatin Sırasındaki Direnç	27
2.2.3.1.5. Kanser Tedavisinde Sisplatin Kullanımı	28
2.2.3.1.5.1 Testis Kanseri Tedavisinde Sisplatin Kullanımı	28
2.2.3.1.5.2 Diğer Kanser Türlerinin Tedavisinde Sisplatin Kullanımı	29
2.2.3.1.6. Sisplatinin Yan Etkileri	29
2.2.4. Silymarin	30
2.2.4.1. Silymarin'in Farmokinetiği	32
2.2.4.2. Silymarin'in Fizikokimyasal Özellikleri	34
2.2.4.3. Silymarin'in Antikanser Aktiviteleri	35
2.2.4.4. Silymarin'in Dozajı ve Toksisitesi	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Etik Kurul Kararı	37
3.2. Deney Hayvanları	37
3.3. Deney Tasarımı	37
3.3.1. Deney Grupları	37
3.3.2. Sisplatin ve Silymarin'in Hazırlanması	40
3.3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü	40
3.3.4. Bouin Solüsyonunun Hazırlanışı	39
3.3.5. Lityum Karbonatlı Etil Alkol Solüsyonunun Hazırlanışı	39
3.3.6. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması	40
3.3.7. Epididymis Numunelerinin Değerlendirilmesi	42

3.3.7.1. 1 ml Spermium Numunesinde Spermium Konsantrasyonunun Belirlenmesi..	43
3.3.7.2. Spermium Morfolojisinin Değerlendirilmesi	43
3.3.8. Işık Mikroskobu İncelemeleri İçin Dokuların Histolojik Takiplerinin Yapılması	43
3.3.9. Doku Kesitlerinin Alınması ve Boyanması.....	44
3.3.10. Hematoksilen – Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson’s Trikróm Boyama Yöntemleri	44
3.4. Histometrik analiz	47
3. 5. Biyokimyasal Analizler	50
4. BULGULAR	52
4.1. Sıçanların Testis ve Vücut Ağırlık Değerleri	52
4.2. Histometrik Ölçümlerin İstatistiksel Analizi	60
4.2.1. Tubuli Seminiferi Contorti apı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları...	60
4.2.2. Germinal Epitel Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	62
4.2.3. Bazal Tabaka Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	64
4.2.4. Bazal Lamina Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	65
4.2.5. Tunica Albuginea Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	68
4.2.5. Arter apı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları	70
4.2.6. Peritubuler Atrofi Oranlarının İstatistiksel Analiz Sonuçları	72
4.2.7. Spermium sayımı İstatistiksel Analiz Sonuçları	73
4.2.8. Ölü-Canlı Spermium Oranı İstatistiksel Analiz Sonuçları	75
4.2.8. Normal-Anormal Spermium Oranı İstatistiksel Analiz Sonuçları	77
4.2.8.1. Anormal Spermium Oranı İstatistiksel Analiz Sonuçları	77
4.2.8.2. Normal Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları	79
4.2.8.3. Küçük Başlı Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları	80
4.2.8.3. Rudimenter Başlı Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları	81

4.2.8.4. Kopuk Başlı Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları	82
4.2.8. Biyokimyasal Analiz Bulguları	83
4.2.8.1. TAS (total antioksidan seviyesi) İstatistiksel Analiz Bulguları	83
4.2.8.2. TOS (total oksidan seviyesi) İstatistiksel Analiz Bulguları	84
4.2.8.3. İnhibin A Sonuçları İstatistiksel Analiz Bulguları	85
4.2.8.3. İnhibin B Sonuçları İstatistiksel Analiz Bulguları	86
5. TARTIŞMA	88
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	111
KAYNAKLAR	112
EKLER	134
Ek 1 (ADÜ-HADYEK)	136
BİLİMSEL ETİK BEYANI	137
ÖZ GEÇMİŞ	138

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgI	: Gümüş iyodür
AgNO₃	: Gümüş nitrat
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ATM	: Ataksi telenjiektazi mutasyona uğramış protein
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-xL	: B-hücreli lenfoma, ekstra büyük
BUN	: Kan üre nitrojeni
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDDP	: Sisplatin, cis-diamminedichloroplatinum
CIS	: Sisplatin
Ctr1	: Copper transporter 1 (bakır taşıyıcı 1)
Cyt C	: Sitokrom c
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm oranı
FasL	: Fas ligandı
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FLIP	: Flice benzeri inhibitör protein
gDNA	: Genomik DNA
GLOBOCAN	: Global Kanser Gözlemevi
GSH	: Aktif Glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz enzimi
HCl	: Hidroklorik Asit)
H&E	: Hematoksilen ve Eozin

HMG	: High mobility group (Yüksek mobilite grubu)
HNSCC	: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IND	: Bir araştırmaya dayalı yeni ilaç başvurusu
INSL3	: İnsülin benzeri protein
IVF	: İn vitro fertilizasyon
K₂[PtCl₄]	: Potasyum tetrakloroplatinat
KI	: Potasyum iyodür
mM	: Mikromol
MMR	: Mismatch repair (yanlış eşleşme onarımı)
MPT	: Mitokondriyal geçirgenlik geçişi
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NCI	: National Cancer Institute (Ulusal Kanser Enstitüsü)
NDA	: New drug application (yeni ilaç uygulaması)
NER	: Nükleotid eksizyon onarımı
PAS	: Periyodik Asit Schiff
procaspaz-9	: Kaspaz sistein aspartata özgü proteaz
PTEN	: Fosfotaz ve tensin'in homologu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
sER	: Endoplazmik retikulum
SM	: Silymarin
TAS	: Total antioksidan seviyesi
TAİ	: Testis ağırlık indeksi
TOS	: Total oksidan seviyesi
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	İnsanda erkek genital sistem anatomik yapısı	4
Şekil 2.	Testis ve epididymis'in yapısı	5
Şekil 3.	Tubuli seminiferi contorti ve onu çevreleyen yapı	6
Şekil 4.	Tubuli seminiferi contorti epitel hücreleri ve interstisyel hücreler	7
Şekil 5.	Germ hücrelerinin klonal özelliği	10
Şekil 6.	Spermiyogenez süresi boyunca spermatidlerde meydana gelen temel değişiklikler.....	13
Şekil 7.	Olgun bir spermatozoon	14
Şekil 8.	Erkek sıçan ürogenital sistemi	16
Şekil 9.	Sisplatin'in üç boyutlu yapısının şematize edilmiş hali	21
Şekil 10.	Sisplatinin sentetik şeması	22
Şekil 11.	<i>Silybum marianum</i> sırasıyla bitki, çiçek ve tohumları	29
Şekil 12.	Silybin'in kimyasal formülasyonu	33
Şekil 13.	Silybin A ve Silybin B'nin kimyasal formülasyonu	33
Şekil 14.	İzosilybin A, silikristin, silydianin, taksifolin ve 2,3-dehidrosilybin'in kimyasal formülasyonu	33
Şekil 15.	Sağ testis ağırlıkları	51
Şekil 16.	Sol testis ağırlıkları	52
Şekil 17.	Deney gruplarında yer alan hayvanların başlangıç ağırlıkları	53
Şekil 18.	Deney gruplarında yer alan hayvanların son ağırlıklar	54
Şekil 19.	Deney gruplarında yer alan hayvanların testis ağırlık indeksleri (TAİ)	54
Şekil 20.	Deney gruplarında yer alan hayvanların sağ testis longitudinal çap uzunlukları	55

Şekil 21.	Deney gruplarında yer alan hayvanların sağ testis transvers çap uzunlukları.	56
Şekil 22.	Deney gruplarında yer alan hayvanların sol testis longitudinal çap uzunlukları	57
Şekil 23.	Deney gruplarında yer alan hayvanların sol testis transvers çap uzunlukları.	58
Şekil 24.	Deney gruplarında yer alan hayvanların tubuli seminiferi contorti çap uzunlukları	60
Şekil 25.	Deney gruplarında yer alan hayvanların germinal epitel kalınlıkları	62
Şekil 27.	Deney gruplarında yer alan hayvanların bazal tabaka kalınlıkları	64
Şekil 28.	Deney gruplarında yer alan hayvanların bazal lamina kalınlıkları	66
Şekil 29.	Deney gruplarında yer alan hayvanların tunica albuginea kalınlıkları	68
Şekil 30.	Deney gruplarında yer alan hayvanların arter çap ölçümleri	70
Şekil 31.	Gruplara göre peritubuler atrofi oranı	71
Şekil 32.	Spermium sayım sonuçları	73
Şekil 33.	Canlı spermium oranı	75
Şekil 34.	Anormal spermium oranı	77
Şekil 35.	Normal spermium sayısı	78
Şekil 36.	Küçük başlı spermium sayısı	79
Şekil 37.	Rudimenter başlı spermium sayısı	80
Şekil 38.	Kopuk başlı spermium sayısı	81
Şekil 39.	TAS (total antioksidan seviyesi)	83
Şekil 40.	TOS (total oksidan seviyesi)	84
Şekil 41.	İnhibin A düzeyleri	85
Şekil 42.	İnhibin B düzeyleri	86

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Deney gruplarının oluşturulması	38
Resim 2.	Ratlarda oral gavaj uygulanması	38
Resim 3.	Ratların sakrifiye edilmesi ve ardından intrakardiyak kan alımı	40
Resim 4.	Sıçan testislerinin uzunluk ve ağırlık ölçümleri	40
Resim 5.	Epididymis'ten spermium numunelerinin elde edilmesi için droplet hazırlanışı	41
Resim 6.	Bilgisayar ortamında tubuli seminiferi contorti çapı ölçümü	46
Resim 7.	Bilgisayar ortamında germinal epitel yüksekliği ölçümü için kullanılan referans noktaları	47
Resim 8.	A) Kontrol grubu (CON) 20X 'lik büyütmede hasarsız tubuli seminiferi contorti'lerin görünümü. (B) Sisplatin hasar grubu (CIS) peritubuler fibrozis/atrofik tubul görünümü.....	47
Resim 9.	Masson's trikrom boyama ile 40X'lık büyütmede arter çapı ölçümü için kullanılan referans noktaları	48
Resim 10.	Masson's trikrom boyama ile 20X'lık büyütmede tunica albuginea kalınlığı ölçümü	48
Resim 11.	Periodic Acid-Schiff (PAS) boyama ile 40X'lık büyütmede bazal lamina görünümü	49
Resim 12.	ELISA analizleri için kullandığımız cihaz	50
Resim 13.	(A) TAS, TOS, (B) inhibin A ve inhibin B kitleri görünümü.....	50
Resim 14.	Sıçan testislerinin morfolojik görünümleri	58

Resim 15.	Deney gruplarının x10'luk büyütmede, H&E boyamada tubuli seminiferi contorti yapılarının görünümü.....	60
Resim 16.	Deney gruplarının x20'lik büyütmede, H&E boyamada germinal epitel yapıları ok ile gösterilmiştir.	62
Resim 17.	Deney gruplarının x40'lık büyütmede, H&E boyamada bazal tabaka yapıları	64
Resim 18.	Deney gruplarının x40'lık büyütmede, PAS boyamada bazal lamina yapıları	66
Resim 19.	Deney gruplarının x10'luk büyütmede, Masson's trikrom boyamada tunica albuginea yapıları.....	68
Resim 20.	Deney gruplarının x10'luk büyütmede, Masson's trikrom boyamada arter yapıları.....	70
Resim 21.	Deney gruplarının x10'luk büyütmede, Masson's trikrom boyamada tubul çevreleri.....	72
Resim 22.	A) Faz kontrast mikroskobu B) Thoma lamında spermium sayımı genel görünümü.....	74
Resim 23.	Işık mikroskobunda, x10'luk büyütmede Eosin-nigrosin boyama ile ölü spermium (sarı ok ile gösterilen) ve canlı spermium (siyah ok ile gösterilen) görünümü.....	75
Resim 24.	Faz-kontrast mikroskobunda, x10'luk büyütmede Hancock solüsyonu ile muamele edilen spermiumlerin genel görünümü.....	77
Resim 25.	Faz-kontrast mikroskobunda, x10'luk büyütmede kopuk başlı spermiumların görünümü.....	82

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Silybum marianum</i> 'un fizikokimyasal özellikleri	34
Tablo 2.	Testis doku takibi protokolü	43
Tablo 3.	Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	44
Tablo 4.	Masson's trikrom boyama protokolü	45
Tablo 5.	Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü	45
Tablo 6.	Deney hayvanlarına ait sağ testis ağırlıkları.....	51
Tablo 7.	Deney hayvanlarına ait sol testis ağırlıkları.....	52
Tablo 8.	Deney gruplarında yer alan hayvanların başlangıç ağırlıkları	53
Tablo 9.	Deney gruplarında yer alan hayvanların son ağırlıkları	53
Tablo 10.	Testis ağırlık indeksi (TAİ)	54
Tablo 11.	Sağ testis longitudinal çap (mm) ölçümleri.....	55
Tablo 12.	Sağ testis transvers çap (mm) ölçümleri	55
Tablo 13.	Sol testis longitudinal çap (mm) ölçümleri	56
Tablo 14.	Sol testis transvers çap (mm) ölçümleri	57
Tablo 15.	Tubuli seminiferi contorti çap ölçümleri	59
Tablo 16.	Germinal epitel kalınlık ölçümleri	61
Tablo 17.	Bazal tabaka kalınlığı ölçümleri	63
Tablo 18.	Bazal lamina kalınlığı ölçümleri	65
Tablo 19.	Tunica albuginea kalınlığı ölçümleri.....	67
Tablo 20.	Arter çapı ölçümleri.....	69
Tablo 21.	Peritubuler atrofi oranı	71
Tablo 22.	Spermium sayım sonuçları	72
Tablo 23.	Canlı spermium oranı	74

Tablo 24.	Anormal spermium oranı.....	76
Tablo 25.	Normal spermium sayısı	78
Tablo 26.	Küçük başlı spermium sayısı	79
Tablo 27.	Rudimenter başlı spermium sayısı	80
Tablo 28.	Kopuk başlı spermium sayısı	81
Tablo 29.	TAS (total antioksidan seviyesi)	82
Tablo 30.	TOS (total oksidan seviyesi)	83
Tablo 31.	İnhibin A Düzeyleri	84
Tablo 32.	İnhibin B Düzeyleri	85

ÖZET

SIÇANLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARI ÜZERİNE SİLYMARİN'İN OLASI ETKİLERİNİN MORFOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Şahmelikoğlu A.G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi (Tıp) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Bu çalışmadaki amaç sisplatin ile oluşturulmuş testis hasarında silymarin'in, olası koruyucu etkilerinin morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda ortalama 300/350 gr ağırlığındaki erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmış ve her grupta 10'ar sıçan yer almıştır.

CON (10): Kontrol grubu; bu grupta bulunan sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadı.

SM200 (10): Güvenlik grubu (Yüksek doz); bu grupta bulunan sıçanlara 0.günden itibaren 3 gün boyunca 200mg/kg/gün silymarin, oral gavaj yolu ile verildi. Silymarin, 12 saatte bir olmak üzere günde 2 doz halinde 100mg/kg/gün şeklinde verilmiştir.

CIS (10): Sisplatin grubu; bu gruptaki sıçanlara 7mg/kg/gün tek doz sisplatin, intraperitoneal olarak verildi ve bu sıçanlar sisplatin uygulamasından 72 saat sonra anestezi altında sakrifiye edildi.

CIS+SM50 (10): Düşük doz tedavi grubu; bu grupta yer alan sıçanlara 0.günde 25mg/kg/gün silymarin oral gavaj yoluyla verildi ve 2 saat sonra 7mg/kg/gün sisplatin, intraperitoneal olarak uygulandı. İlk doz silymarin verilmesinden 12 saat sonra tekrar 25mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verildi ve toplam 3 gün boyunca günde 2 kere olmak üzere (12 saatte bir) toplam 50mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verilmeye devam edildi. Tedavinin 3.gününde sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi.

CIS+SM200 (10): Yüksek doz tedavi grubu; bu grupta yer alan sıçanlara 0.günde 100mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verildi ve 2 saat sonra 7mg/kg/gün sisplatin, intraperitoneal olarak uygulandı. İlk doz silymarin verilmesinden 12 saat sonra tekrar 100 mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verildi ve toplam 3 gün boyunca günde 2 kere olmak

üzere (12 saatte bir) toplam 200 mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verilmeye devam edilerek tedavinin 3.gününde sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi.

Sıçanlar, ketamin+ksilazin anestezi altında sakrifiye edildikten sonra testis dokuları çıkartıldı ve kanları alındı. Sağ testis dokuları histolojik incelemeler için alındı.

Bulgular: Yapılan analiz sonuçlarına göre gruplar arasında hayvan ağırlığı, testis ağırlığı, testis longitudinal ve transvers çap ölçümleri ve inhibin B seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Tubulus seminiferi contorti çapı, germinal epitel kalınlığı, bazal tabaka kalınlığı, bazal lamina kalınlığı, tunica albuginea kalınlığı, arter çapı, peritubuler atrofi oranı değerleri, sperm sayısı, sperm ölü-canlı oranı ve sperm morfolojisi, TAS, TOS, İnhibin A seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık görüldü.

Sonuç: Silymarin uygulamasının sisplatin ile testis hasarı oluşturulan sıçanlarda olumlu etkisi görüldü.

Anahtar kelimeler: Sisplatin, Silymarin, Sıçan, Testis, Morfoloji.

ABSTRACT

A MORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF THE POSSIBLE EFFECTS OF SILYMARIN ON CISPLATIN-INDUCED TESTES DAMAGE IN RATS

Sahmelikoglu A.G. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Anatomy (Medicine) Program Doctoral Thesis, Aydın, 2023.

Objective: The aim of this study is to examine the possible protective effects of silymarin in cisplatin-induced testicular damage by morphological and biochemical methods.

Material and Methods: Male Wistar albino rats weighing an average of 300/350 g were used in our study. There were 10 rats in each group.

CON (10): Control group; The rats in this group were not treated.

SM200 (10): Safety group (High dose); The rats in this group were given 200mg/kg/day silymarin by oral gavage for 3 days starting from day 0. Silymarin was given as 100mg/kg/day in 2 doses every 12 hours.

CIS (10): Cisplatin group; Rats in this group were given a single dose of 7mg/kg/day cisplatin intraperitoneally and these rats were sacrificed under anesthesia 72 hours after cisplatin administration.

CIS+SM50 (10): Low dose treatment group; The rats in this group were given 25mg/kg/day silymarin by oral gavage on day 0 and 7mg/kg/day cisplatin was administered intraperitoneally 2 hours later. 12 hours after the first dose of silymarin was given, 25mg/kg/day silymarin was given again by oral gavage, and a total of 50mg/kg/day silymarin was given by oral gavage, twice a day for a total of 3 days (every 12 hours). On the 3rd day of the treatment, the rats were sacrificed under anesthesia.

CIS+SM200 (10): High-dose treatment group; The rats in this group were given 100mg/kg/day silymarin by oral gavage on day 0 and 7mg/kg/day cisplatin was administered intraperitoneally 2 hours later. 12 hours after the first dose of silymarin was given, 100 mg/kg/day silymarin was given again by oral gavage, and a total of 200 mg/kg/day silymarin was given by oral gavage,

twice a day for a total of 3 days (every 12 hours). On the 3rd day of the treatment, the rats were sacrificed under anesthesia.

After the rats were sacrificed under ketamine+xylazine anesthesia, testicular tissues were removed and their blood was taken. Right testis tissues were taken for histological examinations.

Results: According to the results of the analysis, there was no significant difference between the groups in terms of animal weight, testicular weight, testicular longitudinal and transverse diameter measurements, and inhibin B levels. There was a significant difference between the groups in terms of tubulus seminiferi contorti diameter and germinal epithelial thickness, basal layer thickness, basal lamina thickness, tunica albuginea thickness, arterial diameter, peritubular atrophy rate values, sperm count, sperm dead-live ratio and sperm morphology, TAS, TOS, Inhibin A levels.

Conclusion: Silymarin administration had a positive effect in rats with testicular damage with cisplatin.

Key words: Cisplatin, Silymarin, Rat, Testis, Morphology.

1. GİRİŞ

Kanser, sağlıklı hücrelerin kontrol dışı çoğalması, yayılması ve metastaz yapması ile başlayan ve kalp hastalıklarından sonra en çok ölüme yol açan nedenler arasında ikinci sırada yer alan bir hastalık tablosudur (Katzung ve diğerleri 2004). Kanser, gelişim evresine veya tipine göre radyoterapi, kemoterapi veya cerrahi çıkarım yöntemlerinin kombine uygulanması yada tek başına uygulamaları ile tedavi edilebilmektedir (Chu ve diğerleri 2004).

İnsanlık tarihi boyunca kanser, büyük kitleleri öldüren bir hastalık olmuştur ve endüstriyel ve teknolojik açıdan geliştikçe görülme sıklığı artmıştır. İçinde bulunduğumuz dönemde, gelişmiş ülkelerde birkaç kanser türünün riski önemli ölçüde azalmış olsa da, hastalığın en önemli türlerinin görülme sıklığı artmıştır. Akciğer, prostat, meme, rektum ve kolon kanserleri, sigara kullanımı, sağlıksız beslenme alışkanlıkları ile çevresinde veya işyerinde tehlikeli kimyasallara maruz kalma gibi risk faktörlerinin artık daha yaygın olduğu ülkelerde daha sık görülmeye başlanmıştır (Trichopoulos ve diğerleri 1996).

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum-II, CIS), testis, mesane, yumurtalık, baş, boyun, serviks, akciğer ve endometrium kanserleri dahil olmak üzere çoğu solid tümörlerin tedavisinde etkili bir antineoplastik bir ajandır (Chirino ve diğerleri 2004). Buna rağmen, iç kulak, periferik sinirler, böbrekler ve testisler üzerinde bulunan olumsuz etkileri sebebiyle tam klinik kullanımı sınırlıdır. Sisplatinin böbrek fonksiyonunu bozması, temel yan etkilerden biridir ve bu durum en önemli doz sınırlayıcı faktör olarak kabul edilmektedir (Atessahin ve diğerleri 2005).

Sisplatinin neden olduğu testis toksisitesi birçok deneysel çalışmada ortaya konmuştur (Amin ve diğerleri 2012; Amin ve diğerleri 2008; Awadalla ve Nutrition, 2012; Azu ve diğerleri 2010). Sisplatin kaynaklı testis hasarının altında yatan mekanizma, reaktif oksidatif stres (ROS) ve oksidatif stres oluşumundan meydana gelen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal doku bozukluklarını içermektedir (Ateşşahin, Karahan, ve diğerleri 2006b; Azu ve diğerleri 2010; Türk, Ateşşahin, Sönmez, Çeribaşı, Yüce, ve diğerleri 2008). Bu nedenle sisplatin kaynaklı testis hasarına karşı çeşitli antioksidanların koruyucu etkisi test edilmiştir. Arjunolik asit, melatonin, Kigelia Africana meyve özü, likopenvitamin E, Ginkgo biloba ve Nigella sativa yağı çeşitli çalışmalarda sisplatin kaynaklı hasarı önlemek için antioksidan olarak kullanılmıştır (Amin ve diğerleri 2012; Ateşşahin, Karahan, ve diğerleri 2006b; Azu ve diğerleri 2010; Choudhury ve Jagdale, 2002; Sherif, Abdel-Aziz, Sarhan, ve diğerleri 2014; Türk, Ateşşahin, Sönmez, Çeribaşı, Yüce, ve diğerleri 2008).

Silymarin adı verilen flavonoid antioksidan, *Silybum marianum* (Meryem ana dikeni, veya Milk thistle) denilen bir bitkiden elde edilir (AbouZid ve diğeri 2017; Křen ve Walterová, 2005). Geçmişte bu bitkinin çiçekleri, yaprakları ve sapı tıbbi amaçlı kullanılmış olmakla birlikte, modern tıpta tohumları kullanılmaktadır. Bu bitkinin tohumlarında; flavonolignan türevi bileşikler, nişasta, sabit yağ (%25-30), tanen, ve silymarinler (silidianin, silibin ve silikristin) bulunmaktadır (Yang ve diğeri 2003).

Silymarin ve silymarinin yapısal bileşenlerinden biri olan silibin'in, hepatoprotektif özellikleri yapılan çalışmalarla belgelenmiştir. Buna rağmen hala tam olarak etki mekanizmaları anlaşılamamıştır. Literatürdeki veriler silymarin ve silibin'in dokuları dört farklı biçimde etkilediğini göstermektedir:

- glutasyonun hücre içi içeriğinin antioksidanları, temizleyicileri ve düzenleyicileri olarak;
- hücre zarı geçirgenlik düzenleyicileri ve stabilizatörleri şeklinde hepatotoksik maddelerin hepatositlere girmesini önleyerek;
- ribozomal RNA sentezinin destekleyicileri şeklinde karaciğer rejenerasyonunu uyararak;
- stellat hepatositlerin siroza yol açan kollajen liflerinin birikmesinden sorumlu olan miyofibroblastlara dönüşümünün inhibitörleri olarak işlev görür. Serbest radikal süpürücü, anahtar mekanizma olarak çalışarak karaciğeri korumayı sağlamaktadır. Bu antioksidanın aynı zamanda antikanserojenik ve anti-inflamatuar ve özellikleri de gösterilmiştir (Fraschini ve diğeri 2002).

Yapılan farmakokinetik çalışmalarda, silymarin'in oral yol aracılığı ile emildiği ve sindirim sistemine (pankreas, mide, karaciğer, bağırsak) dağıldığı gösterilmiştir. Temel olarak safradan metabolitler olarak atılır ve enterohepatik dolaşıma girer. Toksikitesi oldukça düşüktür, öldürücü doz sıçanlarda 10 g/kg ve köpeklerde tolere edilebilen maksimum doz 300 g/kg'dır. Ayrıca silymarinin embriyotoksik potansiyeli bulunmamaktadır (Fraschini ve diğeri 2002; Platt ve Schnorr, 1971).

Yapmış olduğumuz bu çalışmadaki amaç sisplatin ile oluşturulmuş testis hasarında silymarin etken maddesinin olası koruyucu etkilerini morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırmaktır. Bu amaçla eşit sürelerde yüksek ve düşük doz olarak uygulanan silymarin'in antioksidan ve koruyucu etkilerini araştırdık.

1. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi iç genital organlar (*organa genitalia masculina interna*) ve dış genital organlar (*organa genitalis masculina externa*) olmak üzere iki grupta incelenir. İç genital organlar testis (*orchis*), epididymis, ductus deferens, vesicula seminalis, prostata (*glandula prostatica*) ve *glandula bulbourethralis*'ten meydana gelir. Dış genital organlar ise penis, urethra *masculina scrotum*'dan oluşur.

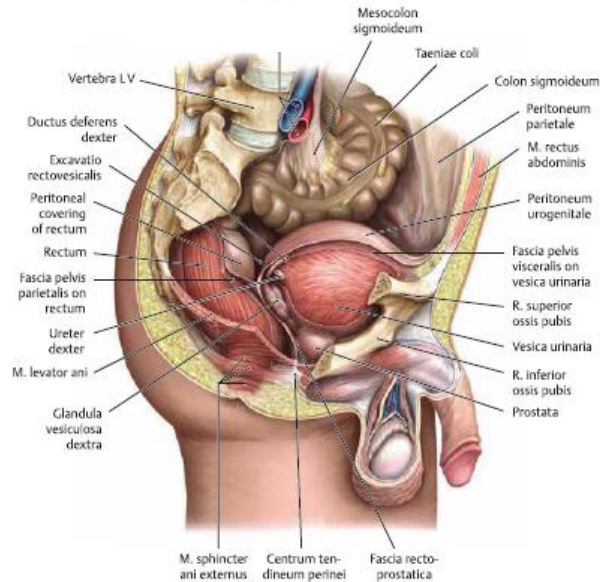
İç genital organlardan biri olan testisler funiculus spermaticus'a asılı olarak bulunur ve sağlı sollu bir çift olarak scrotum'un içerisinde yer alırlar (Arıncı ve Elhan, 2014). Testisler iri bir badem büyüklüğündedir ve insanda ortalama olarak 4-5 cm uzunluğa, 2,5 cm genişliğe, 3 cm kalınlığa ve 10-14 gr ağırlığa sahiptir. Testisler peritoneumun arkasında, karın arka duvarında gelişir ve gubernaculum denen şerit şeklindeki oluşum, testisin alt kutbunu *canalis inguinalis*'ten geçerek scrotum derisine bağlar (Arıncı ve Elhan, 2014). Testislerde hem spermium üretilir hem de testosteron gibi erkek üreme fizyolojisini yöneten hormonları salgılayan endokrin hücreler barındırılır. Testosteron hormonu, embriyonik gelişim ve fetal gelişim sırasında cinsel farklılaşma, spermatogenez ve hipofizden gonadotropin salgılanmasının kontrolü için önemlidir. Genital kanallar ve burada yer alan aksesuar bezler, spermiumun aktivitesini sağlamak için gereken salgıları üretir, spermatozoa'yı ve salgıları (semen) penil uretradan ilerletebilmek için büzülürler (Mescher, 2013).

Urethra *masculina* ve penis, semen ile idrarın dış ortama iletilmesini sağlar. Scrotum denen yapı ise epididymis, testis ve funiculus spermaticus'un bir kısmını sarar. *Glandula vesiculosa*, prostata ve *glandula bulbourethralis*'in salgıları yardımıyla semenin penis'e geçişi kolaylaştırılır. Ductus deferens ile epididymis ise semenin ductus ejaculatorius'a geçişi için bir kanal sistemi meydana getirirler (Arıncı ve Elhan, 2014; Gövsa, 2003).

Testis, tunica albuginea denen mavi-beyaz renkte sıkı bir fibröz tabaka ile sarılmıştır. Bu fibröz tabaka arka kenarda, testis'in iç kısmına doğru vertikal bölümler şeklinde uzantılar gönderir. Bu yapı, testis'in sinir, damar ve spermium kanallarının geçtiği kısımdır ve buraya mediastinum testis denir. Bu yapının ön ve yan kısımlarından çıkan septula testis adındaki bölmeler, dışarıdan testisi saran tunica albuginea denen yapıya tutunurlar. Septula testisler,

testis'i piramit biçimindeki boşluklara ayırır. Bu boşlukların içerisinde tubuli seminiferi recti ve tubuli seminiferi contorti denen tüp biçimindeki yapılar yer alır (Arıncı ve Elhan, 2014).

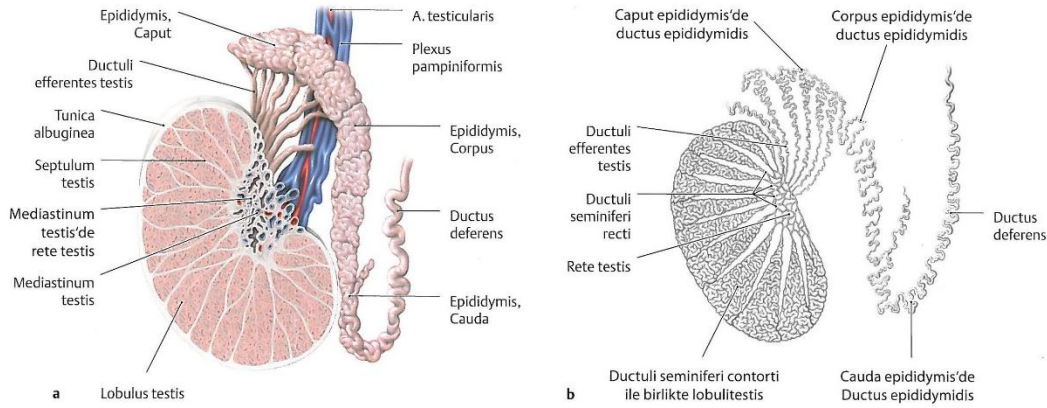
Gevşek bağ dokusunda kasılabilen peritübüler miyoid hücreler, sinirler, makrofajlar, androjen üreten leydig hücreleri, kan damarları ve lenf damarları bulunur. Her bir testis'te yaklaşık 400-600 adet tubuli seminiferi contorti bulunmakta ve bu tüplerin ortalama çapları 0,12-0,3 mm, toplam uzunlukları 70-80 cm arasında değişmektedir. Tubuli seminiferi contorti'ler, mediastinum testis'e doğru yöneldikçe düzleşir, sayıları azalır ve çapları genişler. Tubuli seminiferi recti denilen bu tüpler, mediastinum testis'in fibröz dokusu içinde testis'in arka kısmına uzanarak rete testis (Haller ağı) denilen ağı oluştururlar. Rete testis, mediastinum testis'in üst bölümünde yer alan ve sayıları 12-15 arasında değişen kanallara dönüşür. Bu kanallar ductuli efferentes testis'in başlangıcı olup, testis arka üst kısmında tunica albuinea'yı delerek dışarı çıkarlar (Arıncı ve Elhan, 2014).



Şekil 1. İnsanda erkek genital sistem anatomik yapısı (Bookstein, 2017).

Testiste, septula testis'ler ve tunica albuginea arasındaki boşluklarda uzun tüplerin meydana getirdiği, sayıları 250-300 arasında değişen ve lobuli testis adı verilen bez kümeleri yer alır. Lobuli testisler, buldukları yere göre şekil almakla birlikte merkezi bölümlerde daha geniş ve uzundurlar (Arifoğlu, 2021; Gökmen, 2003). Bir lobuli testis, tubuli seminiferi contorti adı verilen ve sayıları 1-4 arasında değişen kıvrıntılı bezlerden meydana gelir. Bu tüpler kör bir uç ile başlar ve tüplerin arasında gevşek bağ dokusu yer alır. Bu gevşek bağ dokusu içerisinde sinirler, androjen hormon üreten Leydig hücreleri, kasılabilen miyoid hücreler, kan damarları, makrofajlar, ve lenf damarları bulunur (Stevens, 2006). Mediastinum testis'e gidildikçe tubuli

seminiferi contorti'ler düzleşir, çapları genişler ve sayıları azalır. Mediastinum testis'in fibröz yapılı dokusu içerisinde tubuli seminiferi recti denen tüpler bulunur ve bu tüpler arka kısma doğru uzanarak rete testis (Haller ağı) denen ağı meydana getirir. Mediastinum testis'in üst bölümünde yer alan rete testis, sayıları 12-15 arasında değişim gösteren kanallara dönüşür. Bahsi geçen kanallar, ductuli efferentes'in başlangıcıdır ve arka üst bölümde tunica albuginea tabakasını delip dışarı çıkarlar (Arıncı ve Elhan, 2014; Gövsa, 2003).



Şekil 2. Testis ve epididymis'in yapısı (Schünke ve diğerleri 2007).

2.2. Testis Histolojisi

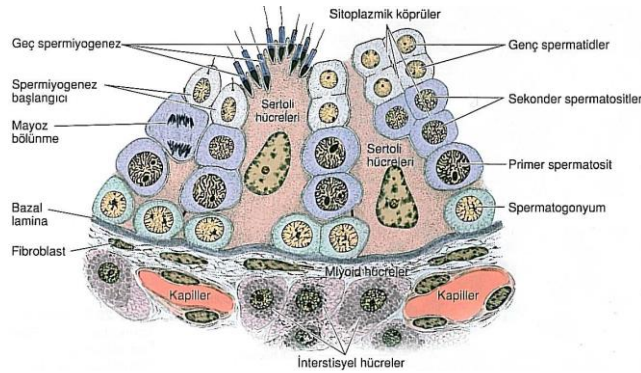
Testislerin, tunica albuginea denen alışılmadık derecede kalın bir bağ dokusu kapsülü bulunmaktadır. Bu yoğun ve kalın bağ dokusu kapsülü, yani tunica albuginea her bir testisi kaplar. Bu yapının iç kısmında yer alan yapı tunica vasculosa, kan damarlarını içeren ve gevşek yapıda bir bağ dokusudur. Her bir testis, kapsülde yer alan ve çıkıntı yapan tamamlanmamış bir bağ dokusu septumu ile yaklaşık olarak 250 lobule bölünmüştür. Testis arka yüzü boyunca burada yer alan tunica albuginea tabakası kalınlaşır ve içe doğru mediastinum testis olarak çıkıntı yapar. Mediastinum testis'ten lenf ve kan damarları ile genital salgı kanalları girer veya çıkar (Ross ve Pawlina, 2006).

Testiste yer alan her bir lobul, çok kıvrımlı tubuli seminiferi contorti'den meydana gelir. Testisin her bir lobülü içerisinde spermiumların üretildiği 1-4 tubuli seminiferi contorti'den ve testesteron hormonunun üretildiği Leydig (insterstisyel) hücrelerinin yer aldığı bağ dokusu stromasından meydana gelir. Lobulun içerisinde yer alan her bir tubul oldukça uzun olduğundan dolayı kıvrımlı şekilde bulunur, bu şekilde lobul, kendi üzerinde katlanır. Bu kıvrımlı yapının uçları, düz ve kısa bir yol oluşturdukları testisin mediastinum'unun yakınında

yer alır ve tubuli seminiferi contorti'nin bir parçası olan tubuli seminiferi recti (düz tubul) olarak isimlendirilir. Bu yapı mediastinum içerisinde anastomoz yapan bir kanal sistemidir ve rete testis ile devam eder (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006).

Tubuli seminiferi contorti'ler, tunica propria ile çevrilmiş bir epitel tabakadan meydana gelir. Her bir tubuli seminiferi contorti yaklaşık olarak ortalama 50 cm uzunluğa (30-80 cm arasında) ve yaklaşık 150-250 µm çapa sahiptir. Tubulus seminiferi contorti epitel tabakası iki ana hücre popülasyonundan meydana gelen düzensiz tabakalı bir epiteldir;

- Sertoli hücreleri: destekleyici hücreler olarak bilinirler. Ergenlik sonrası bu hücreler çoğalmaz. Bu hücreler, komşu hücreleri çevreleyen ve bunların arasında yer alan boşlukları kaplayan geniş lateral ve apikal yapılara sahip olan sütun şeklindeki hücrelerdir. Buna ek olarak sertoli hücrelerinin bu detaylı dizilimi, rutin olarak yapılan hematoksilin ve eozin (H&E) boyalı preparatlarda net olarak görülemez. Sertoli hücreleri, tubuli seminiferi contorti epitelinin bütün kalınlığı boyunca sıralanırken tubulilere bütünlük sağlar (Ludewig ve diğerleri 1995; Ross ve Pawlina, 2006).
- Spermatogenez hücreleri; düzenli olarak çoğalır ve olgun spermiuma dönüşürler. Spermatogenez hücreleri, testisin erken gelişimi döneminde gonadal çıkıntıları bir araya getiren yolk kesesinden orjin alan ilkel germ hücrelerinden meydana gelir. Bu hücreler, komşu sertoli hücreleri aralarında zayıf tanımlanmış ilerleyici gelişim katmanlarında organize edilir. Spermatogonia denen olgunlaşmamış spermatogenez hücreleri, tubuli seminiferi contorti'nin lümenini sınırlayan Sertoli hücrelerinin apikal kısımlarına bağlıdır (Junqueira ve diğerleri 1993; Öber ve İzzetoğlu, 2006; Ross ve Pawlina, 2006).

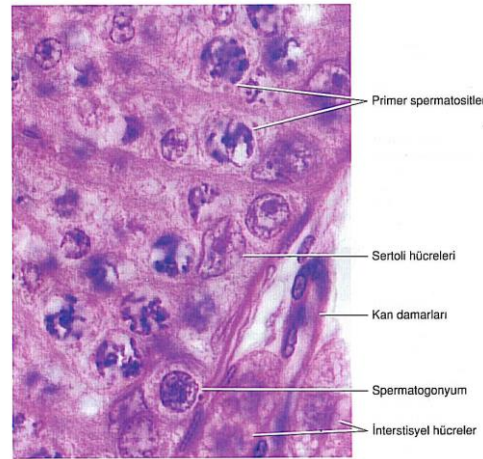


Şekil 3. Tubuli seminiferi contorti ve onu çevreleyen yapı (Junqueira ve diğerleri 2009).

Lamina propria, peritübüler doku olarak da isimlendirilir ve tipik fibroblastlardan mahrum çok tabakalı bir bağ dokusudur. İnsanlarda tubuli seminiferi contorti'nin bazal laminası dış kısmında 3 ya da 5 kat miyoid hücre (peritübüler kontraktıl hücreler) ve kollagen liflerinden oluşur. Ultra yapısal seviyede miyoid hücreler, bazal lamina, birçok aktin filamentleri

ve düz kas hücreleriyle ilgili özellikler barındırırlar. Ayrıca önemli ölçüde endoplazmik retikulum (rER) sergilerler. Bu durum, tipik fibroblastların bulunmaması durumunda kollagen sentezindeki görevlerini gösterir (Gökmen, 2003; Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006). Miyoid hücrelerin belli bir ritimde kasılmaları, semenin ve içerisinde yer alan spermatozoların tubuli seminiferi contorti yoluyla, burada bulunan kanal sistemine taşınmasına yardım eden peristaltik dalgalar meydana getirir. Miyoid tabakanın dışında, geniş lenfatik yapılar ve kan damarları ile Leydig hücreleri yer alır. Yaşlanmanın olağan akışı sonucu tunica propria tabakasının kalınlığı artar. Bu kalınlaşma ile birlikte spermium üretim hızı azalır ev tubuli seminiferi contorti'lerin boyutunda genel olarak bir azalma meydana gelir. Tunica propria'nın hayatın ilk dönemlerinde fazlaca kalınlaşması infertilite ile alakalıdır (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006). Örneğin inmemiş testis durumunda spermatojenik elementlerde progresif bir azalma ve buna bağlı olarak zamanla artan lamina propria kalınlığı görülmektedir. Bu durumda bazı ürologlar spermatojenik kapasiteyi koruyabilmek için hasta yaşamının dördüncü yılında ya da daha önce orşiopeksi yapmayı tercih eder (Levin, 1979).

İnterstisyel alan, interstisyum denen gevşek yapılu bağ dokusu, fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar, Leydig hücreleri, kan damarları, lenf damarları ve sinirleri ihtiva eden kısımdır (Junqueira ve diğerleri 1993).



Şekil 4. Tubuli seminiferi contorti epitel hücreleri ve interstisyel hücreler (Junqueira ve diğerleri 2009).

Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), genel olarak lipid damlacıkları bulunduran büyük, eozinofilik, poligonal hücrelerdir. Bu hücrelerde sıklıkla lipofuscin pigmenti yer alır ve bunun yanı sıra belirgin çubuk şeklinde sitoplazmik kristaller yani Reinke kristalleri bulunur. Rutin histolojik çalışmalarda yapılan preparatlarda bu kristaller epey kırılığandır ve yaklaşık olarak boyutları $3 \times 20 \mu\text{m}$ 'dir. Tam olarak görevi ve doğası bilinmemekle birlikte, büyük

olasılıkla hücrenin bir protein ürününün belirgin özelliklerini yansıtmaktadırlar. Leydig hücreleri de başka steroid salgılayan hücreler gibi, ayrıntılı bir endoplazmik retikulum (sER) ve dolayısıyla eozinofiller içerir (Öber ve İzzetoğlu, 2006). Testosteron'un kolesterolden sentezlenebilmesi için gerekli olan enzimler sER ile bağlantılıdır. Steroid salgısı yapan hücrelerin bir diğer karakteristik özelliği de tubulovesicular cristae'lı mitokondriler de ayrıca Leydig hücrelerinde yer alır. Leydig hücreleri, erken fetal dönemde farklılaşır ve testosteron salgılamaya başlar. Üreme, cinsel olgunlaşma ve embriyolojik gelişim esnasında testosteron salgılanması gerekmektedir (Junqueira ve diğerleri 1993);

- Embriyoda, gonadların normal olarak gelişebilmesi için erkek fetüste testosteron ve öteki androjenlerin salgılanması gerekmektedir. Leydig hücreleri, testosterona ek olarak gelişim esnasında testislerin inişini uyaran insülin benzeri protein (INSL3) salgılar.
- Testosteron salgısı, ergenlikte yardımcı cinsiyet bezlerin salgılarından, spermium üretiminin başlangıcından ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişiminden sorumludur. Bunun yanı sıra tubuli seminiferi contorti'lerde INSL3'ün salgılanması mayotik bölünmeleri de tetikler (Ross ve Pawlina, 2006).

Testosteron salgılanması yetişkinlerde ikincil cinsiyet özelliklerinin ve spermatogenezin, aksesuar eşey bezlerinin ve genital salgı kanallarının korunması için önemlidir. Erişkin testislerinde bulunan Leydig hücreleri, dolaşım sisteminde yer alan INSL3'ün temel kaynağıdır. Leydig hücresi steriode genetik kapasite indeksini meydana getirebilmek için klinik testler sırasında INSL3 ölçümü kullanılmaktadır. Leydig hücreleri INSL3'ün salgılanmasından başka ayrıca oksitosin üretir ve salgırlar. Testüküler oksitosin hormonu, tubuli seminiferi contorti'lerin etrafını saran miyoid hücrelerin kasılmalarını uyarır ve spermiumların efferent kanallara doğru hareket etmelerini sağlar (Bayram ve diğerleri 2020; Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006).

Erkek fetüsün erken farklılaşması sırasında Leydig hücreleri aktiftir, daha sonra fetal dönemin yaklaşık olarak 5. ayında başlayan bir hareketsizlik devresinden geçer. İnaktif Leydig hücrelerinin fibroblastlardan ayırt edilebilmesi zordur. Leydig hücreleri ergenlik döneminde gonadotropik uyarıların etkisinde kaldıkları için tekrar androjen salgı yapan hücreler haline gelirler ve hayat boyu aktif halde bulunurlar (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006).

2.2.1. Spermatogenez

Spermatogonia'nın spermiuma dönüştüğü sürece spermatogenez denir. Spermatogenez, spermiumun üretildiği süreçtir ve karmaşık, eşsiz bir dizi olay sonucu gerçekleşir. Ergenlik

dönerinden kısa bir süre önce başlar ve artan hipofiz gonadotropin seviyelerinin etkisinde hayat boyu sürer. Spermatogenez 3 aşamada incelenir (Junqueira ve diğerleri 1993);

- Spermatogonial faz; spermatogonia'nın mitozla bölünerek kendisini değiştirdiği ve nihayetinde birincil spermatositleri meydana getiren kararlı bir spermatogonia topluluğu oluşturduğu fazdır.
- Spermatosit fazı (mayoz); spermatit denen haploid hücreleri üretebilmek için primer spermatositlerin hem DNA miktarını hem de kromozom sayısını azaltabilmek için mayoz bölünmeye çalıştığı fazdır.
- Spermatid fazı (spermiyogenez); spermatidlerin olgun spermium hücrelerine dönüştüğü fazdır (Ross ve Pawlina, 2006).

Spermatogenez sonucu spermatidler en son olgunlaşmış hallerine gelirler ve tubuli seminiferi contorti'lerin lümen kısmına doğru spermiasyon denen süreçle destekleyici Sertoli hücreleri'nden salınırlar (Junqueira ve diğerleri 1993; Kızılay ve Altay, 2019).

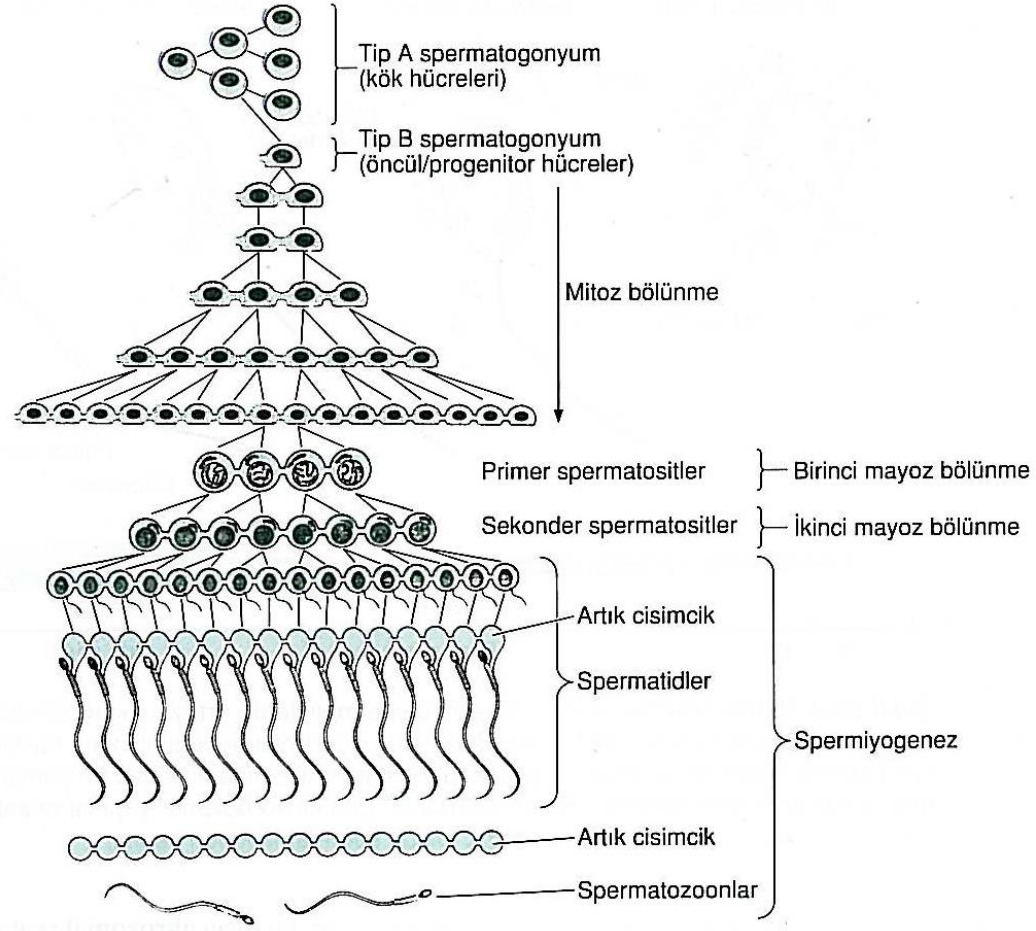
2.2.1.1. Spermatogoniyal Evre

Bu evrede kök hücreler kararlı bir spermatogonia topluluğu sağlamak ve kendilerini değiştirebilmek için bölünürler. Rutin histolojik preparatlarda çekirdek görünümüne göre 3 tip spermatogonium bulunmaktadır (Junqueira ve diğerleri 1993);

1. Tip A koyu (Ad) spermatogonia; ince granüler ve yoğun bazofilik kromatinli oval çekirdekler içermektedir. Bunların tubuli seminiferi contorti epitellerine ait olan kök hücreleri olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler, sistemli aralıklarla bölünerek veya yedek kök hücre olarak kalarak bir çift Ap ya da Ad tipi spermatogonyum oluştururlar.
2. Tip A soluk (Ap) spermatogonia; çekirdekleri ince granüler kromatinli ve hafif boyanmış olarak görülür. Ap spermatogonia, spermium üretiminin meydana geldiği farklılaşma sürecinde önemli rol oynar. Bu hücreler arka arkaya mitoz bölünme geçirir ve sayılarını artırır. Bu hücreler aynı zamana yenileyici kök hücre olarak da isimlendirilir.
3. Tip B spermatogonia; çoğunlukla hücre çeperi boyunca ve merkezi bir nukleolus etrafında büyük kümeler şeklinde yoğunlaşan kromatinli küre şeklinde çekirdekleri bulunur (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006).

Ad spermatogonium'un 2 tip Ap spermatogonium'a bölünmesinin bir diğer özelliği de yavru hücrelerin ince bir sitoplazmik köprü ile birlikte bağlı olarak kalmasıdır. Bu aynı oluşum

alışlageldik Ap spermatogonium çiftinin devam eden her bir mitoz ve mayoz bölünmesi yolu ile oluşur. Bu şekilde bir Ap spermatogonia çiftinin soyunun tamamı ardışık olarak birbirlerine bağlıdır. Bu bağlantılar spermatidlerin olgunlaşmalarının son aşamalarına kadar bozulmaz ve orijinal bir Ap hücre çiftinden meydana gelen her bir klonun senkronize gelişimi için önemli ve gereklidir. Birkaç kez bölündükten sonra A tipi spermatogonia, B tipi spermatogonia'ya farklılaşır. Spermatogonial fazdaki son olayı B tipi spermatogonia'nın görünümü temsil eder (Junqueira ve diğerleri 1993; Maximow ve Bloom, 1952; Ross ve Pawlina, 2006).



Şekil 5. Germ hücrelerinin klonal özelliği (Hill, 1986; Junqueira ve diğerleri 2009).

2.2.1.2. Spermatozoid Fazı (Mayoz)

Bu fazda, birincil spermatozoidler hem DNA hem de kromozom miktarlarını azaltmak amacıyla mayoz bölünme geçirirler. B tipi spermatogonilerin mitoz bölünme gerçekleştirmeleri sonucu birincil spermatozoidler üretilir. Bu yapılar, oluştuktan kısa bir süre sonra DNA'larını kopyalarlar ve bu şekilde her birincil spermatozoid, normal sayıda ($2n$) kromozom içerir ve böylece DNA miktarlarını ($4d$) iki katına çıkarmış olurlar. Her bir kromozom, iki kardeş

kromotit'ten meydana gelir ve bundan ötürü DNA miktarı 4d kadardır (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006).

Mayoz I sonucunda kromozom sayısı ($2n$ 'den $1n$ 'ye) yarıya iner, ayrıca DNA miktarı haploid duruma ($4d$ 'den $2d$ 'ye) düşer. Bundan dolayı ikincil spermatozoid $2d$ DNA miktarı ve haploid kromozom sayısı ($1n$) ile belirtilir. DNA replikasyonu, mayoz II'den önce olmadığı için bu bölünme gerçekleştikten sonra her bir spermatid $1d$ kromatit içeren haploid ($1n$) kromozom barındırır (Ross ve Pawlina, 2006).

İlk mayoz bölünmenin profaz aşamasında kromatin, görünür kromozomlara yoğunlaşır ve yaklaşık olarak 22 gün kadar sürer. Profaz aşaması sonucunda her biri iki kromatid'e sahip yani iki kromatin ipliği barındıran c bir X ve bir Y ve 44 otozom kromozom belirtilebilir. Metafaz plağı üzerinde sıralandığı süreç içerisinde homolog kromozomlar eşlenir (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006).

Tetrad adı verilen ve dört kromatitten meydana gelen eşleştirilmiş homolog kromozomlar, çaprazlama denen süreç içerisinde genetik materyali değiştirir. Bu değişim esnasında ise dört kromatitten meydana gelen ve sinaptotermal kompleks denen üçlü yapı tekrar düzenlenir ve bu süreç sonucunda genetik çeşitlilik sağlanmış olur. Bu değişim sayesinde her bir spermatozoidten üretilmiş olan dört spermatid, diğer tüm spermatidlerden ve birbirlerinden farklı olur (Junqueira ve diğerleri 1993). Homolog kromozomlar, çaprazlama tamamlandıktan sonra ayrılırlar ve mayoz iğ iplikçığının zıt kutuplarına doğru hareket ederler. Böylelikle çaprazlama ile değiştirilen tetradlar ayrılarak yeniden ikili olurlar. Çapraz geçiş ile değiştirilmiş de olsa her bir orjinal kromozomun iki kromatidi birlikte kalır. Bu olay mitoz bölünme ile gerçekleşen olayın tam tersidir ve bunlardan biri "kalıp" yapıyı ve diğeri yeni sentezlenen DNA'yı temsil eden çift kromatidler ayrılır (Ross ve Pawlina, 2006).

Homolog bir kromozom çiftinin herhangi birinin, iğ iplikçığının herhangi bir kutbuna olan hareketi rastgele olmaktadır. Yani anne ve babadan türetilen kromozomlar, metafaz plakasında kendilerini sıralamazlar. Bu olay, meydana gelen yeni spermiumdaki genetik çeşitliliğin bir başka kaynağıdır (Ross ve Pawlina, 2006).

İlk mayoz bölünme sonrasında oluşan hücrelere ikincil spermatozoidler denmektedir. Bu hücreler, bir S fazından geçmeden yani yeni DNA sentezlenmeden çabucak ikinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu ikinci mayoz bölünme daha kısadır ve sadece birkaç saat sürer. Her bir ikincil spermatozoid, bir X ya da Y ve 22 otozom kromozom ile temsil edilen $1n$ sayıda (yani azaltılmış sayıda) kromozoma sahiptir. Burada yer alan her bir kromozom, iki kardeş kromatitten meydana gelir ve ikincil spermatozoid, diploid miktarda yani $2d$ miktarda DNA'ya sahiptir. İkinci mayoz bölünmenin metafaz aşaması sırasında kromozomlar, metafaz

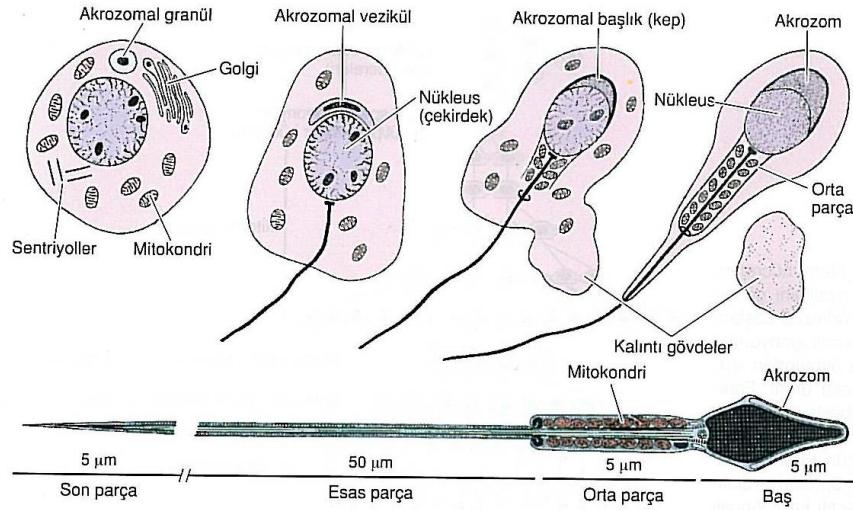
plakasında dizilir ve burada kardeş kromatitler birbirlerinden ayrılarak iğ iplikçığının zıt kutuplarına doğru harekete geçerler. İkinci mayoz bölünme bittiğinde ve çekirdek zarları yeniden oluştuğça, her bir ikincil spermatosit, 23 'er tek ipliğe sahip kromozom (1n) ve 1'er d miktarda DNA barındıran ikişer haploid spermatid meydana getirir (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006; Sadler, 2014).

2.2.1.3. Spermatid Fazı (Spermiyogenez)

Spermiyogenez aşaması, spermatidlerin spermatozoa'ya dönüşerek meydana getirdiği değişiklikler serisidir. Bu değişiklikler şu şekilde sıralanabilir (Ross ve Pawlina, 2006; Sadler, 2014);

1. Çekirdek yüzeyinin yarısını dolduran ve dölleme esnasında yumurta ve çevresinde yer alan katmanların penetrasyonuna yardım edecek enzimleri barındıran akrozom'un oluşması,
2. Çekirdek yoğunlaşması,
3. Kuyruk, baş ve orta parçanın oluşumu,
4. Sertoli hücrelerinin fagosite ettiği kalıntı cisimler yani sitoplazmanın çoğunun dökülmesi.

İnsanlarda, bir spermatogonium yaklaşık 74 gün içerisinde olgun bir spermatozoa'ya dönüşür ve bir günde yaklaşık olarak 300 milyon kadar spermium hücresi üretilir. Spermatozoa tamamen oluştuğu zaman tubuli seminiferi contorti'lerin lümenine girer. Tubuli seminiferi contorti'lerin duvarlarında yer alan kasılma elemanları tarafından buradan epididymis'e doğru itilirler. İlk başlarda sadece biraz hareketli olan spermatozoa, epididymis'de tam hareketliliğe sahip olur (Sadler, 2014).



Şekil 6. Spermiyogenez süresi boyunca spermatidlerde meydana gelen temel değişiklikler (Junqueira ve diğerleri 1993).

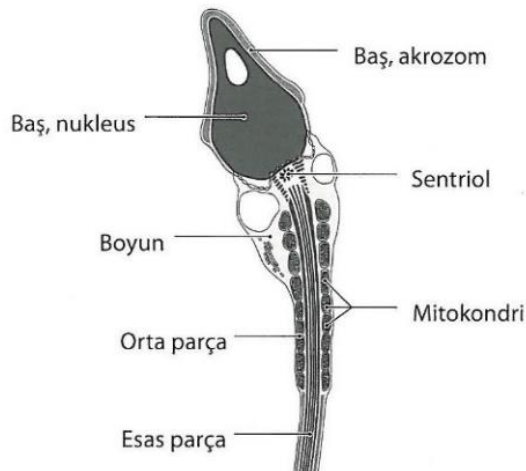
2.2.1.4. Olgun Spermiumun Yapısı

Spermiyogenez olayları sonucunda yapısal olarak benzersiz bir hücre meydana gelir. Olgun bir insan spermiumu, ortalama 60 µm uzunluğa sahiptir. Spermiumun baş kısmı sivri ve yassıdır, yaklaşık olarak 4,5 µm uzunlukta, 3 µm genişlikte ve 1 µm kalınlıktadır. Akrozomal başlık çekirdeğin ön üçte ikisini kaplar ve nöraminidaz, hiyalüronidaz, akrosin, asit fosfataz denilen tripsine benzer bir proteaz barındırır. Bu akrozom enzimleri, zona penetrasyonu için gereklidir. Spermium kuyruğu; orta parça, ana parça, boyun ve son parçadan meydana gelir (Ross ve Pawlina, 2006). Kısa boyun kısmında sentriyelleri ve kaba liflerin kökenlerini yani başlangıç kısımlarını barındırır. Orta parça yaklaşık olarak 7 µm uzunluğa sahiptir ve mitokondriler burada yer alır. Mitokondriler; kaba lifler ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal olarak yer alır. Bu mitokondriler kuyruk hareketi için enerji temin ederler ve bu şekilde spermium hareketliliğinden mesuldürler. Ana parça yaklaşık olarak 40 µm'lik bir uzunluğa sahiptir ve kaba fiberler ile aksonemal kompleks dışında yer alan lifli kılıfı barındırır. Son parça ise olgun spermiumdaki yaklaşık olarak son 5 µm'lik kısımdır ve yalnızca aksonemal kompleksi barındırır (Ross ve Pawlina, 2006; Sadler, 2014). Yeni salınmış olan spermium hücreleri, daha fazla olgunlaştıkları için ve hareketlilik kazandıklarından dolayı epididymis'de işlenirler. Yeni salınan spermiumlar hareketsizdirler ve sertoli hücrelerince salgılanan bir sıvıda tubuli seminiferi contortilerden taşınırlar. Sıvı ve spermium, lamina propria'ya ait peritubuler kontraktıl hücrelerinin peristaltik kasılmalarıyla tubuli seminiferi contorti'lerden akar. Bunlar

daha sonra epitel hücrelerinin sadece sertoli hücrelerinden meydana geldiği tubuli seminiferi recti'lere girerler (Sadler, 2014). Sıvı ve spermium, mediastinum testis'te basit kübik epitel hücreleri ile kaplı kanalların anastomoz sistemi olan rete testis bölümüne girer. Daha sonra rete testis'ten ductuli efferentes'in sırasıyla önce ekstratestiküler bölümüne oradan dışarıya akan kanal sisteminin ilk bölümüne ve daha sonra da epididymis kanalının proksimaline (ductus epididymis) doğru hareket ederler. Spermium hücreleri, epididymis'in çok kıvrımlı kanalının 4-5 m'si boyunca hareket eder, bu esnada hareketlilik kazanır ve türlü olgunlaşma değişikliklerine uğrar (Junqueira ve diğerleri 1993; Ross ve Pawlina, 2006; Sadler, 2014). Bu değişiklikler şunlardır;

- Histonların protaminler ile değiştirilmesine neden olan bir seri kromatin yeniden şekillenme olaylar dizisi sebebi ile nükleer DNA'nın daha çok yoğunlaşması meydana gelir. Spermium başı küçülür.
- Sitoplazma daha da azaltılır. Spermium hücreleri inceler.
- Plazma zarı proteinleri, lipitleri ve glikolizasyonda değişiklikler meydana gelir,
- Dekapasitasyon yani dış akrozomal membranda değişiklikler meydana gelir. Spermium hücrelerinin döllenme kabiliyetini engelleyebilmek için yüzey ile ilişkili dekapasitasyon faktörü ilave edilir (Ross ve Pawlina, 2006).

Hücrelerin epididymisten geçişi esnasında spermium hücrelerinin motilitelerinin başlaması büyük ihtimalle Ca^{2+} (kalsiyum iyonları), cAMP (siklik adenozin monofosfat), ve hücre içi pH'ın hücre seviyesindeki değişikliklerle alakalıdır. Bu etkenler, protein fosfotaz ve protein kinazların etkinliklerinden kaynaklanan protein fosforilasyonunda meydana gelen değişimler yolu ile flagellar aktiviteyi tanzim eder (Sadler, 2014).



Şekil 7. Olgun bir spermatozoon (Schünke ve diğerleri 2007).

2.2.1.5. Spermium Fizyolojisi

Tubuli seminiferi contorti'lerde meydana gelen spermiumlar epididymis ve bu tubullerde hareketsiz halde bulunurlar. Spermiumlar yaklaşık olarak 18-24 saat kadar epididymis'te bulunduktan sonra hareket kabiliyeti kazanır fakat baskılayıcı proteinler tarafından ejakülasyona kadar hareketleri engellenir (Hall ve Hall, 2020). Doğal olarak fertil ve hareketli olan spermiumlar, sıvı bir ortamda, dakikada ortalama 1-4 mm hızla flagellaların hareketleri sayesinde ilerleyebilirler. Spermium aktivitesi, ejakülat semenindeki gibi nötral ve hafif alkalik ortamda oldukça fazla bir artış gösterir (Barrett ve diğerleri 2010). Ancak ortam orta derecede asidik olduğu zaman hareketliliği büyük ölçüde baskılanır. Kuvvetli bir asidik ortam, spermiumların hızlıca ölümüne neden olabilir. Artan sıcaklıkla spermium aktivitesi bariz bir şekilde artar, bundan dolayı metabolizma hızı da artmış olur. Bu artış, spermium ömrünün belirgin biçimde kısalmasına sebep olur (Widmaier ve diğerleri 2006). Testislerin genital kanallarında spermiumlar baskılanmış şekilde haftalarca yaşayabilirler ancak kadın genital sistemine boşalan spermiumlar yalnızca 1 ila 2 gün kadar yaşayabilirler (Barrett ve diğerleri 2010; Hall ve Hall, 2020; Widmaier ve diğerleri 2006).

Erkek eşey hücreleri olan spermiumların oluşumu, testisin başlıca ekzokrin fonksiyonudur ve bu fonksiyon birçok faktöre yani hormona bağlıdır. Glandula hypophysialis'in lobus anterior'undan salgılanan follikül stimüle edici hormon (FSH), memelilerde spermatogenezi stimüle etmektedir. FSH ise, doğrudan Sertoli hücrelerini etkiler ve androgen bağlayıcı protein (ABP) sentezi ile salınımını stümile etmektedir. ABP, testosteron ile bağlanmakta ve tubulus seminiferi contorti lümenine salınmaktadır. Sertoli hücreleri, aynı zamanda inhibin denen diğer bir testiküler hormonu da salgılanmasını sağlamaktadır (Doğantekin ve Özcan, 2016). İnhibinler, gonadlardan salgılanarak dolaşıma salınan hormonlar olarak işlev görürler ve bu hormonlar etkilerini FSH salgılanması üzerinde uygular (de Kretser ve diğerleri 2004). İnhibin hormonu kana geçmekte ve glandula hypophysialis'in lobus anterior'undan FSH salınımını inhibe etmektedir (Doğantekin ve Özcan, 2016). Transferrin, seruloplazma, TGF- α , TGF β , androjen bağlayıcı protein (ABP), plazminojen aktivatörü, inhibin B, insülin benzeri büyüme faktörü, ve anti Mülleriyan hormon da dahil, spermatogenezi destekleyen Sertoli hücrelerinden kaynaklı faktörlerin hareketleri hakkında birçok çalışma mevcuttur. Örneğin yapılan çalışmalarda varikoselin FSH hormonu düzeyinde artışa ve bir Sertoli hücresi aktivite parametresi olan inhibin B hormonu düzeyinde azalmaya neden olduğu ve varikosektomi sonrasında bu iki parametrede anlamlı düzelme sağlandığı belirtilmiştir (Kass ve diğerleri 1993; Ozden ve diğerleri 2008).

Genel özellikler göz önüne alındığında inhibinlerin ve aktivinlerin FSH sekresyonunu modüle ettiği ve dolaylı olarak da testis fonksiyonlarını etkileyebildiği açıkça görülmektedir (de Kretser ve diğerleri 2004; Tilbrook ve diğerleri 1993). Bunlar önemli kontrol sistemleridir ve bu konu ile ilgili son yıllarda yapılan en büyük ilerleme, bu proteinlerin testis içindeki yerel faaliyetleri ile ilgilidir. Bu bilginin bir kısmı, alt birimleri özgül olarak tanımlayabilmek için monoklonal antikorların varlığından ve bunların inhibin A, inhibin B ve aktivin A için spesifik ELISA testlerine dahil edilmesi ile ortaya çıkmıştır. Henüz aktivin B için sağlam ve güvenilir bir ELISA testi bulunmamaktadır (de Kretser ve diğerleri 2004; Groome ve diğerleri 2001).

Vücutta stres oluşturan durumlarda testis fizyolojisinin bozulması kaçınılmaz olmaktadır. Stres gelişimi total oksidan seviyesi (TOS) ve total antioksidan seviyesi (TAS) ölçüm kitleri ile belirlenebilmektedir (Ahiskali ve diğerleri 2021; Kurt ve diğerleri 2021). Daha ileri seviyedeki biyokimyasal araştırmalar için de örneğin Katalaz aktivitesi (CAT), Süperoksidad dismutaz aktivitesi (SOD), Peroksidad aktivitesi (POD), Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR), vb ölçümler, uygun ELISA kitleri kullanılarak yapılabilmektedir (Jahan ve diğerleri 2018).

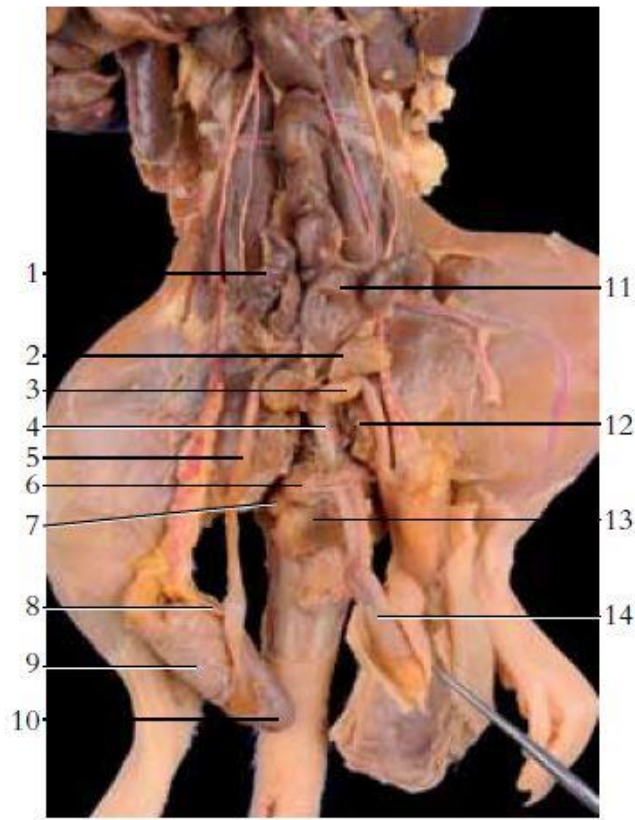
2.2.2. Sıçan Testis Özellikleri

Sıçanlarda testisler, kobay ya da tavşanlara oranla biraz daha geride ve birbirlerine daha yakın olarak bulunur, anüs ile preputium arasında yer alırlar. Sıçanlarda anüs ile preputium arasındaki mesafe yaklaşık olarak 26 mm kadardır. Scrotum tek bir kese halindedir ve caudal ucu anüsü ventral kısımdan kaplar. İki testis arasında ve scrotum'un üzerinde caudal kısımda daha belirgin bir oluk yer alır. Tunica vaginalis ve scrotum açıldığı zaman testis küt-oval şekle sahip (yuvarlağa biraz yakın) olup cauda epididymis'le beraber extremitas caudata'nın biraz medialine doğru kıvrılır. Corpus epididymis ise tıpkı tavşanlardaki gibi testis'in extremitas capitata'sını tıpkı bir şapka gibi örter ve bahsi geçen diğer iki türe göre daha büyük şekillenmiştir. Bu yapının çevresinde az miktarda yağ doku bulunmaktadır. Ductus deferens, corpus epididymis'in dorsalinde yer alır. Ayrıca sıçanlarda bursa testicularis bulunmaktadır (Çakır, 2001).

Sıçan testisi yaklaşık olarak 14 mm'lik bir çapa ve 20 mm'lik bir uzunlukta oval şekilli bir yapıya sahiptir. Tunica albuginea denen beyazımsı mavi renkli 20-40 µm kalınlıkta yoğun bir kollagen dış tabakası vardır. Tunica vaginalis'in lamina visceralis'i (prosesus vaginalis'in testisi saran bölümü) ile tunica albuginea temas halindedirler ancak bu tabaka testisi tamamen kaplamaz. Dorsal kısmında kan damarlarını ve tubuli seminiferi contorti'lerin epididymis'e

giden efferent kanallarını içeren mesorchium denen bağ dokusundan oluşan bir sapı vardır. Tunica albuginea'nın altında tunica vascularis denen bir damar tabakası yer alır (Maynard ve Downes, 2019).

Sıçanlarda iyi gelişmiş lenfatik sinüzoidler ve kan damarları sistemi bulunur ve bu yapılar tubuli seminiferi contorti'lere bitişiktir. Tubuller arasındaki bağ dokusunda büyük eozinofilik endokrin hücreler, Leydig hücreleri yer alır. Sıçanlarda nispeten daha az sayıda Leydig hücreleri bulunur ve bunlar genellikle lenfatik boşluklarla çevrili alanlarda yer alır (Foley, 2001).



Şekil 8. Erkek sıçan ürogenital sistemi

1. Glandula vesiculosa, 2. Glandula prostata (ventral kısım), 3. Glandula prostata (dorsolateral kısım), 4. Canalis pelvis içindeki urethra, 5. Ductus (vas) deferens, 6. Crus penis, 7. Glandula bulbourethralis, 8. Caput epididymis, 9. Testis, 10. Cauda epididymis, 11. Vesica urinaria, 12. Symphysis pubis (pelvik kanalı açığa çıkaran kısım), 13. M. Bulbocavernosus, 14. Penis (Van De Graaff, 2011).

2.2.2.1 Sıçanlarda Spermium Özellikleri

Sıçan tubuli seminiferi contorti enine kesitleri karşılaştırıldığı zaman hücre tiplerinin çeşitli kombinasyonları görülmektedir. Bazı bölümlerdeki yüzeyel hücreler açık bir şekilde spermatidlerdir ve bunlar spermatozoa olmak üzeredirler, diğerlerinde ise yüzeyel hücreler kesin olarak spermatidler olsalar da henüz gelişimin erken aşamasındadırlar. Erken spermatidler yuvarlanır ve gelişim esnasında daha da uzarlar. Leblond ve Clermont (1952) yapmış oldukları çalışmada tubuli seminiferi contorti'lerin epitel tabakalarının hücre tiplerinin belirli kombinasyonlarının tekrar tekrar ortaya çıktıklarını belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra kobay ve sıçanların tubuli seminiferi contortileri boyunca alınan seri kesitlerin belirli bir desen dizisi olduğunu gösterdiğini, tubuli boyunca ilerler gibi gözüken bir dalga oluşturduğunu ve belirli aralıklarla kendisini tekrar ettiğini göstermişlerdir. Bu belirgin dalga, tubuli seminiferi contorti boyunca her noktada hücrelerin bir dizi gelişme fazından geçmesi ve katmandan katmana ilerlemesi sebebi ile meydana gelir, ancak tubuli boyunca her bölümde gelişim aşamaları bir miktar farklı olmaktadır.

Sperm oluşum aşamaları için Clermont ve Leblond, her biri belirli bir hücre tipi kombinasyonu ile nitelendirilen bir dizi tanımlanabilir aşama betimlemişlerdir (Maynard ve Downes, 2019). Creasy'ye (1997) göre hücre döngüsü aşamaları şu şekildedir;

1. Belirli bir aşamanın ortaya çıkışından bir sonraki görünümüne kadar döngü süresi ya da tekrar süresi 12,9 gündür.
2. Her bir döngü 14 aşamaya bölünmüştür, yani aşama başına düzenli 1 gün değildir.
3. 14 aşama, sürelerine göre değişir, örneğin sıçanlarda 7. aşama 58 saat sürer ancak 9. ve 11. aşamaların her biri yalnızca 7 saat sürer. Bu değişkenliğin önemli bir sonucu vardır; eğer rastgele bölümlere bakarsanız hücre döngüsünün 10. aşamada olduğunu görme ihtimalinize kıyasla 7. aşamada olduğunu görme ihtimaliniz 8 kat fazladır.
4. Tüm süreç 56 gün sürer.
5. Tüm süreç 4,5 döngü içerir.
6. Yuvarlak spermatid-spermatozoon dizisinde 19 adım bulunmaktadır. Bu durum, spermatid dizisinde yer alan 14 aşama ile 19 aşama arasında bir uyumsuzluk olduğu anlamına gelmektedir. Birkaç aşama; birden fazla ayırd edilebilir spermatid türü içermelidir.

İnsanlarda tubuli seminiferi contortilerin enine kesitleri, hücre döngüsünün birden fazla aşamasını göstermektedir. Bu durum, bu konuda ilk kez çalışan araştırmacıları, kemirgenlerde görülen düzenli döngünün insanlarda var olmayabileceğine inandırmıştır. Aslında durum böyledir ancak döngüleri tanımlayabilmek daha zordur. Parametreler şu şekildedir; 4 döngü,

her biri 16 gün, döngü başına 6 aşama ve baştan sona toplam süre 64 gündür (Maynard ve Downes, 2019).

Sıçanlarda spermatozoon yaklaşık olarak 190 µm uzunluğa sahiptir ve baş kısmı keskin bir çengel şeklindedir. Memeli türleri arasında spermatozoa kafa şekilleri büyük farklılıklar gösterir. İnsanda spermium baş şekli insanda oval biçimindedir. Küçük kemirgenlerin spermatozoları insan (53 µm) ve filden (50 µm) çok daha uzundur (Bishop ve Walton, 1960). Spermatozoanın anatomik gelişimi testiste tamamlanır ancak epididymis'te motilitesini kazanır ve kapasitasyon (oosite nüfuz etme ve döllenmeyi gerçekleştirme kapasitesinin gelişimi) sadece çiftleşmeden sonra dişi üreme yolunda gerçekleşir (Maynard ve Downes, 2019).

2.2.3. Sisplatin

Sisplatin, yaygın bir şekilde birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan oldukça güçlü ve kıymetli bir kemoterapi ajanıdır (Esteban Cvitkovic ve diğerleri 1977). Cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] bileşiği ilk kez 1845 yılında Michele Peyrone tarafından hazırlanmış ve bu sebeple de uzun bir süre Peyrone tuzu olarak isimlendirilmiştir (Peyrone, 1844). Peyrone tuzunun kimyasal yapısı, Alfred Werner tarafından 1893 yılında uygun bir şekilde ortaya çıkartılmıştır (Barry ve Sadler, 2014). Çoğu kişi tarafından bilindiği üzere sisplatin başlangıçta Dr. Barrett Rosenberg tarafından zekice ve tesadüfi bir gözlemlerle keşfedilmiştir (Rosenberg, 1980). Sisplatinin klinik deneme aşamasına gelmesindeki en hassas adım, NCI (National Cancer Institute/ Ulusal Kanser Enstitüsü) ilaç geliştirme programı aracılığıyla, bu kimyasal bileşiğin deneysel tümör modellerinde çok etkili olduğunun gözlemlenmesi idi. Bu deneysel faaliyet sonucunda sisplatin klinik çalışma için geliştirildi ve nihayetinde Gıda ve İlaç İdaresi'ne IND (bir araştırmaya dayalı yeni ilaç başvurusu) başvurusuna yol açtı (Carter ve Goldsmith, 1974). Rosenberg, elektromanyetik radyasyon uygulayarak bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesine etkilerini araştırdığı esnada *Escherichia coli* türü üzerinde yaptığı ilk deneylerde büyüme bölgelerinde platin elektrotlar kullanıyordu. Platin elektrotların yer aldığı büyüme bölgesi kısmında yer alan bakterilerde normalden 300 kat fazla uzun filamanların bulunduğunu belirledi. Kısa bir zaman dilimi içerisinde bu etkinin verilen elektromanyetik alandan dolayı değil de platin elektrotlardan meydana gelen elektroliz ürünleri sayesinde olduğunu gösterdi. Bu deney sonucu ayrıntılı bir kimyasal analiz gerçekleştirerek bu etkiye neden olan bileşiğin ilk kez 1845 yılında Peyron'un bulmuş olduğu ve Peyron kloridi de denen ve daha sonraları sisplatin adını alan nörtal bir cis izomeri olduğu keşfedilmiştir. Bu bileşenin, bakterilerin hücre bölünmelerini engellediği fakat geri kalan öteki büyüme yapılarını engellemediği ve bundan dolayı epey uzun filamanların

meydana geldiğini ortaya koymuştur. Sisplatine dair bu bulgular 1965’de yayınlanmış ve 1968’de sarkomlu fare üzerinde yapılan intraperitoneal sisplatin uygulaması sonucu, tümörün boyutlarında çıplak gözle görülebilecek kadar bir küçülme meydana geldiği saptanmıştır. Bu sonuç, sisplatinin antineoplastik ve antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiş ve bundan dolayı sisplatin ve türevlerinin bu hedef doğrultusunda kullanılabileceği fark edilmiştir (Stordal ve Davey, 2007).

Dallas’ta yer alan Wadley Enstitüsü’nde ilaç ile tedavisi yapılan ilk hasta için başlangıçta çok yüksek dozlar kullanılmıştır. NCI destekli denemeler sırasında ilk önceleri ilacın aktif olduğu ve böbrekler için toksik olduğu belirlendi. Erken dönemde bazı görüşler meydana gelen böbrek toksisitesinden dolayı ilacın erken kullanımını engelleyeceği yönündeydi. Ancak ilacın potansiyel değeri çok net olduğu için deney sonucunda hidrasyon aracılığı ile toksisitesini büyük ölçüde iyileştiren bir mekanizma keşfetti. Bu renal toksisiteyi önleme kabiliyeti ile ilaç daha yüksek dozda uygulanabildi ve birçok tür solid tümör etkinliği ortaya çıkartılabildi. Bu etkinlik, sisplatin ulusal kanser programına ve klinik araştırmaların hastalık temelli stratejilerine girmesini sağladı. Örnek olarak James Holland önderliğinde bir grup, önce Roswell-Park Memorial Enstitüsü’nde gözlenen testis kanseri aktivitesinde, hastalığın metastaz fazında iyileştirici kemoterapinin geliştirilmesinde önemli bir etki sağladı (Carter, 1984; Higby ve diğerleri 1974; Wallace ve Higby, 1974).

Bristol Myers şirketi tarafından sisplatin’in pazarlama ruhsatı alınmış ve yeni ilaç uygulaması (new drug application/ NDA) hazırlanarak bu ilacın yumurtalık ve testis kanseri endikasyonlarında kullanılması için FDA onayı almasını sağlamıştır. Bristol Myers şirketi daha sonra mesane kanserinin ek endikasyonu için de NDA onayı almıştır. Bu sebeple sisplatin’in tarihçesi modern kanser kemoterapisi devrinin başlangıcından beri etkili kanser ilaçlarının büyük kısmında meydana gelenleri temsil eden endüstriyel girdi, akademik ve siyasi işbirliğinin başarılı bir karışımıdır (Carter, 1984).

Kanser, vücutta herhangi bir bölgede anormal olan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Kanser gelişmesi vücudun normal mekanizmasının çalışmayı bırakması sonucu meydana gelebileceği kabul edilmektedir. Kanserli hastalarda eski hücreler ölmezler ve kontrolden çıkarak yeni anormal hücreler meydana getirirler. Bu fazlalık hücreler, tümör denilen bir doku kitlesi meydana getirebilir (Siegel ve diğerleri 2018). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ya göre kanser, fiziksel kanserojenler (iyonlaştırıcı ve ultraviyole ışınlar), biyolojik kanserojenler (belirli parazitlerde, bakterilerden ve virüslerden kaynaklanan enfeksiyonlar), kimyasal kanserojenler (tütün dumanı ve bileşenleri, asbest, arsenik ve aflatoksin) ile bir kişinin genetik faktörlerinin etkileşimi nedeniyle ortaya çıkabilir (Blackadar, 2016; Ghosh, 2019).

Kanserin evresine ve türüne bağlı olarak hastalar ya ameliyat, radyasyon tedavisi veya kemoterapi gibi geleneksel tedavilerle veya immunoterapi, hormon tedavisi, gen tedavisi, fotodinamik terapi veya hedefe yönelik tedavi yöntemleri ile tedavi edilir (A Baudino, 2015; Abraham ve Staffurth, 2011; H. Zhang ve Chen, 2018). Cerrahi müdahalede kanserli doku ameliyat ile çıkartılır ve genelde sadece kanser lokal bir bölgede ise uygulanır (Benjamin, 2014). Radyoterapi yani radyasyon tedavisinde, kanseri öldürmek ya da küçültmek amacıyla yüksek dozda radyasyon kullanılır (Benjamin, 2014). Diğer yandan kemoterapi bir ya da daha çok alkilleyici veya kemoterapötik ajanın kullanıldığı yaygın ve etkili bir kanser tedavisi prosedürüdür (Eastman, 2017; Lind, 2008; Shewach ve Kuchta, 2009).

Kanser, insan sağlığındaki en önemli sorunlardan biridir ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ve kalabalık bir ülkedeki ikinci ölüm nedenidir. 2021 yılında yapılan bir çalışmada Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) GLOBOCAN (Global Kanser Gözlemevi)'in 2020 kanser hastalıkları istatistiklerini derleme amacı ile kullanılmış olan verilerin kaynakları ve yöntemleri gözden geçirilmiş ve belirli ana sonuçlara ulaşılmıştır. Dünya çapında 38 kanser bölgesi, 185 ülke/bölge için sonuçlar incelenmiş ve tahminen 19,3 milyon (%95 belirsizlik aralığı ortalama: 19,0-19,6 milyon) yeni kanser vakası (18,1 milyon; melanom dışı cilt kanseri hariç) ve yaklaşık 10,0 milyon (%95 ortalama: 9,7-10,2 milyon) ölüm gerçekleştiği belirlenmiştir. Dünya çapında en sık olarak teşhis edilen kanser türleri; kadın meme kanseri (2,26 milyon vaka), akciğer kanseri (2,21 milyon vaka), ve prostat kanseri (1,41 milyon vaka) olarak belirlenmiştir. En yaygın kanser ölüm nedenleri ise akciğer kanseri (1,79 milyon ölüm), karaciğer kanseri (830 bin ölüm) ve mide kanseri (769 bin ölüm) olarak belirlenmiştir (Ferlay ve diğerleri 2021).

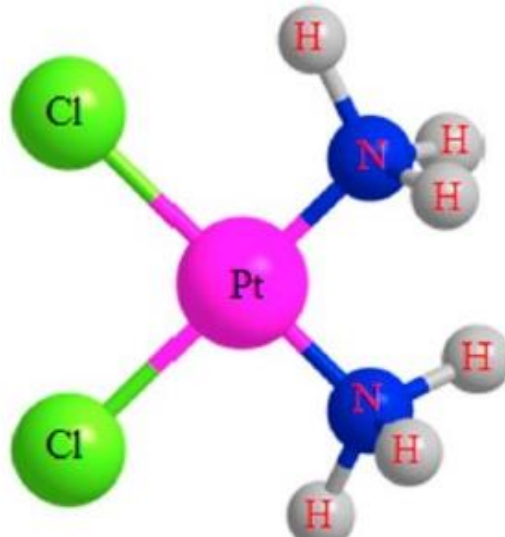
Bugüne kadar yapılan çalışmalar, sisplatin'in kansere karşı etkinliğini birden çok yere saldırarak gerçekleştirdiğini göstermektedir (Florea ve Büsselberg, 2011). Sisplatin çoğunlukla mitokondriyal DNA (mtDNA) veya genomik DNA (gDNA) ile DNA lezyonları meydana getirme, proteinlerin ve mRNA'ların üretimini engelleme, DNA replikasyonunu durdurma ve daha sonra apoptoz veya nekroza neden olan çeşitli transdüksiyon yollarını aktive etme amacı ile bağlanır (Achkar ve diğerleri 2018; Ciccarella ve diğerleri 1985; Jordan ve Carmo-Fonseca, 2000; Riddell ve Lippard, 2018; Siddik, 2003). İlaç direnci ve yan etkiler sebebi ile sisplatin potansiyelinin tamamını gösteremez. Sisplatin direnci, ilacın farklı proteinlere bağlanması ile inaktivasyonu, ilaç birikiminin azalması, apoptozu gösteren farklı yapıdaki proteinlerin değişmesi gibi birçok etkene bağlıdır (Kauffman ve diğerleri 1963; Kelland, 2000; Rocha ve diğerleri 2018; Skowron ve diğerleri 2018). Sisplatin tedavisi sonucu görülen başlıca toksisiteler ototoksosite, nefrotoksosite, gastrointestinal toksosite, hepatotoksosite ve

nörotoksitedir (Astolfi ve diğeri 2013; Dasari ve Tchounwou, 2014; Manohar ve Leung, 2018; Oun ve diğeri 2018). Ayrıca kanserin tekrar ortaya çıkması da sisplatinin önemli dezavantajlarından biridir (Giaccone, 2000; Rossi, 2016). Sisplatinin bu özellikleri araştırmacıları binlerce sisplatin analogu üzerinde çalışmaya sevk eder (Johnstone ve diğeri 2016; Wilson ve Lippard, 2014). Dünya çapında bu analoglardan yalnızca ikisi karboplatin ve oksaplatin onaylanmış olup ve bu ilaçlardan birkaçı da klinik denemelere alınmıştır (Shah ve Dizon, 2009). Ancak çoğu platin bileşiği, sisplatine nazaran önemli bir ayrıcalık göstermez (J. Zhang ve diğeri 2010).

Günümüzde sisplatin testis, ovaryum, baş-boyun, mesane kanserleri, akciğer küçük hücreli tümörleri, solid tümörler ve çeşitli hematolojik kanser tedavilerinde değerlendirilen geniş spektrumlu bir antineoplastik ajandır (Links ve Lewis, 1999).

2.2.3.1. Sisplatin'in Kimyasal Yapısı

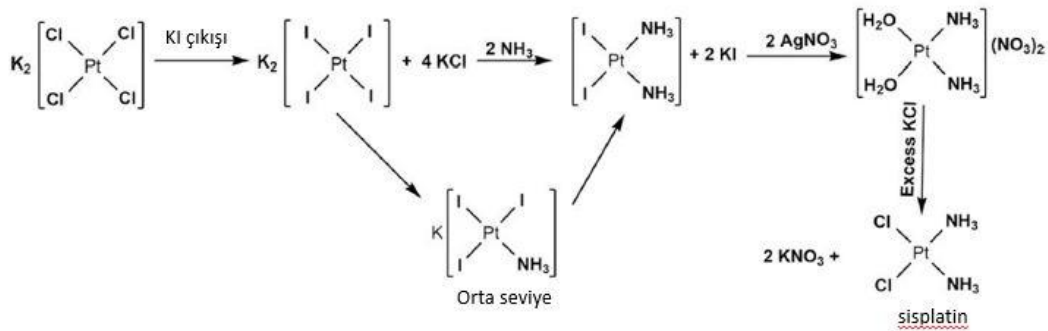
Sisplatin, CDDP veya cis-diamminedichloroplatinum olarak isimlendirilen inorganik bir ilahtır. Bu madde suda çözünebilen platinum içeren bir yapıya sahiptir. İki değerli merkezi bir atoma bağlı iki klor ve iki amonyum bağ ihtiva etmektedir (Lebwohl ve Canetta, 1998).



Şekil 9. Sisplatin'in üç boyutlu yapısının şematize edilmiş hali (Ghosh, 2019).

2.2.3.1.2. Sisplatin Sentezi

En etkili sisplatin sentezi yöntemi 1970’de Dhara tarafından verilmiştir (Dhara, 1970). Dhara methodu şemada gösterildiği üzere sulu $K_2[PtCl_4]$ ’ün ilk etapta $K_2[PtI_4]$ meydana getirmek için fazla KI ile muamele edildiği çok basamaklı bir işlemdir. Bu koyu kahverengi $K_2[PtI_4]$ çözeltisinde amonyum hidroksit eklenir ve sonuç olarak cis- $[Pt(NH_3)_2I_2]$ ’nin sarı çökeltisi meydana gelir. Bu çözelti daha sonra toplanıp kurutulur. İyodür liganlarını cis- $[Pt(NH_3)_2I_2]$ kompleks yapısından çıkarmak amacıyla çözünür $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ ve çözünmez AgI oluşumu ile neticelenen 2 eşdeğer sulu $AgNO_3$ çözeltisi ilave edilir. Çözünmeyen AgI, süzülüp atılır. $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ barındıran filtrat bundan sonra izomerik olarak saf sarı sisplatin elde etmek amacı ile fazla KCl çözeltisi ile birlikte işlenir. Sisplatin, %9’luk NaCl ya da 0,1 M HCl içeren sıcak sudan, yeniden kristalleşme yolu ile saflaştırılabilir (Davies ve diğerleri 2008; Hoeschele ve diğerleri 1982). İlk yapılacak işlem yani $K_2[PtCl_4]$ ’ün $K_2[PtI_4]$ haline gelmesi gerçekten önemli bir basamaktır çünkü iyodidin klorüre nazaran daha güçlü trans etkisi, saf sisplatin’in imal edilmesine yardımcı olur (Alderden ve diğerleri 2006).



Şekil 10. Sisplatinin sentetik seması (Dhara yöntemi).

2.2.3.1.3. Sisplatin’in Etki Mekanizması

Sisplatin, hastalara intravenöz olarak steril salin solüsyonu halinde uygulanır (Ghosh, 2019). Vücuttaki kan dolaşımında klorür konsantrasyonu yaklaşık olarak 100 mM’dir ve bundan dolayı sisplatin nötr kalır ve değişmez (Alderden ve diğerleri 2006; Petrović ve Todorović, 2016b). Sisplatin değişmeden kan dolaşımı vasıtası ile tüm vücuda akmaya devam eder. Sisplatin ile albümin, plazma proteinleri, sistein, vb. ile güçlü bir bağlantı kurabilir ve bundan dolayı büyük miktarda uygulanan sisplatin deaktivasyonu meydana gelir (Alderden ve diğerleri 2006; Nagai ve diğerleri 1996). Yapılan çalışmalarda, uygulamadan sonraki 24 saat

içerisinde sisplatin'in %65-95'inin kan plazma proteinine bağlanabileceği görülmüştür (Ivanov ve diğerleri 1998). Geriye kalan sisplatin, plazma membranından pasif difüzyon aracılığı ile tümör hücrelerine göçebilir (Alderden ve diğerleri 2006; Gately ve Howell, 1993; Petrović ve Todorović, 2016b). Günümüzde yapılan çalışmalar, CTR1'in (bakır taşıyıcı protein) sisplatin alımından da yükümlü olduğunu göstermektedir (Ishida ve diğerleri 2002). Sisplatin, CRT1 konsantrasyonunun bozulmasını, kanser hücreleri aracılığı ile daha düşük sisplatin birikimi meydana getirerek sağlar. Daha yüksek CTR1 ekspresyonuna sahip olan hücreler, daha fazla miktarda sisplatin birikimine sahip olabilir ve dolayısı ile bu olay da sisplatine daha yüksek bir hassasiyet sağlamış olur (Dasari ve Tchounwou, 2014). Sisplatin hücre içine girdiği zaman klorür ligandlarından bir tanesinin bir su ligandı ile değiştirilir ve bu şekilde aktive olur yani sisplatin'in monoaquasyonu gerçekleşmiş olur. Sisplatin'in mono ve/veya diaquasyonu, sitoplazmada yer alan klorür konsantrasyonunun daha düşük olması (yaklaşık 4-20 mM) ve güçlü elektrofil olmaları sebebi ile meydana gelir. Nükleik asitlerin nitrojen donör atomları ve proteinin sülfhidril grupları vb. gibi bir seri nükleofil ile reaksiyona girebilirler çünkü su klorürden daha iyi gruptan ayrılır (Dasari ve Tchounwou, 2014; Fuertes ve diğerleri 2002). Yapılan in vitro çalışmalarda monoaquasyonlu platinin DNA bağlanmasına karşı diaquasyonlu platinden daha reaktif olduğu kanıtlanmıştır (Davies ve diğerleri 2000).

Sisplatin toksisitesinde oksidatif stres hasarı çok yaygın görülen bir mekanizmadır. Oksidatif stresin indüklenmesi, sisplatin konsantrasyonu ve sisplatine maruz kalma sürecine bağlı olarak süperoksit, hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturulması ile meydana gelir (Brozovic ve diğerleri 2010). Sisplatin toksisitesinin sülfhidril gruplarının tükenmesinden, ROS'un lipid peroksidasyonundan, değişen farklı sinyal iletim yollarından, vb. sorumlu olduğu farz edilmektedir bundan dolayı DNA hasarı ve dolayısı ile hücrelerin apoptozisine sebep olabilir (Florea ve Büsselberg, 2011). Oksidatif stresin en önemli hedeflerinden biri mitokondridir ve ROS, hücre işlev bozukluğuna neden olarak mitokondriyal solunumu etkileyebilir (Saad ve diğerleri 2004). ROS, Ca^{+2} ve Bax (Bcl2 ile ilişkili X) ile beraber mtDNA hasarı ve MPT (mitokondriyal geçirgenlik geçişi)'de düşüğe sebep olur (Kroemer ve diğerleri 1997) ve bu olay mitokondri yırtılmasını kolaylaştırır (Green, 1998). Mitokondri yırtılması sonucu kaspaz-9'u aktive eden bir apoptozom kompleksi oluşturmak için ATP (adenozin trifosfat) ve sitozolik Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ile bağ kuran procaspaz-9 (kaspaz sistein aspartata özgü proteaz) ve Cyt C (sitokrom c)'yi serbest bırakır. Kaspaz-9 aktive edildikten sonra diğer kaspazlarla etkileşime girer, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 yi aktive eder bu da temel substratları bölerek apoptoza neden olur (Reed, 2002).

Apoptoz, hücre intiharı ya da ATP bağımlı programlanmış hücre ölümü olarak bilinen olaydır (Elmore, 2007).

Sisplatin, hücre zarından hücre apoptozunu da indükleyebilir (Rebillard ve diğerleri 2008). Aynı zamanda sisplatin, Fas ligandı (FasL) (tip II transmembran proteini olup tümör nekroz faktör ailesindedir) ve Tip II transmembran proteinini daha sonra FADD (Fas ile ilişkili ölüm oranı) ve procaspaz-8'den apoptozom kompleksinin meydana getirilmesini kolaylaştıran Fas reseptörünü aktive etmektedir (Fuertes ve diğerleri 2002). Meydana gelen bu apoptozom kompleksi sonradan kaspaz-6, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive eden kaspaz-8'i aktive eder ve dolayısı ile en sonunda bu olay temel substratı ayırır ve hücre apoptozuna neden olur (Ghosh, 2019).

Sisplatin'in temel hedefi genomik DNA (gDNA)'dır fakat hücreler arası sisplatin'in küçük bir miktarı (yaklaşık %1 kadarı) genellikle gDNA'ya bağlanır (X. Lin ve diğerleri 2002). Yüksek mobilite grubu (HMG-high mobility group) proteinleri gibi farklı proteinler, sisplatin-DNA kombinasyonlarını kolaylıkla tanır. HMG1 proteini, 1,2-cisplatin-DNA eklentisini seçici olarak tanıyarak bağlanır, onlara kalkan olur ve onarımdan korur (Imamura ve diğerleri 2001; Zamble ve diğerleri 2002). Sisplatin-DNA-HMG1 kompleksi, 3 farklı yol izler. Bu yollardan ilki DNA'nın onarımını gerçekleştirmek için NER (nükleotid eksizyon onarımı) mekanizması akışını sağlamaktır ve bu şekilde hücre hayatta kalır. İkinci yol; onarım koruma modelidir. Bu modelde HMG proteini, sisplatin-DNA eklentilerini DNA onarım enzimleri tarafından tanınmaktan koruyabileceği varsayılır (Miguel A. Fuertes, 2003). Üçüncü yol ise kaçırma modelidir, bu modelde SSRP1 gibi HMG proteinleri, DNA hasarını takiben hücre döngüsü olaylarını ayarlayabildiğini ve hücre ölümlerini tetikleyebildiğini göstermektedir (Brown ve diğerleri 1993; Miguel A. Fuertes, 2003).

Sisplatin sitotoksitesinin en önemli parçalarından biri de DNA onarım mekanizmasıdır. NER ve MMR (mismatch repair-yanlış eşleşme onarımı), DNA onarımı ile ilgili proteinlerdir. NER sistemi, 17 farklı protein içerir, bunlar, Pt-DNA zincir içi çapraz bağları tanır ve sonra 20-29 baz çiftine kadar DNA dizilerini keser (Moggs ve diğerleri 1997). Kalan boşlukları DNA polimeraz doldurur (Reardon ve diğerleri 1999). MMR'nin görevi iki bitişik guanin zincir içi eklentisi karşısındaki hasarsız zincire, doğru nükleotidi girmektir (Petrović ve Todorović, 2016b; Vaisman ve diğerleri 1998). MMR hasarları tamir edemediği zaman hücre apoptozu oluşur. Sisplatinin sebep olduğu hücre döngüsünün durması (G1, S ve G2 fazı) yolu ile hücre apoptozisi de meydana gelebilir (Wagner ve Karnitz, 2009). Bu olaylar DNA sentezi öncesi hasarlı DNA'nın onarımı için hücreye zaman tanır. G ve S fazı durmasından sorumlu olan Chk1 ve Chk2 kontrol noktası kinazlarını sisplatin aktive eder

(Pabla ve diğeri 2008). Bu işlem basamaklarının iptal edilmesi kanser hücrelerinin NER yolu ile hücre apoptozunu kolaylaştıran onarılmamış DNA hasarı karşısında hücre döngüsüne zamanından önce tekrar girmeye zorlayarak hücrenin öldürülmesine sebep olabilir. Sisplatin kaynaklı apoptozda p53 yani tümör baskılayıcı protein merkezi bir işlev gören kısa ömürlü bir proteindir. Aynı zamanda genom mutasyonunu önler ve stabiliteyi korur, bu sebeple “genom koruyucusu” da denir (Lane, 1992). ATR (ATM ve RAD3 ile ilgili protein), p53 ve ATM (ataksi telenjiectazi mutasyona uğramış protein) denen iki farklı kinaz tarafından aktive edilir. Önce ATR kinazı sisplatin tarafından aktive edilir daha sonra sisplatin serin-15’te fosforile edilir ve p53’ü aktive eder (Appella ve Anderson, 2001; Damia ve diğeri 2001). p21, DNA onarımı yolu aracılığıyla apoptoza yol açar ve p53 hücre döngüsünün durmasından sorumludur. Bu ikili, Mdm2 ve GADD45 genlerinin aktive olmasını sağlarlar (Petrović ve Todorović, 2016b). p53 şu mekanizmalar aracılığı ile doğrudan apoptoza sebep olur;

- FLIP (flice benzeri inhibitör protein)’in bozulması,
- Bcl-xL (B-hücreli lenfoma, ekstra büyük)’in doğrudan bağlanması ve antiapoptotik işlevine engel olma,
- PTEN (fosfotaz ve tensin’in homoloğu)’in aşırı ekspresyonu, (Basu ve Krishnamurthy, 2010; Dasari ve Tchounwou, 2014).

p53, PUMA, PIDD ve MAPK protein ailesini aktive eder ve bunlar hücre apoptozundan sorumludur (Dasari ve Tchounwou, 2014; Jeffers ve diğeri 2003; Y. Lin ve diğeri 2000). Apoptozu sağlayabilmek için sitozolde bulunan Bax’ı aktive ederek mitokondriyal faza girmek mümkündür (Makin ve diğeri 2001). p53 ayrıca kaspaz3 ve kaspaz 8 yolu aracılığı ile apoptoza sebep olan Fas/FasL’yi kolaylaştırır (Brozovic ve diğeri 2010).

2.2.3.1.4. Sisplatin Direnci

Sisplatin ile yapılan tedavideki en ciddi dezavantaj, sisplatinin kanser hücrelerine karşı direncidir. Bu direnç, kanserin türüne bağlı olarak değişmektedir. Örnek vermek gerekirse yumurtalık kanseri, testis kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve baş-boyun kanseri sisplatine karşı çok duyarlı iken, kolorektal kanser ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri sisplatine karşı dirençlidir (Fuertes ve diğeri 2002; Muggia ve Los, 1993). Sisplatin direncinin iki farklı şekli vardır; kazanılmış direnç ve içsel direnç. İçsel direnç yani intrinsik direnç; ilaç ile tedavi başlangıç anından itibaren oluşan dirençtir. Kazanılmış dirençte ise ilaç tedavi başlangıcında aktiftir fakat zamanla inaktif hale gelir (Florea ve Büsselberg, 2011). Sisplatin direnci, ilacın akış miktarı azalarak, hücresel alımı azaltarak ya da dışa akışını artırarak, hücresel tiyoller

tarafından ilaç hedefinde değişiklik, ilaç detoksifikasyonu ve DNA onarımı sayesinde meydana gelebilir (Brabec ve Kasparikova, 2005; Kartalou ve Essigmann, 2001; Sedletska ve diğerleri 2005).

2.2.3.1.4.1. Kan Dolaşımı Yoluyla İlaç Dolaşımı Sırasında Direnç

Sisplatin uygulanması intravenöz yol ile gerçekleştirilir ve bu sebeple ilaç kanser hücrelerine girmeden evvel kanda dolaşır. Kan dolaşımında yer alan proteinler, bilhassa insan sistein ve serum albümini gibi tiyol grubuna sahip olanlar, sisplatin ile bağlanabilirler. Bu protein bağlanması sonucu sisplatin deaktivasyonu gerçekleşir (Lempers ve Reedijk, 1991). Daha önce yapılan çalışmalarda sisplatinin %65-95'inin, uygulanmasından bir gün kadar sonra plazma proteinine bağlanmakta olduğu belirtilmiştir (Ivanov ve diğerleri 1998). Sistein ile HAS proteini ile yumuşak sülfür ve yumuşak platin arasında bulunan güçlü bağlanma yapısı; Sert-Yumuşak Asit-Baz ilkesi ile açıklanabilir (Pearson, 1963).

2.2.3.1.4.2. İlacın Hücre Zarından İçeri veya Dışarı Akışı Sırasında Direnç

Sisplatin akışının artışı ve azalışı, kanser hücrelerinde daha düşük düzeyde ilaç birikimine sebep olur (K. Wang ve diğerleri 1996). Yapılan bir çalışmada sisplatin birikiminin azalmasının artan ilaç akışından çok azalan ilaç alımından dolayı meydana geldiği belirtilmiştir (Fuertes ve diğerleri 2003). Ctr1 (copper transporter 1) pasif difüzyon ve bakır taşıma proteindir, sisplatinin akışından sorumludur. Vücutta sisplatin varlığında Ctr1 konsantrasyonu bozulur ve bundan dolayı sisplatin akışı önemli ölçüde azalır. Dolayısıyla bunun sonucunda ilaca direnç meydana gelir (X. Lin ve diğerleri 2002). TMEM205 bir membran proteindir ve sisplatine karşı hücre sel direnişini sağlar (Dasari ve Tchounwou, 2014). ATP7A ve ATP7B bakır taşıyıcıdır, hücreden sisplatin dışarı çıkarmaya yardımcı olurlar ve bu da dirence sebep olur (Nakayama ve diğerleri 2001).

2.2.3.1.4.3. Sitoplazmada Bulunan Sisplatin Sırasındaki Direnç

En önemli sisplatin direnç mekanizmalarından birisi sisplatinin metallothioneinler ve glutatyonla bağlanma yolu ile hücre içi inaktivasyonudur. Sisplatin kompleksi ve GSH (aktif glutatyon) sonradan bir GS-konjuge ihracat pompası tarafından atılır (Ishikawa ve diğerleri

1994). Yapılan çalışmalarda Glutatyon S-transferaz enziminin (GST) ya kendiliğinden oluştuğu ya da bu reaksiyona yardımcı olduğu bildirilmiştir (W. Wang ve Ballatori, 1998).

2.2.3.1.5. Kanser Tedavisinde Sisplatin Kullanımı

2.2.3.1.5.1 Testis Kanseri Tedavisinde Sisplatin Kullanımı

Genç erkekler arasında seminom ve non-seminom kanser türleri sıkça görülür. Seminomlar tüm yaş gruplarında ortaya çıkar ve non-seminomlara kıyasla daha yavaş büyüme ve yayılma eğilimindedirler. Sisplatin bazlı uygulamalar, seminomların tedavisinin anahtarıdır. İlerlemiş seminomlu hastalarda, hastaların yaklaşık %85 kadarı üç ya da dört kür sisplatin bazlı tedavi ile iyileşme gözlenirken tek ajanlı karboplatin için iyileşme oranı yaklaşık %59'dur (Motzer, 1993; Schmoll ve diğerleri 1993). Genellikle erkeklerde ergenlik sonu ile 30'lu yaşların başı arasında non-seminomlar görülür ve temel olarak dört alt tip görülür. Bunlar; embriyonal karsinom, koryokarsinom, yolk sac karsinom ve teratom'dur. Teratom hastaları için en etkili tedavi şekli etoposid, bleomisin ve sisplatin ile kombinasyon uygulanmasıdır ve kür oranı en az %90'dır (Dearnaley ve diğerleri 1991). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 1978 yılında testis ve metastatik yumurtalık kanserleri tedavisi için sisplatin'in onaylandığı belirtilmiştir (Rozenweig ve diğerleri 1977). Sisplatinin testis kanserine karşı olan duyarlılığının asıl kaynağı tam olarak bilinmemekle birlikte bunu açıklayabilmek için birkaç yol önerilmiştir; örneğin yapılan bir çalışmada prostat kanseri hücrelerinin, kanser hücrelerinin ölümünü düzenleyen Kindlin-2'yi aşırı derecede eksprese ettiği kanıtlanmıştır (Gong ve diğerleri 2010). Bir diğer yapılan çalışmada testis hücrelerinin sisplatine olan duyarlılığının düşük ERCC1-XPF ekspresyonu ve iplikler arası çapraz bağ onarımındaki eksiklikten kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Usanova ve diğerleri 2010). Koster ve diğerlerinin yapmış olduğu bir çalışmada, vahşi tip p53 proteini ve yüksek Oct4 seviyelerinden dolayı yüksek hücrel proapoptotik Noxa proteini ve miR 17/106b çekirdek aile üyelerinin ve düşük sitoplazmik anti apoptotik p21 protein seviyelerinin TC hücrelerinin sisplatine karşı mükemmel duyarlılığı için önemli parametreler olduğunu göstermiştir (Koster ve diğerleri 2013).

2.2.3.1.5.2 Diğer Kanser Türlerinin Tedavisinde Sisplatin Kullanımı

Sisplatin tedavisi yalnızca yumurtalık, testis ve akciğer kanserleri ile sınırlı değildir. Yaygın olarak mide kanserlerinin, çocukluk çağı beyin tümörlerinin, anal kanserin, lösemnin vb. tedavisinde kullanılmaktadır (Ajani ve diğerleri 2008; A. B. Khan ve diğerleri 1982;

Koizumi ve diğeri 2008; Previati ve diğeri 2006). Sisplatin, meme kanseri tedavisinde çok faydalıdır ve hastanın ömrünün uzamasını sağlar (Decatris ve diğeri 2004). Örneğin baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) için sisplatin verimli bir ilaç değildir yalnızca %32'lik bir iyileşme sağlar (Wiltshaw, 1979). Dolayısı ile sisplatinin, yumurtalık, testis, baş ve boyun, meme, mesane, prostat, akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılabilen çok başarılı bir kemoterapötik ajan olduğu sonucuna varılabilir (Dhar ve diğeri 2011; Tsimberidou ve diğeri 2009).

2.2.3.1.6. Sisplatinin Yan Etkileri

Sisplatin, yumurtalık ve testis kanserlerinin tedavisinde çok başarılıdır fakat çok sayıda toksik yan etkisi de bulunmaktadır (E Cvitkovic, 1998). Bu yan etkilerin görülme sebeplerinden biri de doz aşımıdır (Astolfi ve diğeri 2013). Sisplatin tedavisinde görülen başlıca yan etkiler; ototoksisite, nefrotoksisite, gastrointestinal toksisite, hepatotoksisite vb.'dir.

İntravenöz yoldan standart dozda sisplatin ile tedavi edilen bir hastada sisplatinin eliminasyon oranı 24 saat içerisinde yaklaşık olarak %25 ve 5 gün içerisinde de %50 oranındadır ve toplamda atılımın %90'dan fazlası böbrekler aracılığı ile gerçekleşir (Tsang ve diğeri 2009). Bu sebeple renal atılım, başlıca sisplatin atılım yoludur ve dolayısı ile böbrekler nefrotoksisiteden sorumlu diğer organlardan çok daha fazla miktarda sisplatin biriktirebilirler. Yalnızca 50 mg/m² sisplatin kullanılarak (tek ajan olarak) tedavi edildikleri zaman hastalarda %28-36 oranında renal toksisite görülür (Ghosh, 2019). Nefrotoksisite, kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin, serum ürik asit ve/veya kreatinin klirensindeki azalma ve dengesiz elektrolitler sebebiyle görülür (McKeage, 1995; Petrović ve Todorović, 2016a).

Sisplatin tedavisi sonucu meydana gelen ototoksisite, çocukları yetişkinlerden daha fazla etkilemektedir (%22-70) ve ototoksisite hastaların yaklaşık %10-90'ında görülmektedir (Knight ve diğeri 2005; Petrović ve Todorović, 2016b). Cochlea hücrelerinde, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, işitme kaybı meydana getirebilir (Sheth ve diğeri 2017). Sisplatin tedavisi sonucu meydana gelen işitme kaybı genel olarak yüksek frekans aralığında, çift taraflı ve kalıcı olmaktadır (McKeage, 1995; Sheth ve diğeri 2017). Sisplatin kaynaklı ototoksisite için antiinflamatuvar ajanlar ve antioksidanların sistematik veya lokal olarak uygulanmalarının çok önemli tedavi edici etkileri olduğu çeşitli çalışmalar tarafından rapor edilmiştir (Rybak ve diğeri 2019).

Son yıllarda yapılmış bir çalışmada sisplatin maruziyetinin insan fetal testisindeki toplam germ hücreleri sayısında (-%44, p<0,0001) önemli miktarlarda azalmaya neden olduğu

görülmüştür. Başlangıçta bir gonosit kaybı ve bunun arkasından spermatogonyumda önemli miktarda azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. Sisplatin maruziyetinin puberte öncesi insan testis dokularındaki toplam germ hücre sayısı (spermatogonial kök hücreler dahil olmak üzere) üzerinde benzer semptomlara neden olarak, çocukluk çağı kanser hastaları ile doğrudan ilişkili olduğu gözlenmiştir. Sisplatin uygulaması sonucu insan fetal testis dokularında germ hücre kaybının (- %42, $p<0,01$) 12 hafta boyunca devam ettiği rapor edilmiştir (Tharmalingam ve diğerleri 2020).

2.2.4. Silymarin

Süt devedikeni bitkisi olarak bilinen (Milk Thistle, deve dikenini, Meryem ana dikenini), Astraceae familyasına ait *Silybum marianum* bitkisi asıl olarak Akdeniz bölgesi ve Amerika Birleşik Devletleri'nin bazı bölgelerine özgü bir bitki olmakla birlikte günümüzde sıcak ve kurak diğer bölgelere de yayılmış olan tek veya iki yıllık bir bitkidir (Hadolin ve diğerleri 2001). Coğrafi dağılıma göre Küçük Asya, Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Güney Rusya Federasyonu'na özgüdür; Avustralya, Kuzey ve Güney Amerika, Çin ve Orta Avrupa'da da tanınmaktadır (Zarif-Yeganeh ve Rastegarpanah, 2019). Silymarin (SM) çağlar öncesinden kalma bir bitki olarak birçok hastalıkta çeşitli tedavi edici kullanımlara sahiptir (Zarif-Yeganeh ve Rastegarpanah, 2019). Bu bitkinin tohumlarından elde edilen özler, karaciğer sirozu, karaciğer hastalıkları ve karaciğer kanserini önlemek için tıbbi ilaç olarak kullanılır (Ramasamy ve Agarwal, 2008; Sánchez-Sampedro ve diğerleri 2005).



Şekil 11. *Silybum marianum* sırasıyla bitki, çiçek ve tohumları (Porwal ve diğerleri 2019)

Silybum marianum bitkisi, tıbbi kullanımı geniş ve yaygın bir geçmişe sahiptir. Aristoteles'in halefi olan Yunan filozof Theophrastus (MÖ 371-287), Pternix adı altında deve dikenine atıfta bulunmuştur (Morazzoni ve Bombardelli, 1995). Büyük Plint (MS 23-79) ve Dioscorides (MS 40-90) bu bitkiyi tanımlamış ve kullanım şekillerini açıklamışlardır (Scott Luper, 1998). 16. yy'da deve dikenini bitkisi özellikle hepatobiliyer hastalıklar için sıkça tercih edilen bir ilaç haline gelmiştir (Schuppan ve diğerleri 1999). Önde gelen bir İngiliz bitki uzmanı

olan Nicholas Culpeper 1652’de kaleme almış olduğu ‘The English Physitian’ isimli eserde deve dikeninin karaciğer ve dalak tıkanıklıkları için mükemmel bir çare olduğunu yazmıştır (Culpeper ve Siderits, 1952). Deve dikenini bitkisi, Avrupalı kolonistlerle birlikte Amerika’ya gelmiştir. Geçen yüzyıl başlarında bir grup bitki uzmanı olan Eklektikler, bu bitkinin özlerinin dalak, karaciğer, böbrek ve adet bozukluğu hastalıklarını tedavi etmek için kullanmışlardır (Giese, 2001). Bu etken maddeye olan tıbbi ilgi 1960’lara kadar azalmıştı ancak özellikle Almanya’da yapılan araştırmalar dikkatleri akut ve kronik karaciğer hastalığının tedavisinde deve dikenini ve bileşenlerine yeniden odaklamış ve karaciğerde toksik hasarı engellemek için hepatoprotektif bir ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Scott Luper, 1998).

Asteraceae familyasının Carduoideae alt familyasına ait olan devedikeni/Milk thistle bitkisine ait ana aktif polifenolik bileşenler şunlardır; silikristin, flavonolignanlar, silibin, silydianin ve izosilibindir ve bunların tamamı silymarin (SM) olarak bilinir (Calani ve diğerleri 2012). Güvenilirliği, koruyucu etkileri ve iyi farmokinetik özellikleri nedeniyle SM; Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, sepsis, osteoporoz, yanıklar, diyabet, kolestaz, ülseratif kolit, kanserler, hiperkolesterolemi, nefrotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, Amanita phalloides zehirlenmesi, akciğer ve karaciğer hastalıkları, prostat hastalığı, depresyon ve tüp bebek (IVF-in vitro fertilizasyon) gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir. SM’in hepatoprotektif etkisi klinik olarak da gösterilmiştir (Baghbahadorani ve Miraj, 2017; Gazak ve diğerleri 2007; Kandemir ve diğerleri 2017; Karimi ve diğerleri 2011; Katiyar ve diğerleri 2005; Mansour ve diğerleri 2006; Milić ve diğerleri 2013; Qin ve diğerleri 2017; Rastegarpanah ve diğerleri 2015; Saller ve diğerleri 2008; Stolf ve diğerleri 2017; Varzi ve diğerleri 2007).

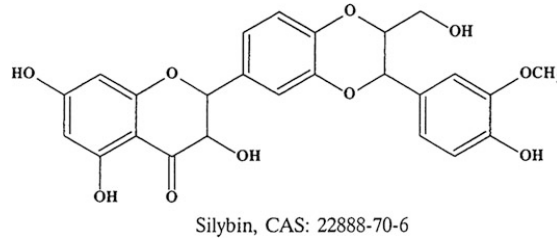
SM’in ilaç etkileşimleri ve önemli yan etkileri bulunmamaktadır. En sık görülen yan etki gastrointestinal rahatsızlıktır ve nadiren kaşıntı, egzama, döküntü ve anafilaksi gibi alerjik reaksiyonlar görüldüğü rapor edilmiştir (Rainone, 2005; Tamayo ve Diamond, 2007). İnfertilite küresel bir sorundur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ne göre infertilite “12 ay ya da daha fazla süre içerisinde düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrası klinik gebelik meydana gelmemesi ile tanımlanmış üreme sistemi hastalığı” olarak tanımlanmıştır. İnfertilite bir sakatlık olarak tanımlanmıştır ve ağır sakatlık için dünya sıralamasında kadın kısırlığı beşinci sırada bulunmaktadır (WHO, 2019b). Gelişmekte olan ülkelerde hemen hemen her dört çiftten birinde çocuk sahibi olamama sorunu bulunmaktadır (WHO, 2019a). Tüm dünyada yaklaşık olarak 48,5 milyon çift yani çiftlerin yaklaşık %15 kadarı infertiliteden etkilenmektedir. En yüksek kısırlık oranı Orta/Doğu Avrupa ve Afrika’da gözlemlendi. Erkek infertilitesi farklı ülkelerde oransal olarak yaklaşık %20-70 arasında değişmekte ilen genel olarak infertilitenin %50’si kadın faktörlerine, %20-30’u ise erkek faktörlerine bağlıdır (A. Agarwal ve diğerleri 2015).

Yapılan birçok çalışmada oosit ve spermiumlarda kemoterapi ilaçlarının ve çevresel toksinlerin negatif etkilerine karşı SM'in antioksidan ve koruyucu özelliği rapor edilmiştir. Birçok çalışma, spermium ve oositlerde kemoterapi ilaçlarının ve çevresel toksinlerin olumsuz etkilerine karşı SM'nin koruyucu ve antioksidatif özelliklerini göstermiştir (Abdelmeguid ve diğerleri 2010; Afsar ve diğerleri 2017; El-Hameed ve diğerleri 2021; Mansour ve diğerleri 2006; Scambia ve diğerleri 1996).

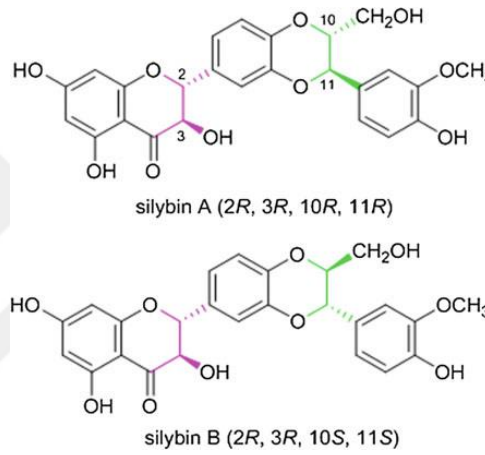
2.2.4.1. Silymarin'in Farmokinetiği

Silybum marianum, papatya ailesinde olduğu gibi sadece bir tanesinin tohuma dönüştüğü çift yumurtalıktan oluşan kuru tek tohumlu meyvesi olan bir bitkidir ve tohum özütü ya da tüm *S.marianum* bitkisinden elde edilen bileşikler %65 ila %80 oranında flavonolignanlardan, yaygın olarak SM olarak bilinen polimerik polifenollerden ve %20-35 oranında yağ asitlerinden (Linoleik (%50.5) ve oleik (%30.2) asitler) meydana gelen bileşiklerin bir kısmını içermektedir. SM bitkisinde yedi flavonolignan ve flavonoid taksifolinden bulunmaktadır. Bu flavonolignanlar; izosilibin A, silibin A, izosilibin B, silibin B, izosilikristin, silikristin, ve silydianin'dir (Chambers ve diğerleri 2017; Kim ve diğerleri 2003; Mastron ve diğerleri 2015; Polyak ve diğerleri 2013; Scambia ve diğerleri 1996). En fazla bulunan bileşenler silibinin veya silybin de denen silybin A ve silybin B'dir (Chambers ve diğerleri 2017). Bu ikisi özütün ana bileşenlerini temsil etmektedir (Abenavoli ve diğerleri 2010; Bijak, 2017; Polyak ve diğerleri 2013). SM'in biyoyararlanımı düşüktür ve bu biyoyararlanım diğer flavonoidler, amino asitler, fenol türevleri, tokoferol, proteinler, kolesterol, yağ içeriği ve preparatta bulunan diğer maddeler ile preparatın kendi yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Voinovich ve diğerleri 2009). Buna ek olarak, karışıma çözüldürücü maddelerin eklenmesi ile birlikte sistemik biyoyararlanım da artırılabilir (Saller ve diğerleri 2001). Yapılan farmokinetik çalışmalar esas olarak SM'in ana bileşeni olan silybin'in üzerinde gerçekleştirilmektedir. Günümüzde bilim insanları SM'deki silybin ve diğer flavonolignanların oral içeriği, çözümleri ve oral biyoyararlanımdaki ortak kaynaklarına rağmen SM'in belirgin yararlı etkilerine katkıda bulunabilecek ve dahası bunlardan sorumlu olabilecek varyasyonlarının kayıt altına alınması gerekmektedir (Chambers ve diğerleri 2017; Choi ve diğerleri 2011). Bu sebepten dolayı çalışmalar arasındaki karşılaştırmalar dikkatle yapılmalıdır çünkü SM'de bulunan ve silybin'de bulunmayan bazı bileşenler, bileşiklerin en sonuncu aktivitesinde büyük öneme sahip olabilirler. Bütün bunlara ek olarak SM'in bileşiminin içeriğinin belirlenmesi sonuçların tekrarlanabilmesi ve geçerliliği ile ilgili

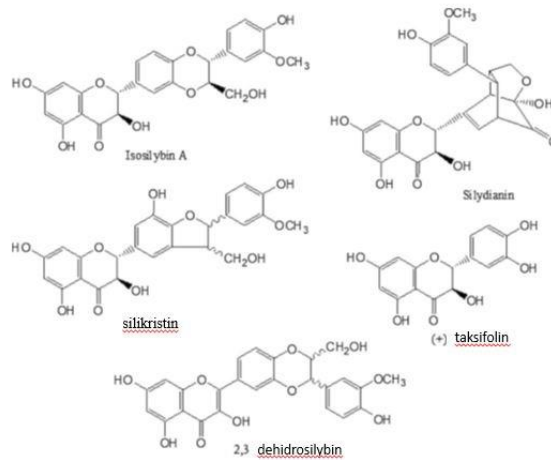
problemleri azaltabilmek için gerekli bir adımdır çünkü SMN'in bileşimi; işlemeye, kullanılacak bitkinin kimyasal çeşitliliğine ve bitki büyümesi sırasındaki iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Chambers ve diğerleri 2017).



Şekil 12. Silybin'in kimyasal formülasyonu (Jaggi ve Singh, 2016)



Şekil 13. Silybin A ve Silybin B'nin kimyasal formülasyonu (Jaggi ve Singh, 2016)



Şekil 14. İzosilybin A, silykristin, silydianin, taksifolin ve 2,3-dehidrosilybin'in kimyasal formülasyonu (Jaggi ve Singh, 2016).

SM'in suda çözünmemesi, çay preparatlarını etkisiz hale getirmektedir bu sebeple genellikle kapsül formda oral olarak uygulanır. Gastrointestinal yoldan silymarin eklenmesi sadece belirli bir oranda (%23-47) olduğu için %70-80 silymarin standardize özü olarak uygulanır. İnsanlarda ve hayvanlarda oral bir doz uygulamasından dört ila altı saat sonra doruk plazma seviyesine ulaşılır. Silymarin temel olarak safra yolu ile atılır fakat böbrekler aracılığı ile de bir miktar klirens sağlanır. Silymarin'in klirens yarı ömrü 6 ila 8 saat arasında değişebilmektedir (Schandalik ve diğerleri 1992; Tyler, 1994).

2.2.4.2. Silymarin'in Fizikokimyasal Özellikleri

Silybum marianum tohumlarının ekstrakte edilmesi sonucu sabit yağların izolasyonu ile silymarin elde edilir. Bu bitkinin tohumları yağ asidi bileşimi açısından zengindir. İçeriğinde yer alan sabit yağların konsantrasyonu yaklaşık olarak %17-31 arasında değişmektedir ve şu sıralamaya benzer yağ asidi bileşimine sahiptir; linoleik asit > oleik asit > palmitik asit > stearik asit (Růžicková ve diğerleri 2011). Deve dikenini bitkisinin tohumlarının çok düşük nem içeriğine sahip olduğu (4.24-4.72) yapılan araştırmalarda belirlenmiştir. Tablo 1'de *Silybum marianum* tohumlarının yağının fizikokimyasal özellikleri açıklanmıştır (Goli ve diğerleri 2008). Burada *Silybum marianum*'un tıbbi açıdan önemli olan yağ ve yağ asitleri bakımından zengin olduğu belirtilmiştir. Bu tohumlar yemeklik yağ ve protein olarak da kullanılabilir (I. Khan ve diğerleri 2007).

Tablo 1. *Silybum marianum*'un fizikokimyasal özellikleri

Özellikleri	Değer (%)
Sabunlaşma değeri	180.9
Ester değeri	193.9–195
Asit değeri	1.82
İyot değeri	109.57
Peroksit değeri	14.97–17.37
Serbest yağ asidi değeri	16.62–19.22
Kırılma indisi	1.452
Renk/optik yoğunluk	0.3413
Anisidin değeri	1.8979
Klorofil içeriği	0,55

2.2.4.3. Silymarin'in Antikanser Aktiviteleri

Farklı hücresel değişiklikler yardımı ile SM'in diğer faydalarının yanı sıra fibröz, inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz ve ilaç taşıyıcılarının düzenlenmesi ile alakalı olarak yararlı etkileri olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Federico ve diğerleri 2017). SM'in antikanserojenik etkisi ile ilgili olarak hayvanlarda ve insanlarda yapılan in vitro çalışmalardan, hepatokarsinomda SM mekanizmalarının, antioksidan aktiviteleri vasıtası ile oksidatif stres tarafından indüklenmiş reaktif türlerin rahatlatılmasını ve prostoglandini modüle ederek sürekli olarak hepatik inflamasyonun baskılanmasını sağladığı görülmüştür. SM'in antitümör etkilerinin kaynağı, anormal hücre proliferasyonunun inhibisyonu, içsel ve dışsal mitokondriyal yollarındaki girişim ve hücre döngüsü bozulması yolu ile apoptozun indüklenmesi olabilir (Mastron ve diğerleri 2015).

Silybin ve SM'in karaciğer, cilt, serviks, akciğer, meme, prostat, mesane ve böbrek ağız kanseri kanserleri dahil birçok in vitro ve hayvan kanseri çalışmalarında görüldüğü üzere etkili antineoplastik bileşikler oldukları rapor edilmiştir (C. Agarwal ve diğerleri 2007; Deep ve Agarwal, 2007; Fehér ve Lengyel, 2012; Khorsandi ve diğerleri 2017; Ramasamy ve Agarwal, 2008; Surai, 2015; Tyagi ve diğerleri 2007; Won ve diğerleri 2018). Bu çalışmalar sonucunda SM'in sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin p21, p15 ve p27 olarak indüklenmesi yolu ile G1/S fazında hücre döngüsünü durdurabildiği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak SM, proapoptotik protein Bax'ı yukarı regüle eder, anti-apoptotik protein Bcl-2'yi aşağı regüle eder ve hücre kinazlarını (PKC, AKT ve MAPR) ve örneğin NF-κB gibi inflamatuvar transkripsiyon faktörlerini inhibe eder. Bunun yanı sıra ERK1/2 ve STAT3 sinyal yollarının baskılanması ile SMN, hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, onkogenezi ve iNOS gen ekspresyonunu inhibe edebilir ve bundan başka malign hücrelerde kaspaz aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümünü indükleyebilir (Agarwal ve diğerleri 2007; Gharagozloo ve diğerleri 2013). Bu sebeple SM'in NF-κB'ye bağlı gen ekspresyonunun baskılanması; NF-κB'nin TNFα ile indüklenen aktivasyonunun inhibisyonu ve STAT3 sinyalinin inhibisyonu yolu ile antikanserojenik etkilerine aracılık edebilir (Gharagozloo ve diğerleri 2013).

Çoğunlukla SM'in kemopreventif özelliği, bu özütün apoptoza dahil olan proteinlerinin ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin ekspresyonuna etki etmesi yolu ile apoptoz ve hücre sağ kalımı arasındaki dengesizliği değiştirip düzenlemesine sebep olan antimetastatik ve anti-inflamatuvar aktiviteleri ile ilgilidir (R. Agarwal ve diğerleri 2006; Ramasamy ve Agarwal, 2008). Yapılan çalışmalar, SM'in koruyucu etkilerinin, kemoterapi ve radyasyona bağlı meydana gelen toksisiteyi azaltma ve önleme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

Hayvan alışmaları ve in vitro çalışmalar, silybin ve SM'in gama radyasyonunun sebep olduğu DNA hasarını engellemek için güçlü bir radyoprotektif özelliğe sahip olduğunu belirtmiştir (Adhikari ve Arora, 2015; Adhikari ve diğerleri 2013; Oufi ve Al-Shawi, 2014). Bu sebeple SM, gama radyasyonunun sebep olduğu hücresel hasarın muhtemel etkilerine karşı deney hayvanlarından alınan normal spermatoisitlerin korunmasında tamamlayıcı tıpta umut verici bir radyoprotektif bitkisel ajan olarak görülebilir (Fatehi ve diğerleri 2018).

2.2.4.4. Silymarin'in Dozajı ve Toksisitesi

Silybum marianum, genel olarak kapsüllenmiş formda homojen yapılı bir ekstrakt (%70-80 silymarin) olarak verilmektedir. Yetişkinler için karakteristik dozu günde 3 kez 100-300 mg'dır. Hem insan hem de hayvan çalışmalarında silymarin'in herhangi bir toksik özelliği görülmemiştir. Yüksek dozlarda (>1500 mg/gün), artan safra akışı ve sekresyonu sebebi ile mşhil etkisi görülme olasılığı vardır. Hafif alerjik reaksiyonlar görülmüştür ancak bunlar ciddi alerjik reaksiyonlar değildir (Porwal ve diğerleri 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Kararı

Yapılmış olan bu deneysel çalışma ve içerisinde yer alan deneysel müdahalelerde, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun (ADÜ-HADYEK) 64583101/2019/122 sayılı ve 28.11.2019 tarihine ait kararı ile etik yönden herhangi bir sakınca olmadığı onaylanmıştır (EK1).

3.2. Deneysel Hayvanları

Bu çalışmada, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilmiş olan ve ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen 50 tane Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Deneysel süresince bütün sıçanlar %59 bağıl nem ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sirkadyen ritimde, 24°C sıcaklıkta tutuldu. Deneysel süresince sıçanlar standart pellet yem ile ad libitum beslendi, içme suyu olarak ise serbest erişimi sağlanan şehir şebeke suyu verildi.

3.3. Deneysel Tasarımı

Deneysel de kullanılan sıçanlar, Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda iki hafta boyunca adaptasyon sürecine tabi tutulmuştur. Hayvanlar rastgele örnekleme yöntemi kullanılarak seçildi ve her grupta 10 erkek sıçan bulunacak şekilde 5 gruba ayrıldılar. Uygulamış olduğumuz sisplatin son derece toksik bir madde olduğundan dolayı çalışmanın son gününe kadar 3 adet denek kaybı olmuştur. Silymarin günlük hayattaki kullanım şekline uygun olarak tablet formunda eczaneden temin edilmiş, iyice ezilerek toz haline getirilmiş ve çeşme suyu ile sulandırılarak oral gavaj yolu ile hayvanlara verilmiştir.

3.3.1. Deneysel Grupları

Çalışmada kullanılan 300-350 gr ağırlığındaki 50 Wistar albino sıçan, 5 gruba ayrıldı ve her grupta 10'ar hayvan yer aldı. Deneysel grupları şu şekilde belirlendi;

CON (10): Kontrol grubu olarak belirlenen hayvanlar bu gruba alındı ve bu grupta yer alan sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmayarak sağlıklı hayvan grubu olarak belirlendi.

SM200 (10): Güvenlik grubu-yüksek doz antioksidan grubu olarak değerlendirilen ve bu grupta yer alan hayvanlara 0.günden itibaren 3 gün boyunca 200mg/kg/gün dozda silymarin, oral gavaj yolu ile verildi. Silymarin, 12 saatte bir olmak üzere günde 2 kez 100mg/kg/gün şeklinde verildi.

CIS (10): Sisplatin grubu; bu gruptaki hayvanlara intraperitoneal olacak şekilde 7mg/kg/gün doz sisplatin uygulandı ve bu sıçanlar sisplatin uygulamasından 72 saat sonra ketamin-ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildiler.

CIS+50SM (10): Düşük doz tedavi grubu; bu gruptaki hayvanlara 0. günde 25mg/kg/gün silymarin oral gavaj yoluyla verildi ve bu işlemden 2 saat sonra 7 mg/kg/gün doz sisplatin intraperitoneal olarak uygulandı. İlk doz silymarin verilmişinden 12 saat sonra tekrar 25 mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verildi. Toplamda 3 gün boyunca günde 2 kez olmak üzere (12 saatte bir), her bir seferde 50 mg/kg/gün silymarin oral gavaj yolu ile verilmeye devam edildi. Tedavinin 3. gününde sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildiler.

CIS+200SM (10): Yüksek doz tedavi grubu; bu gruptaki hayvanlara 0. günde 100 mg/kg/gün dozda silymarin oral gavaj yolu ile verildi ve 2 saat sonra 7 mg/kg/gün doz sisplatin intraperitoneal olarak uygulandı. İlk doz silymarin uygulamasından 12 saat sonra tekrar 100 mg/kg/gün doz silymarin oral gavaj yolu ile verildi. Toplam 3 gün boyunca günde 2 kez olmak üzere (12 saatte bir) tek bir seferde 100 mg/kg/gün doz silymarin, toplamda 200 mg/kg/gün doz silymarin oral gavaj yolu ile verilmeye devam edildi ve tedavinin 3. gününde hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildiler.

Sıçanlar, 50 mg/kg dozda ketamine (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg dozda xylazine (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Almanya) anestezisi altında sakrifiye edildikten sonra intrakardiyak yoldan biyokimyasal incelemeler için gerekli miktarda kan alınıp biyokimya tüplerine konuldu ve biyokimya kitlerinde çalışabilmek için santrifüj edildi. Daha sonra hızlıca testis ve epididymis dokuları çıkartıldı. Sağ testisler histolojik inceleme için Bouin solüsyonuna alındı sol testisler ise biyokimyasal incelemeler için -20°C'ye alındı.



Resim 1. Deney gruplarının oluşturulması.

3.3.2. Sisplatin ve Silymarin'in Hazırlanması

Enjeksiyon yapılacağı günlerde sıçanlar tartıldı ve silymarin her seferinde taze olarak hazırlandı. Sisplatin, yaygın olarak kullanılan tıbbi formda (Cipintu 25 Mg/25 Ml Infuzyon İçin Konsantre Çözelti, Koçsel İlaç San. ve Tic. A.Ş.) hazır olarak alındı ve her bir denek için 7 mg/kg/gün doz olacak şekilde i.p. olarak uygulandı. Silymarin, denek başına toplamda gruplarına göre 50 mg/kg/gün ve 200 mg/kg/gün doz olacak şekilde 3 gün boyunca her gün günde 2 kez sabah ve akşam olmak üzere oral gavaj yolu ile verildi. Silymarin, günlük hayatta kullanılan ticari tablet formunda (Solgar Milk Thistle, 100 Mg) alındı ve toz haline getirilerek içme suyu ile sulandırıldı ve oral gavaj yolu ile hayvanlara verildi.



Resim 2. Ratlarda oral gavaj uygulanması.

3.3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deney başlangıcında ilaç doz ayarlamaları yapılabilmesi için hayvan ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi.

3.3.4. Bouin Solüsyonunun Hazırlanışı

Testis dokularının fikse edilmesi için kullanılacak olan Bouin fiksatifi aşağıda açıklandığı üzere hazırlandı;

1. Glasiyal asetik asit, 5 ml
2. Doymuş pikrik asit çözeltisi (%1), 75 ml
3. Formaldehit (%40), 25 ml

Doymuş pikrik asit çözeltisi (Sigma Aldrich) içine ilk olarak formaldehit (Sigma-Aldrich) ve daha sonra bunların üzerine yavaşça glasiyal asetik asit (Sigma-Aldrich) eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan bu fiksatifin dokuda meydana getireceği sarılığı önlemek amacı ile %70'lik alkolde çözülmüş lityum karbonat solüsyonu içerisinde dokular iki gün bekletildi (Dey, 2018).

3.3.5. Lityum Karbonatlı Etil Alkol Solüsyonunun Hazırlanışı

1 gr Lityum Karbonat tartıldı ve 100 ml kadar distile su içinde çözünmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra bu çözelti içerisinde 30 ml kadar alındı ve üzerine %100'lik etil alkolden 70 ml kadar eklenerek 100 ml'lik solüsyon hazır hale getirildi.

3.3.6. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması

Silymarin verilen sıçanlara son gavajdan 24 saat sonra ketamine 50 mg/kg+10 mg/kg xylazine anestezisi yapıldı ve servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildiler. Biyokimyasal analizler için alınmış olan kan örnekleri Jelli 5 ml Biyokimya tüplerine konuldu.



Resim 3. Ratların sakrifiye edilmesi ve ardından intrakardiyak kan alımı.

Batın bölgesi açıldı ve testisler, epididymisler ile birlikte çıkartıldı. Her bir sıçanın sağ ve sol testisleri, epididymislerinden ayrıldıktan sonra hasas teraziye konularak ayrı ayrı tartıldı ve kaydedildi. Sağ tarafta yer alan epididymisler testislerden ayrıldıktan sonra %9'luk, 2 ml serum fizyolojik solüsyon bulunan petri kaplarına konuldu. Fiksatif solüsyonunun dokuya daha iyi etki edebilmesi için tüm testislerin kapsüllerine enjektör ucu yardımı ile her yerden delikler açıldı. Sol testisler biyokimyasal analizler için -80°C 'ye konularak muhafaza edildi. Testis çapları (enine ve uzunlamasına) (± 0.05 mm) hassas bir kumpas (Central Tools (CEN6425A) Elektronik Dijital Kumpas) aracılığı ile histolojik incelemeler için önceden fikse edilmemiş testislerde ölçüldü.



Resim 4. Sıçan testislerinin uzunluk ve ağırlık ölçümleri.

Sağ ve sol testislerin ağırlıklarının toplamı ile o hayvana ait vücut ağırlığının ölçümü alındı ve aşağıda belirtilen formül kullanılarak testis ağırlık indeksi (TAİ) değerleri saptandı (Mutlu, 2013);

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

Sıçanların sakrifiye edilmeleri, kan ve doku örneklerinin alınması ADÜ Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Histopatolojik değerlendirmeler için ihtiyaç duyulan tüm araç, gereç ve cihazlar ADÜ Anatomi ve Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarları'ndan ve ADÜ Tarbiyomer (Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi)'den temin edildi. Biyokimyasal analizler ADÜ Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.3.7. Epididymis Numunelerinin Değerlendirilmesi

Bütün epididymis numunelerinin değerlendirilme protokolleri, sıçanların sakrifiye edildiği gün gerçekleştirildi. Petri kapları içerisine 400 µl PBS (Phosphate-Buffered Saline) solüsyonu konuldu ve üzerini kapatacak miktarda likit parafin (10x1000 µl) ve epididymisler bu droplet içerisine yerleştirilerek üzerlerine birkaç kesi atıldı. Spermiumların dış ortama çıkabilmesi için petri kapları ısıtmalı tabla üzerinde 37°C'de 4 dk boyunca bekletildi (Retana-Márquez ve diğerleri 2016; Vendramini ve diğerleri 2010). Yapılan tüm analizler bu droplet içerisinden alınan örneklerle gerçekleştirildi.



Resim 5. Epididymis'ten spermium numunelerinin elde edilmesi için droplet hazırlanışı.

3.3.7.1. 1 ml Spermium Numunesinde Spermium Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Spermium sayımı için Thoma lamı kullanıldı. Droplet içerisinde 1 damla (10 µl) spermium örneği 990 µl distile su ile bir eppendorf tüpü içerisinde karıştırıldı ve seyreltildi. Bu karışımdan yaklaşık 4 µl lamın kenarlarından kuyucuklara dolduruldu ve üzerine lamel kapatıldı. 10'luk büyütmede 5 kare sayıldı. Sayımda kareler içerisinde yer alan spermium baş konumları göz önünde bulunduruldu. 1 ml'deki toplam spermium sayısını hesaplayabilmek için 5 karedeki toplam spermium aşağıdaki formül ile hesaplandı (Christensen ve diğerleri 2005);

$$\frac{\text{Sayılan spermatozoon sayısı}}{\text{Sayılan kare sayısı} \times \text{kare hacmi} \times \text{sulandırma oranı}} \times 1000 = 1 \text{ ml'de ki sperm sayısı}$$

3.3.7.2. Spermium Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Spermium morfolojisinin değerlendirilebilmesi için eosin-nigrosin boyama setinden yararlanıldı. Bir damla spermium numunesi lam üzerine konulup üzerine eşit miktarda boya damlatılarak yayma preparat hazırlandı ve hava ile kuruması sağlandı. Boyama prosedürleri boyama kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu örnekler daha sonra mikroskopta X40'luk büyütme kullanılarak incelendi. Her bir preparatta 200 spermium seçilerek 3 gruba ayrıldı ve değerlendirildi. Gruplar;

- Belirgin veya hafif eğriliği olanlar dahil baş şekli,
- Orta kısımda yer alan defektler,
- Katlanmış, kısa ya da kırık kuyrukları da kapsayan kuyruk defektleri.

Yapılan bu değerlendirme sonucunda normal ve anormal hücre sayıları hesaplandı (Ok ve diğerleri 2008).

3.3.8. Işık Mikroskobu İncelemeleri İçin Dokuların Histolojik Takiplerinin Yapılması

Dokular Bouin fiksatifine alındı ve bu fiksatifte en az 24 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra dokular ince bir sargı bezine alındı ve yanına hangi hayvana ait olduğunu belirten küçük bir etiket yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan dokular elde manuel olarak fikse edildi. Daha sonra dokular fiksasyonda bulunan pikrik asitten kaynaklanan sarı rengin giderilebilmesi için 48 saat boyunca, lityum karbonatlı etil alkol solüsyonunda bekletildi. Bu işlemden sonra dokular, parafin bloklara gömüldüler.

Tablo 2. Testis doku takibi protokolü

Kullanılan kimyasal maddeler	Uygulama süresi
%70 Alkol	48 saat
%80 Alkol	1,5 saat
%90 Alkol	1,5 saat
%96 Alkol	1,5 saat
%100 Alkol	1,5 saat
%100 Alkol	1 saat
Ksilol-alkol	30 dk
Ksilen I	1 saat
Ksilen II	1 saat
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat 20 dk
Parafin III	1 saat 40 dk

3.3.9. Doku Kesitlerinin Alınması ve Boyanması

Doku kesitleri ADÜ Tarbiyomer’de yer alan mikrotom (Thermo Manuel Mikrotom Cihazı-Microm HM 325) yardımı ile alındı. Dokuya ulaşana kadar öncelikle 20 µm kalınlığında kesitler alınarak trimleme dediğimiz işlem gerçekleştirildi. Trimleme sonucu dokuya ulaşıldığı anlaşılınca 5 µm’lik daha ince kesitler alınmaya başlandı. Alınan bu kesitler 40°C’de benmari içerisinde yer alan sıcak suda alınan kesitin parafininin kırışıklıkları açılana kadar bekletildikten sonra lam üzerine alındılar.

Testisin genel morfolojisini incelemek için H&E (Hematoksilen ve Eozin), bağ dokusunun incelenebilmesi için Masson’s trikrom ve nötr mukopolisakkaritler için Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaları kullanıldı.

3.3.10. Hematoksilen – Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson’s Trikrom Boyama Yöntemleri

Lamlar etüvden çıkartıldıktan sonra PAS ve Masson’s trikrom boyamalar için, boya kitlerine ait protokoller izlendi. Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama için Tablo 3’ de yer alan

işlemler uygulandı. Masson's trikrom, H&E ve PAS ile boyanmış kesitler ADÜ Tarbiyomer'de yer alan dijital fotoğraf makinesi ekli ışık mikroskobu (Olympus CX23/33/43 BX43/46/53/63 Upright Mikroskop Sistemi) ile incelendi ve buradan elde edilen görüntüler dijital ortama transfer edildi. Elde edilen kesitler randomize kör olarak ele alınıp incelendi ve LabSense programı kullanılarak morfolojik ölçümler ve analizler gerçekleştirildi.

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

Kullanılan kimyasallar	Süresi
Ksilol	10 dk
Ksilol	10 dk
%100'lük alkol	3dk
%96'lık alkol	3dk
%80'lik alkol	3 dk
%70'lik alkol	3 dk
Distile su	5 sn
Hematoksilen	12-13 dk
Çeşme suyu	25 dk
Eozin	2 dk
%96'lik alkol	3 dk
%96'lik alkol	3 dk
%100'lik alkol	3dk
%100'lik alkol	3dk
%100'lik alkol	3dk
Ksilol	5dk
Ksilol	5dk
Ksilol	5dk
Entellan ile kapama	-

Tablo 4. Masson's trikrom boyama protokolü

Kullanılan kimyasallar	Süresi
Distile suda bekletme	10 dk
Hematoksilen	3 dk
Distile suda durulama	15 saniye
Akar suda bekletme (renk değişimi)	4 dk
Distile suda yıkama	10 saniye
Trikrom solüsyonu	20 dk
%0,2'lik asetik asit	30 saniye
%95'lik alkol	2 dk
%100'lük alkol	2 dk
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk
Entellan ile kapama	-

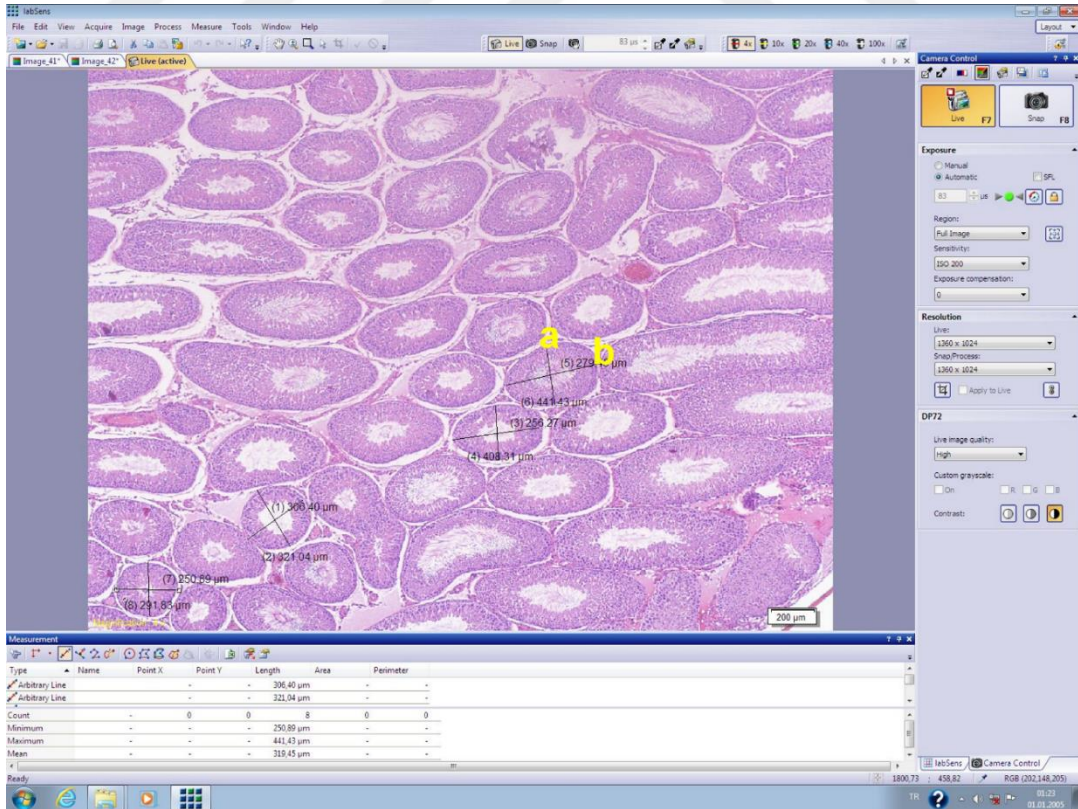
Tablo 5. Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü

Kullanılan kimyasallar	Süresi
Periodik asit solüsyonu (damlatma)	10 dk
Distile su ile yıkama	10 saniye
Schiff Ajanı Hotchkiss/McManus (damlatma)	20 dk
Distile su ile yıkama	10 saniye
Potasyum metabisülfid solüsyonu (damlatma)	2 dk
Distile su ile yıkama	10 saniye
Fiksatif solüsyon (damlatma)	2 dk
Distile su ile yıkama	10 saniye
Mayer's hemalum (damlatma)	3 dk
Akar suda yıkama	5 dk
%96'lik alkol	5 dk

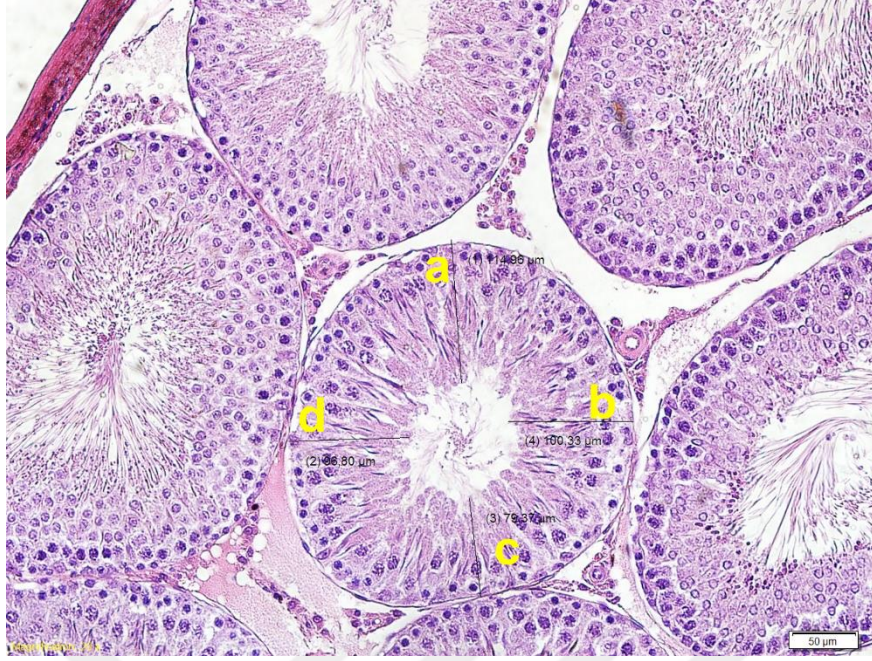
3.4. Histometrik analiz

Takibi yapılıp kesiti alınan dokuların mikro morfolojileri farklı parametreler saptanarak histometrik olarak incelemesi yapıldı. Belirlenen paramterelerin; tubuli seminiferi contorti çapı, germinal epitel yüksekliği, bazal tabaka kalınlığı, basal lamina kalınlığı, arter çapı, tunica albuginea kalınlığı, peritubuler atrofi varlığı, her bir testisten 10 kesit alınıp, her bir kesitten 30'ar ölçüm alınarak belirtildi. Kaç kesit alınması gerektiği ve kesit başına kaç kesit alınması gerektiğini belirlemek için One-Sample T-Test Power Analysis PASS 11 programı kullanılmıştır. Bunun için alfa değeri 0,05 alınmış ve çalışmamıza benzer bir çalışmanın (Nosseir ve diğerleri 2012) kontrol grubuna ait veriler değerlendirilerek saptanmıştır.

H&E ile boyanmış preparatlarda tubuli seminiferi contorti'lerin çaplarının ölçümü için her bir hayvandan (sağ testisinden) rastgele 10 alan seçildi (Batra ve diğerleri 2001). Her bir sıçana ait preparatta, yuvarlak veya yuvarlağa en yakın biçimde olan 30 adet tubuli seminiferi contorti profili seçildi ve çapları ölçüldü. Olympus CX23/33/43 BX43/46/53/63 Upright Mikroskop Sistemi ile bağlantılı LabSens programı ile alınan ölçümler x10'luk büyütmede µm cinsinden belirtildi.

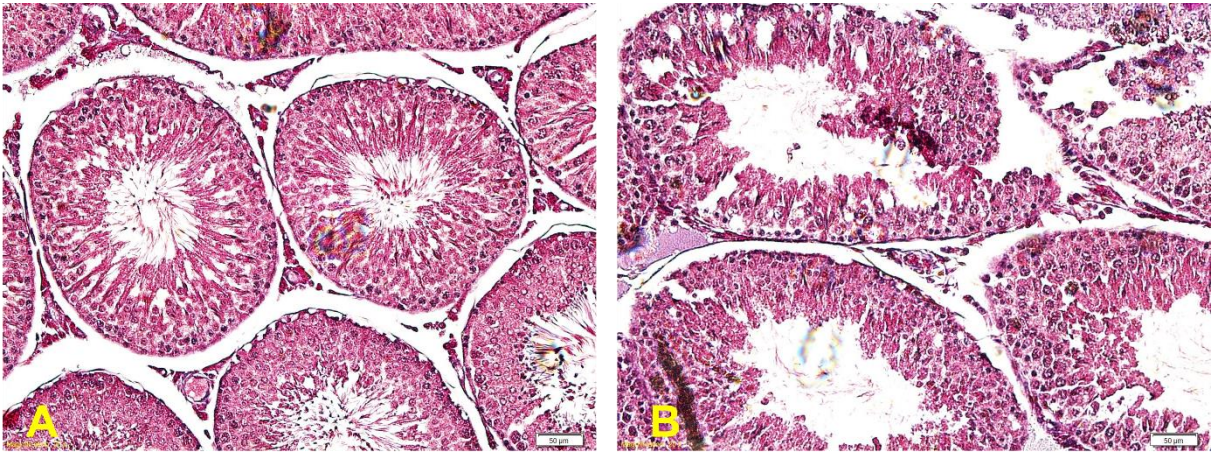


Resim 6. Bilgisayar ortamında tubuli seminiferi contorti çapı ölçümü ((a+b)/2= tubul çapı)



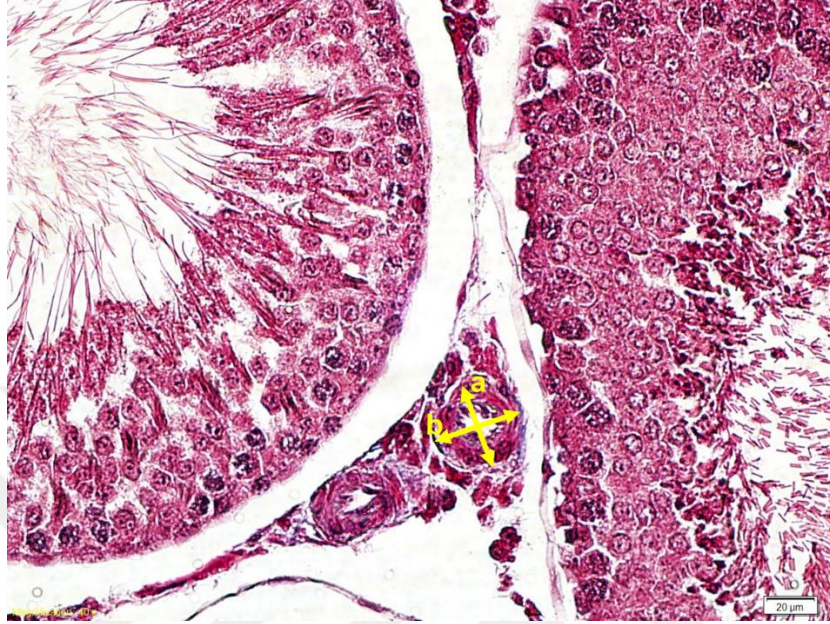
Resim 7. Bilgisayar ortamında germinal epitel yüksekliği ölçümü için kullanılan referans noktaları ((a+b+c+d)/4= germinal epitel yüksekliği).

Masson's trikrom boyalı preparatlarda peritubuler fibrozis veya atrofi varlığı, tubuli seminiferi contorti'leri çevreleyen kolajen birikiminin boyanmasının kalınlığına göre değerlendirildi. Peritubuler fibrozis veya atrofi; 0 (yok veya minimal) ile 1 (belirgin) arasında puanlandı (Diez-Caballero ve diğerleri 2006).

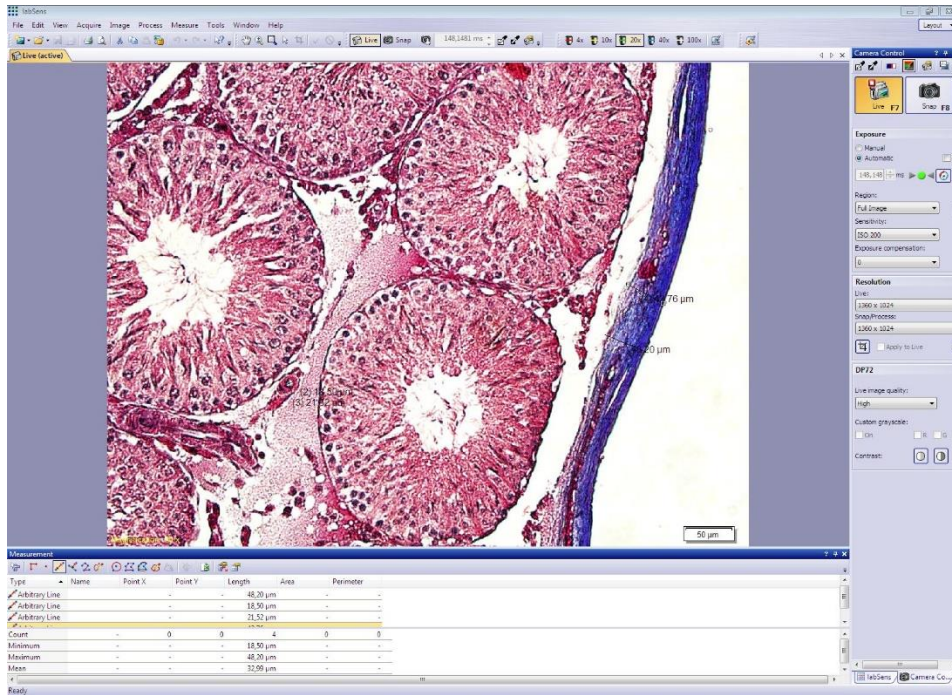


Resim 8. A) Kontrol grubu (CON) 20X 'lik büyütmede hasarsız tubuli seminiferi contorti'lerin görünümü. (B) Sisplatin hasar grubu (CIS) peritubuler fibrozis/atrofik tubul görünümü.

Masson's trikrom boyalı preparatlarda kan damarları daha iyi gözlemlendiği için kan damarı çap ölçümü de gerçekleştirildi. Tunica albuginea kalınlığı da ölçüldü ve kaydedildi (Nosseir ve diğerleri 2012).

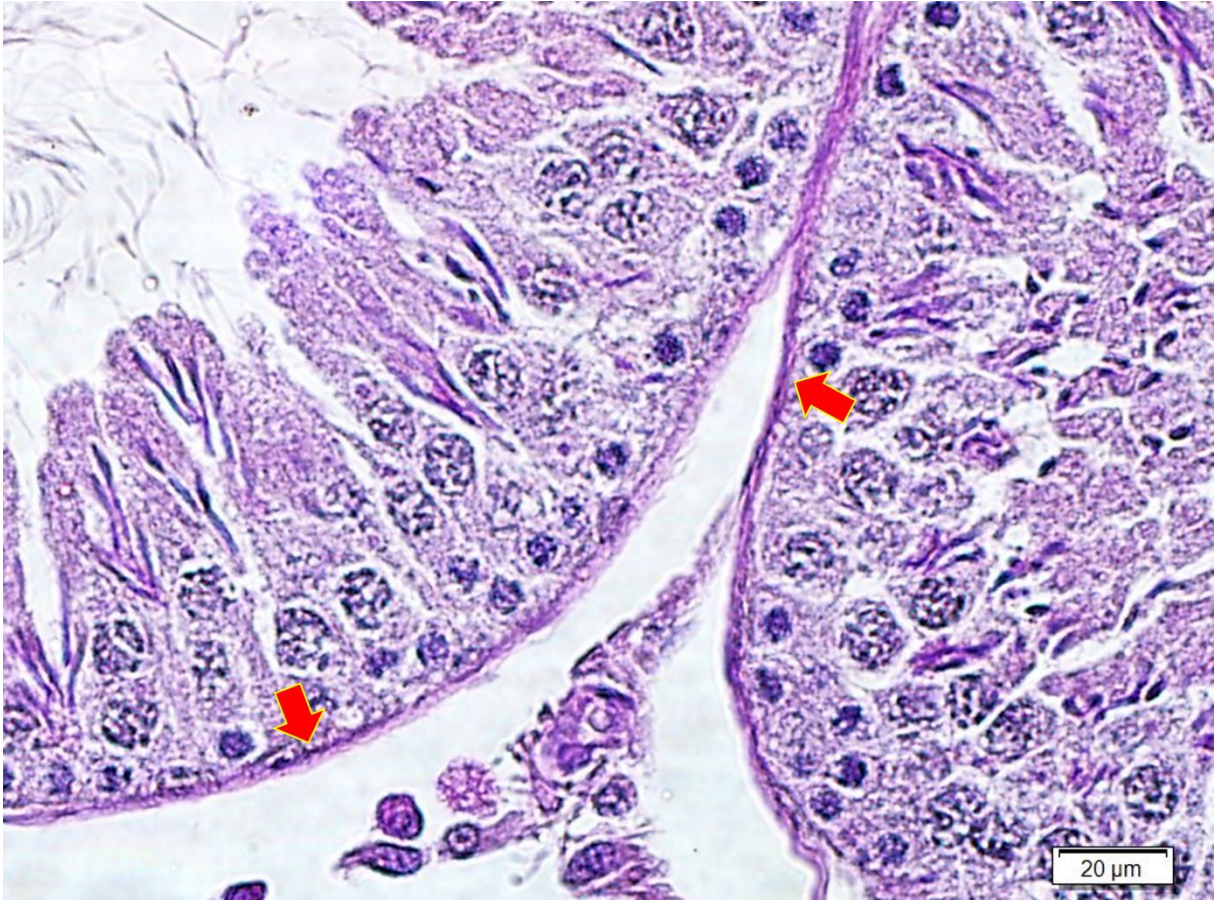


Resim 9. Masson's trikrom boyama ile 40X'lık büyütmede arter çapı ölçümü için kullanılan referans noktaları ($(a+b)/2$ = arter çapı).



Resim 10. Masson's trikrom boyama ile 20X'lik büyütmede tunica albuginea kalınlığı ölçümü.

Periodic Acid-Schiff (PAS) boyama ile bazal lamina yapısı incelenmiş ve kalınlığı ölçülerek gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır (Nosseir ve diğerleri 2012).



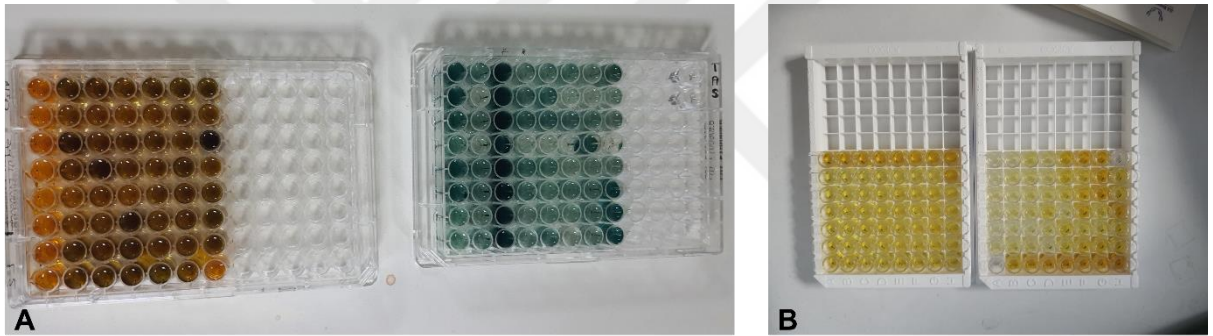
Resim 11. Periodic Acid-Schiff (PAS) boyama ile 40X'lık büyütmede bazal lamina görünümü (kırmızı ok ile gösterildi).

3. 5. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için ratlardan intrakardiyak kan alımı gerçekleştirildi ve numuneler, analizlerin hepsinin aynı anda yapılabilmesi için -80°C 'de bekletildi. Alınan serumlar ile total antioksidan seviyeleri (TAS) ve total oksidan seviyeleri (TOS) ile inhibin A ve inhibin B seviyeleri analiz edildi. Analizler için ELK Biotech ELISA kit for Human INHA (Inhibin A) - ELK7827 , ELK Biotech ELISA kit for Human INHB (Inhibin B) - ELK4893, Rel Assay Diagnostics I Total Oxidant Status Assay Kit, Rel Assay Diagnostics I Total Antioxidant Status Assay Kit kullanıldı. Analizler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.



Resim 12. ELISA analizleri için kullandığımız cihaz



Resim 13. (A)TAS, TOS, (B) inhibin A ve inhibin B kitleri görünümü.

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 20 programı ile yapıldı. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluk gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Gruplar, normal dağılım gösteren değişkenler bakımından Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), normal dağılım göstermeyen değişkenler bakımından ise Kruskal Wallis Analizi ile karşılaştırıldı. Normal dağılıma uygun olan nicel değişkenler arasındaki ilişki Pearson, normal dağılıma uygunluk göstermeyen nicel değişkenler arasındaki ilişki ise Spearman Korelasyon Analizi ile test edildi. Normal dağılan değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama±standart sapma, normal dağılmayan değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ise medyan (25.-75. Persantil) olarak verildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

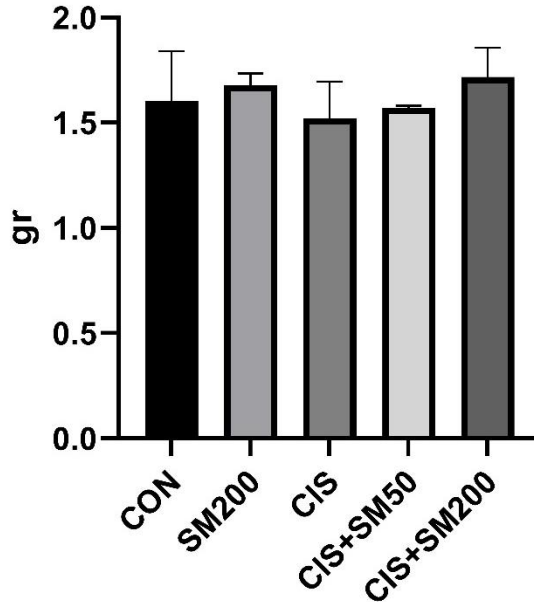
4.1. Sıçanların Testis ve Vücut Ağırlık Değerleri

Deney gruplarına ait testis ve vücut ağırlıkları ile testislere ait morfometrik ölçüm sonuçları aşağıdaki tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

Tablo 6. Deney hayvanlarına ait sağ testis ağırlıkları (gr).

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	1,040	1,450	1,200	1,540	1,510
Maksimum	1,920	2,010	1,750	1,610	1,890
Ortalama	1,602	1,679	1,520	1,571	1,717
Standart sapma	0,2372	0,1666	0,1758	0,02478	0,1388

Gruplar arasında istatistiksel açıdan sağ testis ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).

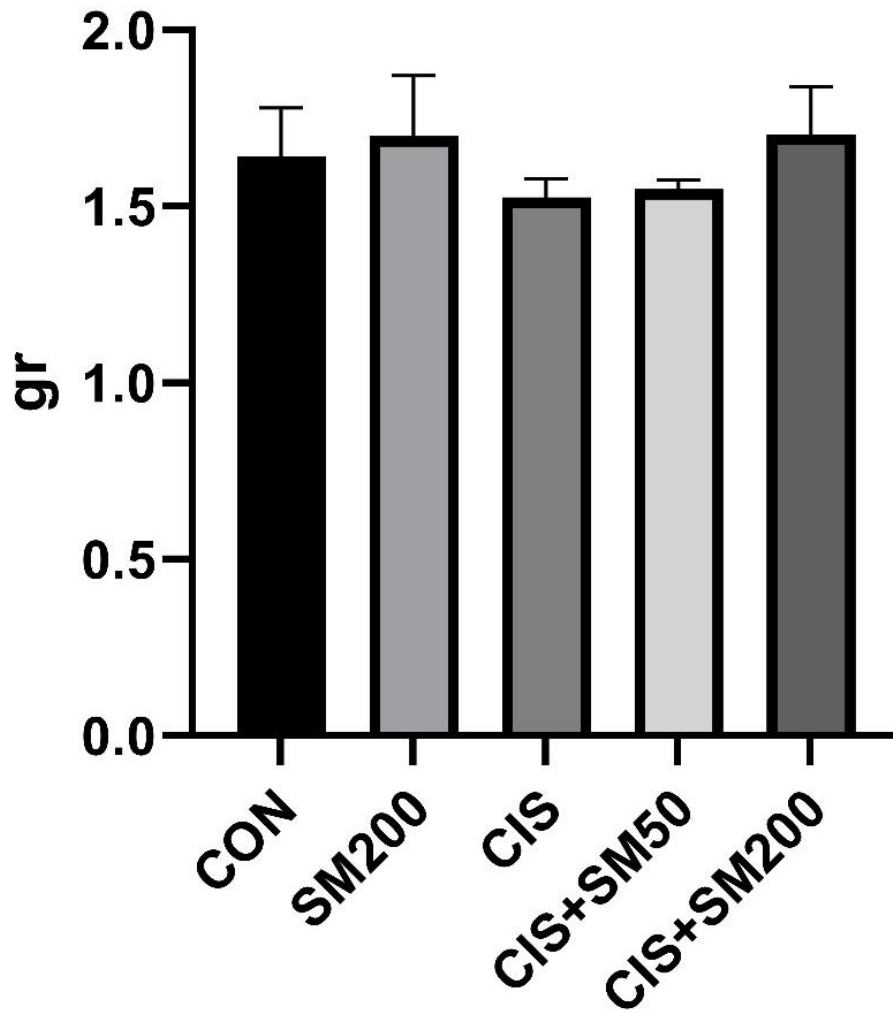


Şekil 15. Sağ testis ağırlıkları. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 7. Deney hayvanlarına ait sol testis ağırlıkları (gr).

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	1,480	1,480	1,340	1,380	1,500
Maksimum	1,910	2,020	1,740	1,640	1,930
Ortalama	1,642	1,699	1,526	1,549	1,704
Standart sapma	0,1379	0,1727	0,1439	0,07605	0,1353

Gruplar arasında istatistiksel açıdan sol testis ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).

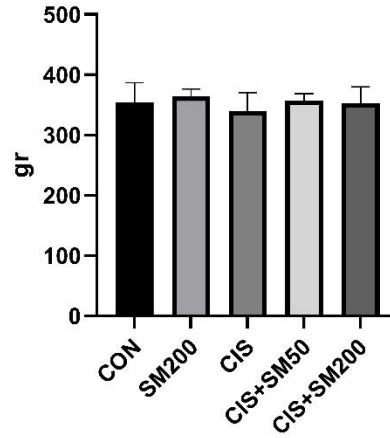


Şekil 16. Sol testis ağırlıkları. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 8. Deney gruplarında yer alan hayvanların başlangıç ağırlıkları (gr).

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	310	348	290	324	322
Maksimum	395	390	390	431	400
Ortalama	354,8	364	339,9	357,9	353,0
Standart sapma	32,21	12,64	30,56	32,93	26,80

Gruplar arasında hayvan ağırlıkları bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).

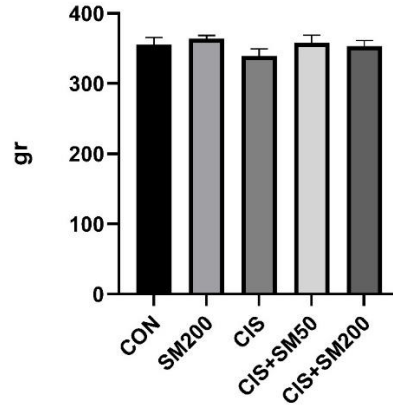


Şekil 17. Deney gruplarında yer alan hayvanların başlangıç ağırlıkları (gr). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 9. Deney gruplarında yer alan hayvanların son ağırlıkları (gr).

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	310,0	348,0	290,0	324,0	322,0
Maksimum	395,0	390,0	390,0	430,0	395,0
Ortalama	355,3	364,0	339,1	358,0	353,1
Standart sapma	32,36	13,14	30,91	32,50	25,97

Gruplar arasında hayvan ağırlıkları bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$)

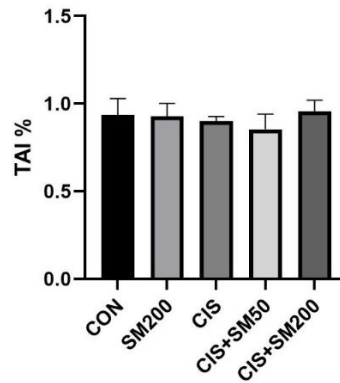


Şekil 18. Deney gruplarında yer alan hayvanların son ağırlıkları (gr). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 10. Testis ağırlık indeksi (TAİ: [(sağ+sol testis ağırlıkları toplamı)/vücut ağırlığı] \times 100)

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	0,7800	0,8000	0,8100	0,7300	0,8500
Maksimum	1,090	1,080	1,000	0,9500	1,060
Ortalama	0,9356	0,9278	0,9000	0,8544	0,9567
Standart sapma	0,09342	0,07396	0,06976	0,08589	0,06325

Gruplar arasında TAİ (testis ağırlık indeksi) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).

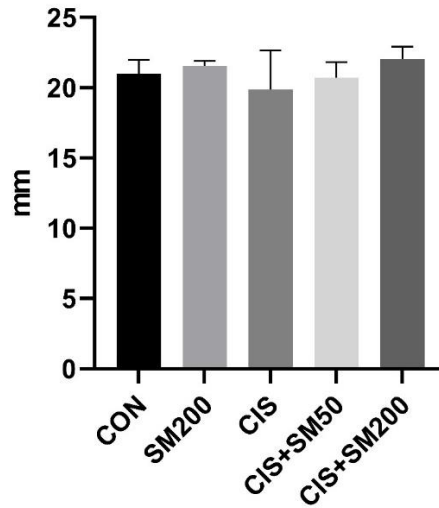


Şekil 19. Deney gruplarında yer alan hayvanların testis ağırlık indeksleri (TAİ). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 11. Sağ testis longitudinal çap (mm) ölçümleri

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	19,80	19,90	13,20	19,40	20,50
Maksimum	23,00	22,70	22,80	22,40	23,20
Ortalama	20,98	21,54	19,87	20,71	22,06
Standart sapma	1,016	1,109	2,816	1,116	0,8618

Gruplar arasında sağ testis longitudinal çap uzunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).

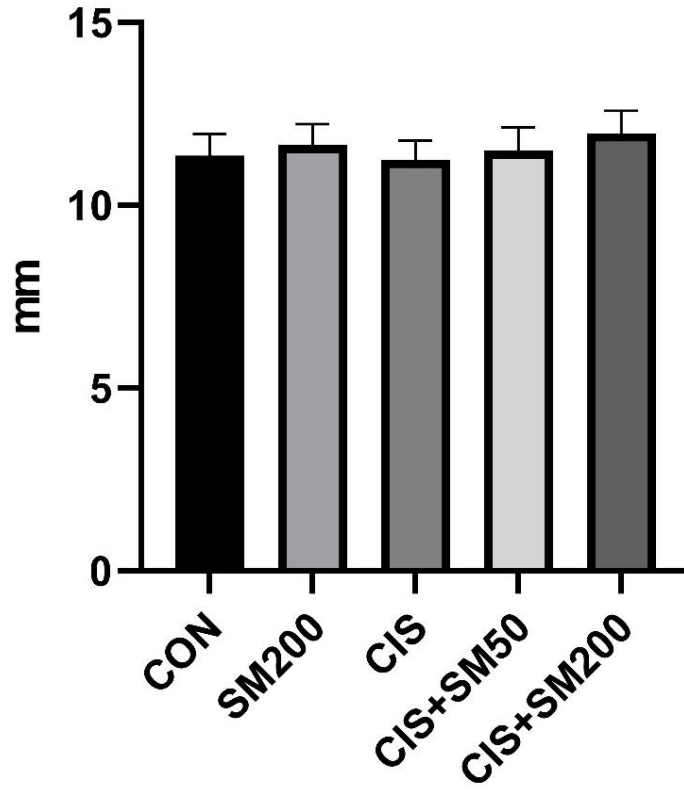


Şekil 20. Deney gruplarında yer alan hayvanların sağ testis longitudinal çap uzunlukları (mm). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 12. Sağ testis transvers çap (mm) ölçümleri

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	10,70	10,60	10,50	10,50	11,00
Maksimum	12,40	12,70	11,80	12,40	12,90
Ortalama	11,36	11,64	11,24	11,49	11,97
Standart sapma	0,5948	0,5725	0,5317	0,6373	0,6147

Gruplar arasında sağ testis transvers çap ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).

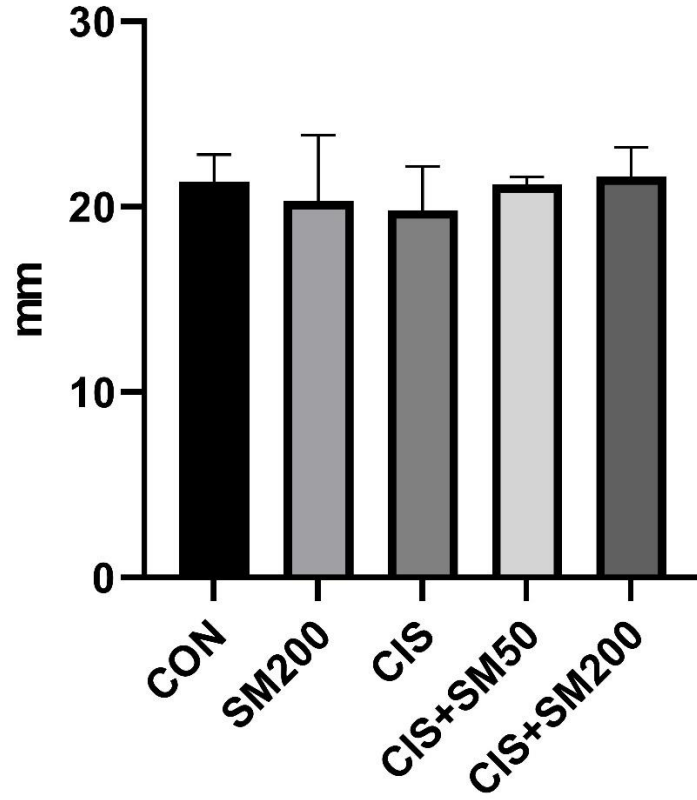


Şekil 21. Deney gruplarında yer alan hayvanların sağ testis transvers çap uzunlukları (mm). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 13. Sol testis longitudinal çap (mm) ölçümleri.

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	17,80	11,40	14,10	19,40	19,20
Maksimum	22,50	23,80	21,90	23,00	23,40
Ortalama	21,35	20,32	19,81	21,20	21,65
Standart sapma	1,468	3,546	2,371	1,269	1,574

Gruplar arasında sol testis longitudinal çap uzunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p > 0,005$).

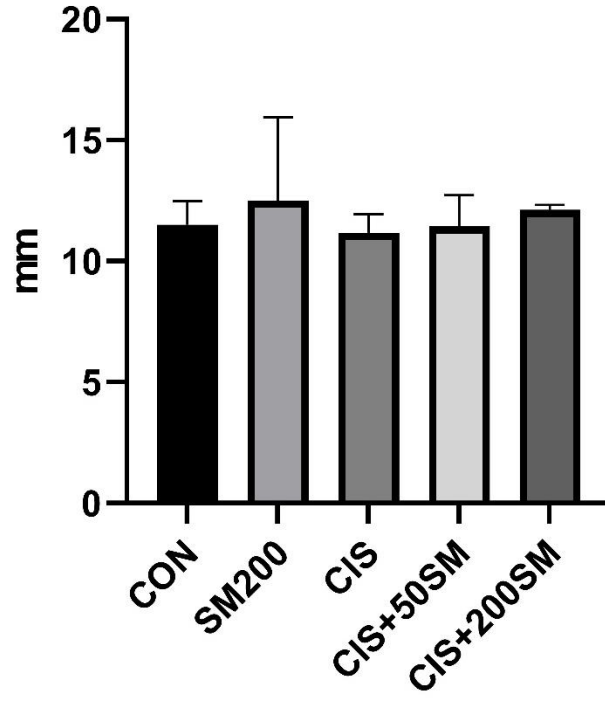


Şekil 22. Deney gruplarında yer alan hayvanların sol testis longitudinal çap uzunlukları (mm). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

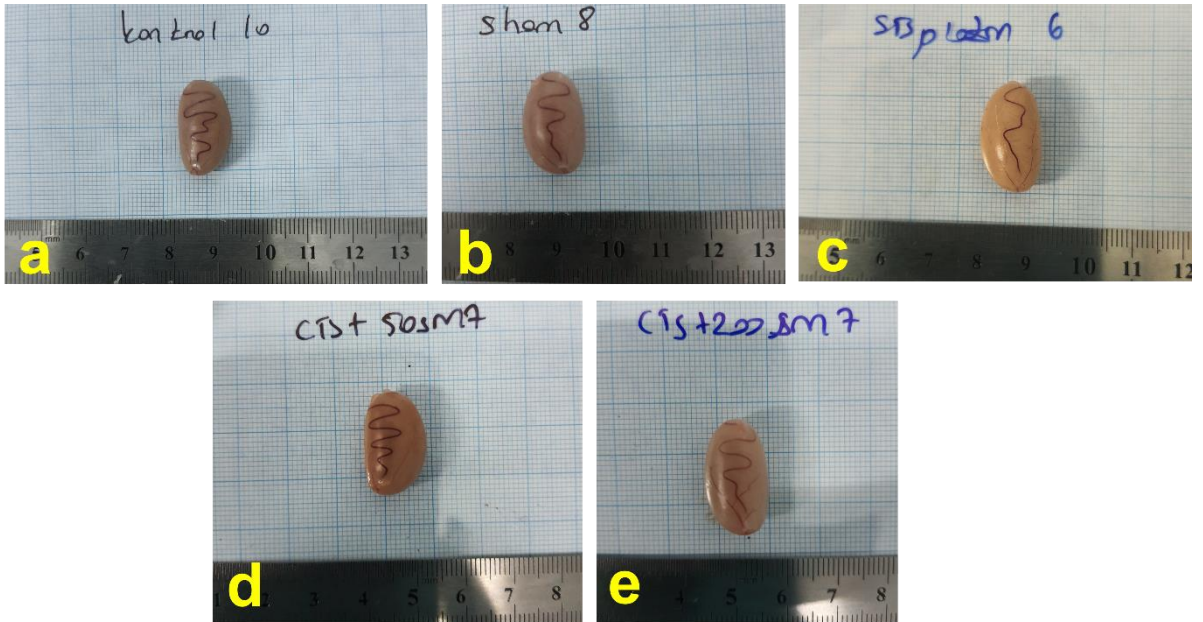
Tablo 14. Sol testis transvers çap (mm) ölçümleri

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	10,40	10,30	10,30	10,40	10,90
Maksimum	13,80	21,40	12,70	14,00	13,20
Ortalama	11,51	12,51	11,18	11,43	12,13
Standart sapma	0,9758	3,435	0,7686	1,286	0,6308

Gruplar arasında sol testis transvers çap uzunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p > 0,005$).



Şekil 23. Deney gruplarında yer alan hayvanların sol testis transvers çap uzunlukları (mm). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 14. Sıçan testislerinin morfolojik görünüşleri (a;CON, b;SM200, c;CIS, d;CIS+SM50, ve CIS+SM200 gruplarına ait testis görünüşleri)

4.2. Histometrik Ölçümlerin İstatistiksel Analizi

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen dokulara ait kesitler ışık mikroskopunda incelenmiş ve Labsense programı aracılığı ile ölçümler alındı. Ölçülen parametreler ‘ μm ’ cinsinden ifade edildi.

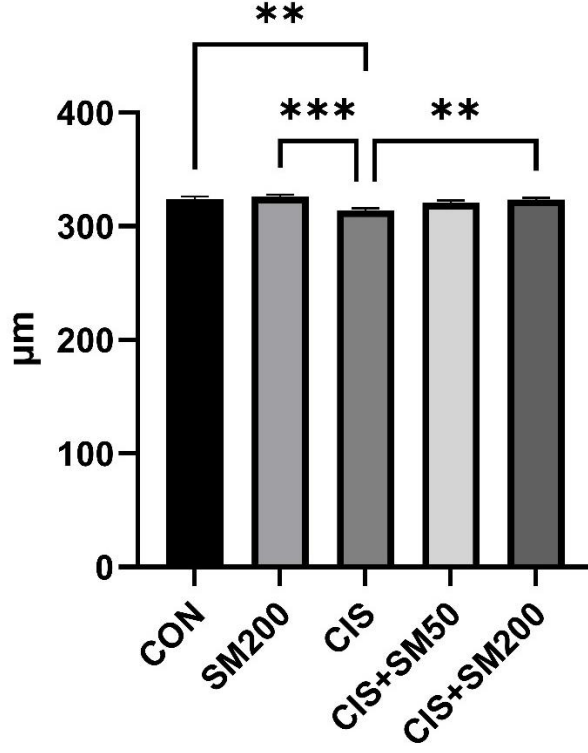
4.2.1. Tubuli Seminiferi Contorti Çapı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tubuli seminiferi contorti çaplarını ölçmek amacıyla her hayvandan rastgele 10’ar kesit seçildi ve bu kesitlerden her bir hayvan için 30’ar adet yuvarlak ya da yuvarlağa yakın şekilli tubul seçildi. Her bir tubulden 2 adet çap ölçümü yapıp bu iki ölçümün ortalaması alındı. Yapılan analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde gösterilmiştir.

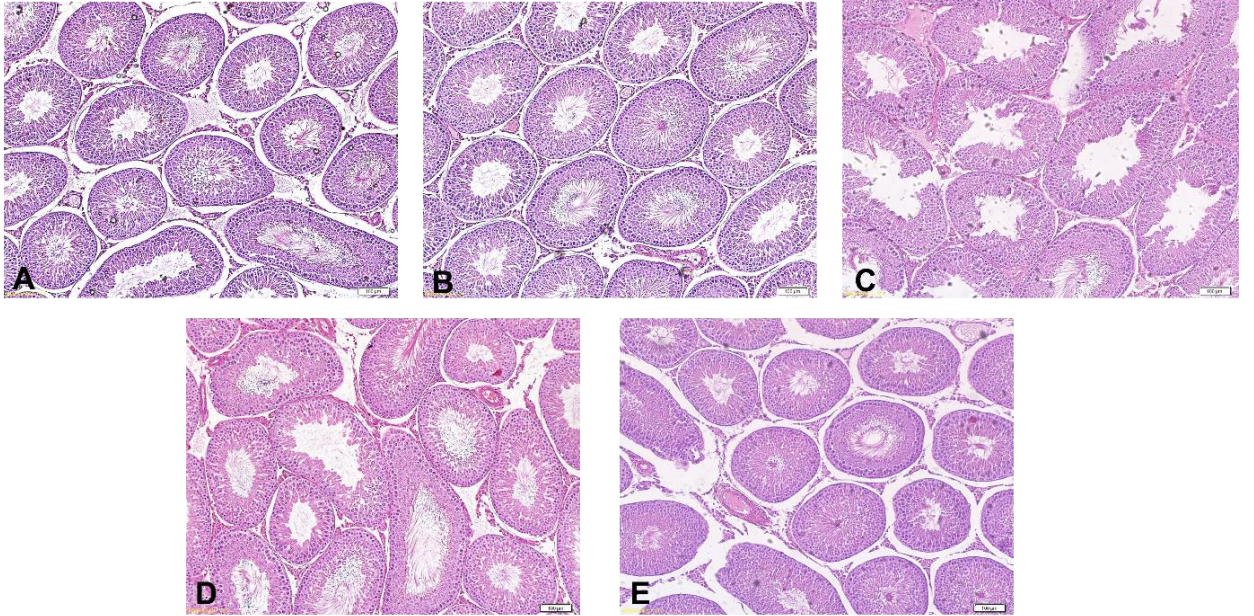
Tablo 15. Tubuli seminiferi contorti çap ölçümleri (μm).

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	137,6	252,7	245,1	232,9	251,5
Maksimum	440,6	398,3	399,8	425,0	422,1
Ortalama	323,9	326,0	314,2	320,7	323,6
Standart sapma	40,25	27,51	25,96	33,28	28,88

CON grubu ve CIS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p ; 0,0027). CON grubuna ait kesitlerde ölçülen tubul çapı sisplatin grubuna kıyasla daha büyüktür. SM200 ve CIS grupları da birbirleri ile istatistiksel açıdan farklı sonuçlar göstermiştir (p ; 0,0002). SM200 grubuna ait kesitlerde tubul çapı, CIS grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. CIS ve CIS+SM200 gruplarında da birbirlerinden anlamlı derecede farklı sonuçlar gözlenmiştir (p ; 0,0041). Yüksek doz tedavi grubu olan CIS+SM200 grubunda da tubul çapı, CIS grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 24. Deney gruplarında yer alan hayvanların tubuli seminiferi contorti çap uzunlukları (µm). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 15. Deney gruplarının x10'luk büyütmede, H&E boyamada tubuli seminiferi contorti yapılarının görünümü. (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları)

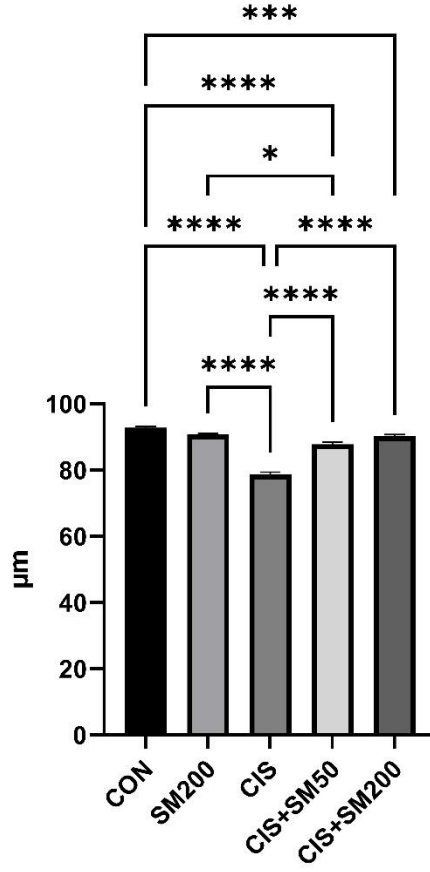
4.2.2. Germinal Epitel Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tubuli seminiferi contorti'lere ait germinal epitel kalınlıklarını ölçmek amacıyla her hayvandan rastgele 10'ar kesit seçildi ve bu kesitlerden her bir hayvan için 30'ar adet yuvarlak ya da yuvarlağa yakın şekilli tubul seçildi. Her bir tubulden 4 adet kalınlık ölçümü yapıp bu dört ölçümün ortalaması alındı. Yapılan analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde gösterilmiştir.

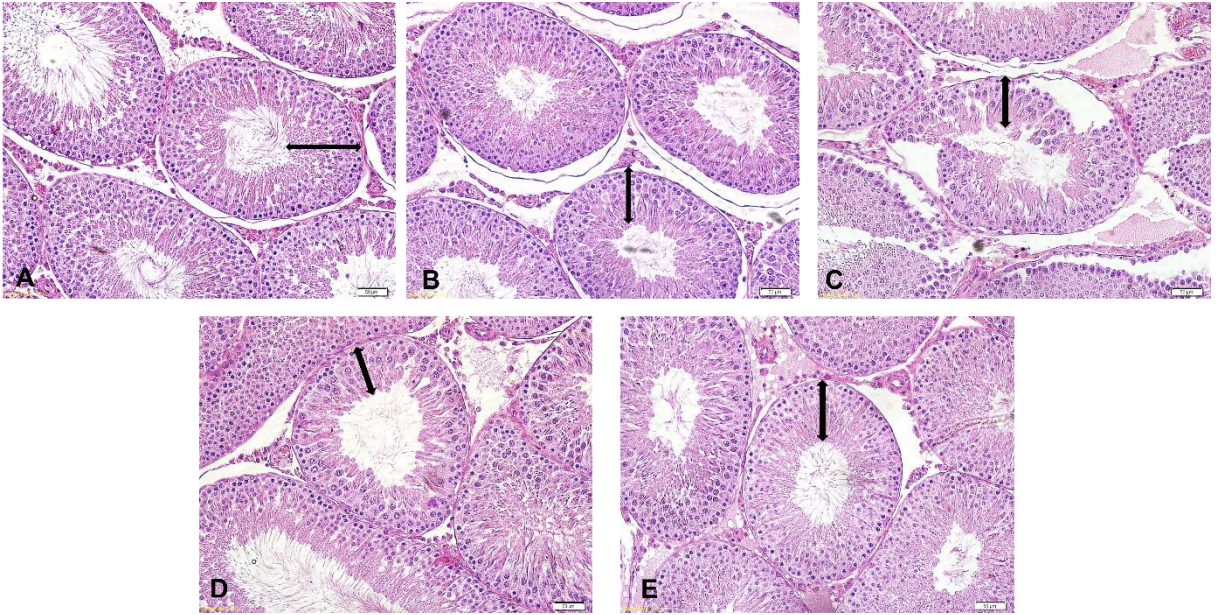
Tablo 16. Germinal epitel kalınlık ölçümleri (μm).

	CON	SM200	CIS	CIS+SM50	CIS+SM200
Minimum	56,14	69,00	46,84	59,29	67,95
Maksimum	117,0	99,89	102,4	122,1	117,4
Ortalama	92,78	90,82	78,72	87,81	90,21
Standart sapma	7,105	4,842	10,73	11,79	9,004

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,0611$). CON ve CIS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$). CIS grubuna ait kesitlerde germinal epitel kalınlığı normal gruba kıyasla oldukça düşük olarak gözlenmiştir. CON ve CIS+SM50 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,0001$). CON ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmüştür ($p=0,0007$). SM200 grubu ve CIS grubu arasında da önemli bir istatistiksel fark göze çarpmaktadır ($p<0,0001$). CIS grubuna ait kesitlerde germinal epitel kalınlığı SM200 grubuna kıyasla oldukça düşük düzeyde kalmıştır. SM200 ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel anlamda düşük düzeyde de olsa bir farklılık gözlenmiştir ($p=0,0116$). Buna kıyasla SM200 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,9999$). CIS ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,0001$). CIS ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel anlamda oldukça güçlü bir farklılık görülmüştür ($p<0,0001$). Bunun yanı sıra CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,1389$).



Şekil 25. Deney gruplarında yer alan hayvanların germinal epitel kalınlıkları (µm). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 16. Deney gruplarının x20'lik büyütmede, H&E boyamada germinal epitel yapıları ok ile gösterilmiştir. (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları)

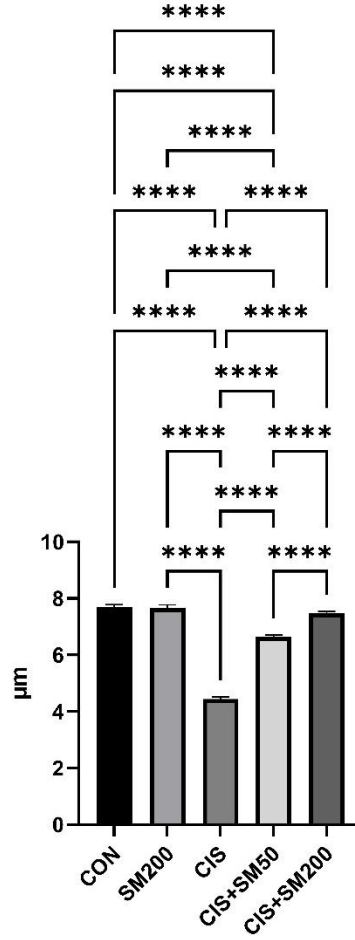
4.2.3. Bazal Tabaka Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tubuli seminiferi contorti'lere ait bazal tabaka (içerisinde lamina propria tabakası yer aldığı için bu parametre ölçülmüştür) kalınlıklarını ölçmek amacıyla tubul çapı ölçümü için kullanılan tubuller kullanılmıştır. Her hayvandan rastgele 10'ar kesit seçildi ve bu kesitlerden her bir hayvan için 30'ar adet yuvarlak ya da yuvarlağa yakın şekilli tubul seçildi. Her bir tubulden 4 adet bazal tabaka kalınlığı ölçümü yapıp bu dört ölçümün ortalaması alındı. Yapılan analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde gösterildi.

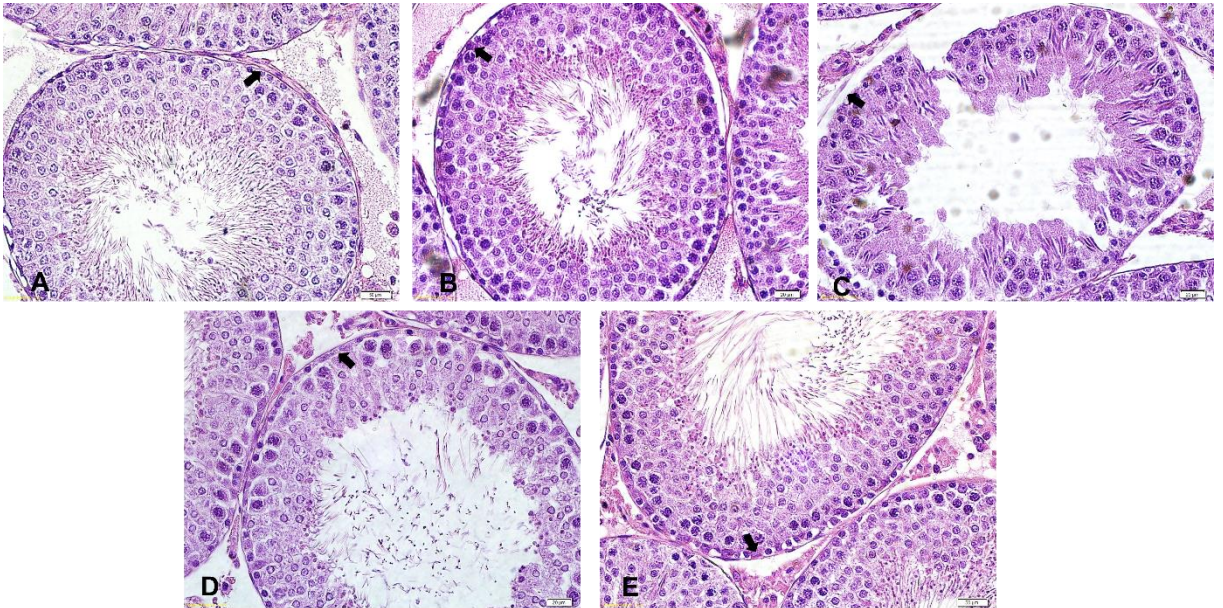
Tablo 17. Bazal tabaka kalınlığı ölçümleri (μm).

	CON	SM200	CIS	CIS+50SM	CIS+200SM
Minimum	4,807	5,057	2,186	4,702	4,559
Maksimum	14,85	12,60	7,741	9,309	11,70
Ortalama	7,739	7,661	4,440	6,655	7,477
Standart sapma	1,625	1,648	1,210	0,9188	1,173

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,005$). CON ve CIS grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p<0,0001$). CON grubuna ait bazal tabaka kalınlığı CIS grubuna göre çok daha fazladır. CON grubu ile CIS grubu arasındaki fark diğer gruplara nazaran çok daha belirgindir. CON ve Cis+50SM grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$). CON ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,9999$). SM200 ve CIS grupları arasında istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 grubuna ait dokularda bazal tabaka kalınlığı Cis grubundan oldukça fazladır. SM200 ve CIS+SM50 grupları arasında bazal tabaka kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,0002$). CIS ve CIS+SM50 grupları arasında, CIS ve CIS+SM200 grupları arasında ve Cis+50SM ve Cis+200SM grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$). Sonuç olarak CIS grubunda bazal tabaka kalınlığı diğer tüm gruplar arasında en düşük değere sahiptir.



Şekil 27. Deney gruplarında yer alan hayvanların bazal tabaka kalınlıkları (µm). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 17. Deney gruplarının x40'lık büyütmede, H&E boyamada bazal tabaka yapıları ok ile gösterilmiştir. (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları)

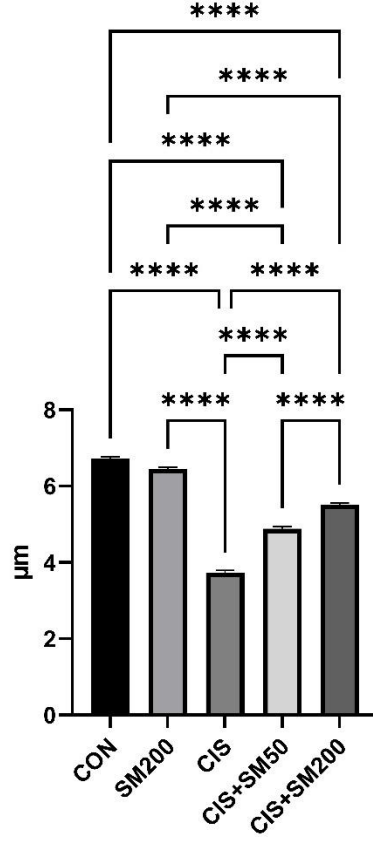
4.2.4. Bazal Lamina Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tubuli seminiferi contorti'lere ait basal lamina (bazal membran) kalınlıklarını ölçmek amacıyla PAS boyama yapılan preparatlar kullanıldı. Her hayvandan rastgele 10'ar kesit seçildi ve bu kesitlerden her bir hayvan için 30'ar adet yuvarlak ya da yuvarlağa yakın şekilli tubul seçildi. Her bir tubulden 4 adet basal lamina kalınlığı ölçümü yapıp bu dört ölçümün ortalaması alındı. Yapılan analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde gösterilmiştir.

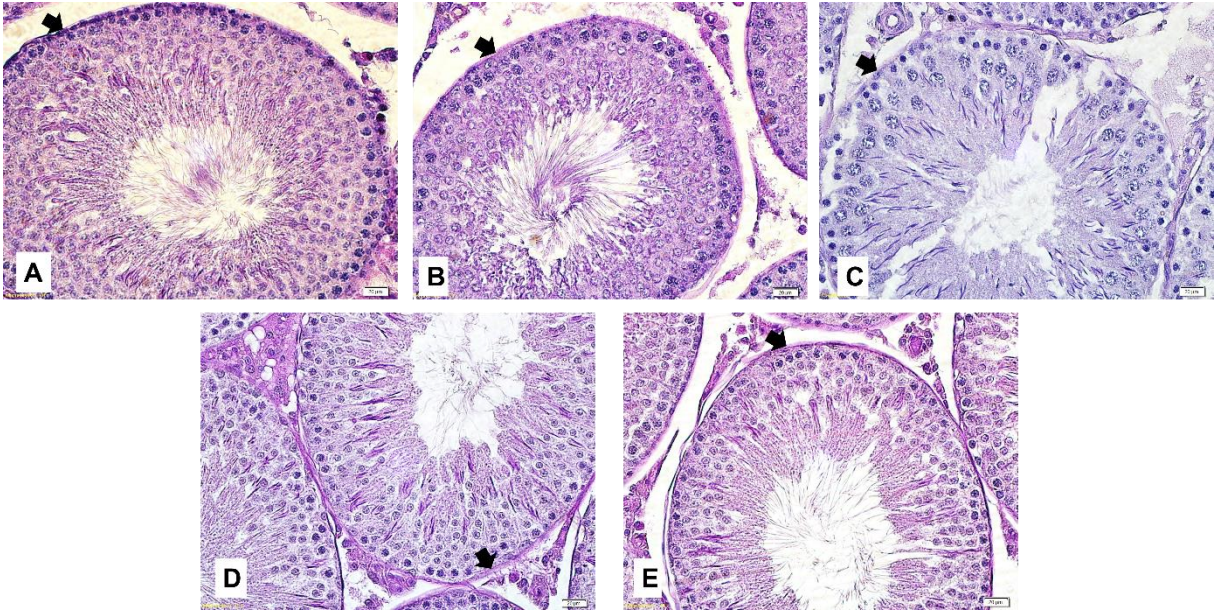
Tablo 18. Bazal lamina kalınlığı ölçümleri (μm).

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	3,972	4,608	1,254	2,730	3,382
Maksimum	8,383	8,814	6,581	7,958	7,433
Ortalama	6,719	6,447	3,720	4,886	5,518
Standart sapma	0,7710	0,8259	1,115	0,9893	0,8045

Bazal lamina kalınlığı açısından CON ve SM200 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,0921$). CON ve CIS grupları arasında yüksek derecede önemli bir istatistiksel fark bulunmuştur ($p<0,0001$). En yüksek fark bu iki grup arasında belirlenmiştir. CON ve CIS+SM50 grubu ile CON ve COS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 ile CIS grupları arasında, SM200 ile CIS+SM50 grupları arasında ve SM200 ile CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). CIS ve CIS+SM50 ile CIS ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan önemli farklılıklar yer almaktadır ($p<0,0001$). CIS+SM50 ile CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan önemli farklılıklar mevcuttur ($p<0,0001$). CIS+SM50 grubunun bazal lamina kalınlığı ortalaması CIS+SM200 grubundan anlamlı düzeyde daha düşüktür.



Şekil 28. Deney gruplarında yer alan hayvanların bazal lamina kalınlıkları (µm). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 18. Deney gruplarının x40'lık büyütmede, PAS boyamada bazal lamina yapıları ok ile gösterilmiştir. (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları)

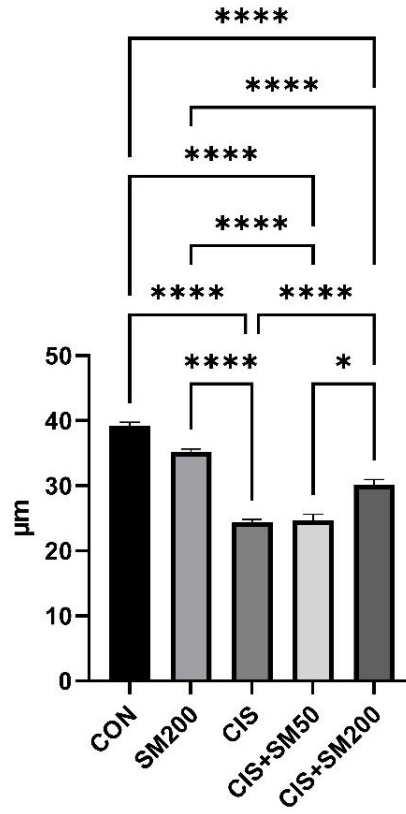
4.2.5. Tunica Albuginea Kalınlığı Ölçümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

Sıçan testislerine ait tunica albuginea kalınlıklarını ölçmek amacıyla Masson's trikrom boyalı preparatlar kullanılmıştır. Her bir hayvan için 10 preparat incelendi ve her bir kesitin farklı bölgelerinden 10'ar adet bölge rastgele seçilerek bu bölgelerin tunica albuginea kalınlıkları ölçülüp kaydedildi. Daha sonra yapılmış olan bu 10 ölçümün ortalaması alınarak tek bir değer elde edildi. Yapılan analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde gösterildi.

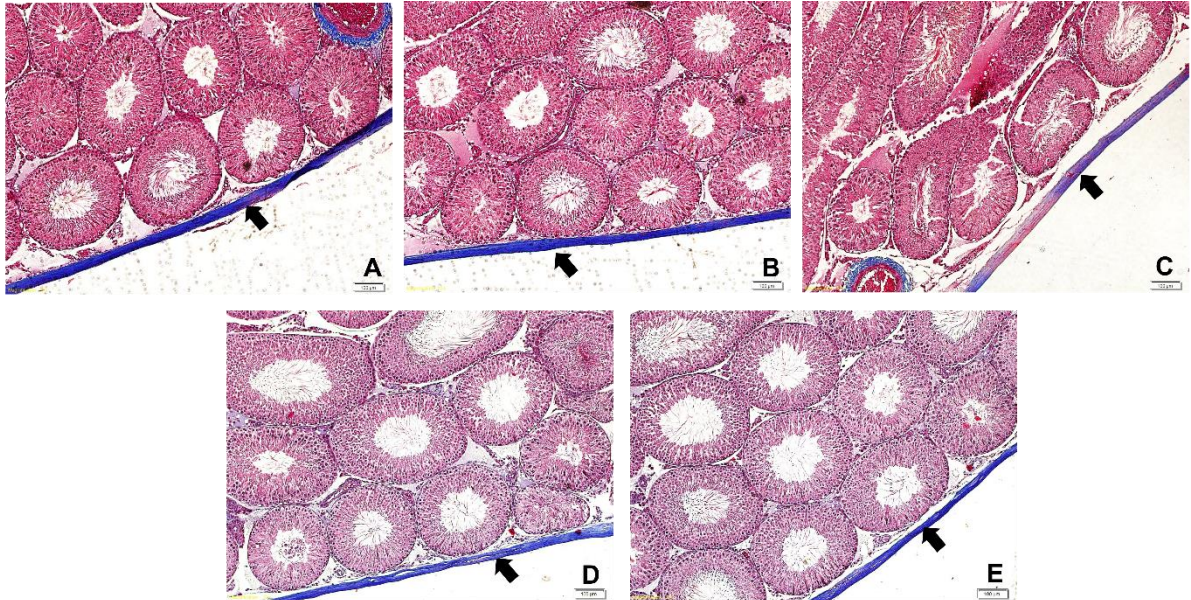
Tablo 19. Tunica albuginea kalınlığı ölçümleri (μm).

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	29,34	30,22	14,48	18,46	18,88
Maksimum	51,07	43,83	36,04	32,54	53,40
Ortalama	39,19	35,23	24,37	24,63	30,19
Standart sapma	4,704	3,287	4,764	4,418	7,257

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p= 0,1231$). CIS grubu ve CIS+SM50, CIS+SM200 ve CON grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). En büyük farklılık CIS ve CON grubu arasında bulunmaktadır. CIS ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,9999$). CON grubu ve diğer tedavi grupları olan CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 grubu ile de CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar göze çarpmaktadır ($p<0,0001$). CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan zayıf bir farklılık bulunmaktadır ($p=0,0340$). Ölçüm sonuçlarına bakılacak olursa tunica albuginea kalınlığı CIS grubunda en düşük düzeyde CON grubunda ise en yüksek düzeyde saptanmıştır.



Şekil 29. Deney gruplarında yer alan hayvanların tunica albuginea kalınlıkları (µm). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 19. Deney gruplarının x10'luk büyütmede, Masson's trikrom boyamada tunica albuginea yapıları ok ile gösterilmiştir. (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları)

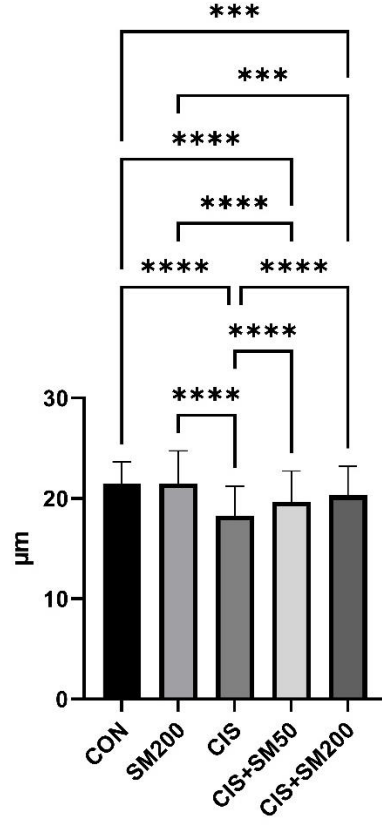
4.2.5. Arter apı lümlerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

Sıçan testis dokuları içerisinde yer alan arter çaplarının ölçümü için her bir hayvana ait 10 preparat incelenmiş ve her bir preparatta rastgele 10 adet arter seçildi. Her bir artere ait çap 2 adet çap ölçümü alındı ve bu ölçümlerin ortalaması bulunarak tek bir çap uzunluğu elde edildi. Arter apı ölçmek amacıyla Masson's trikrom boyalı preparatlar tercih edildi. Yapılan analiz sonuçları aşağıda tablo ve grafik halinde gösterildi.

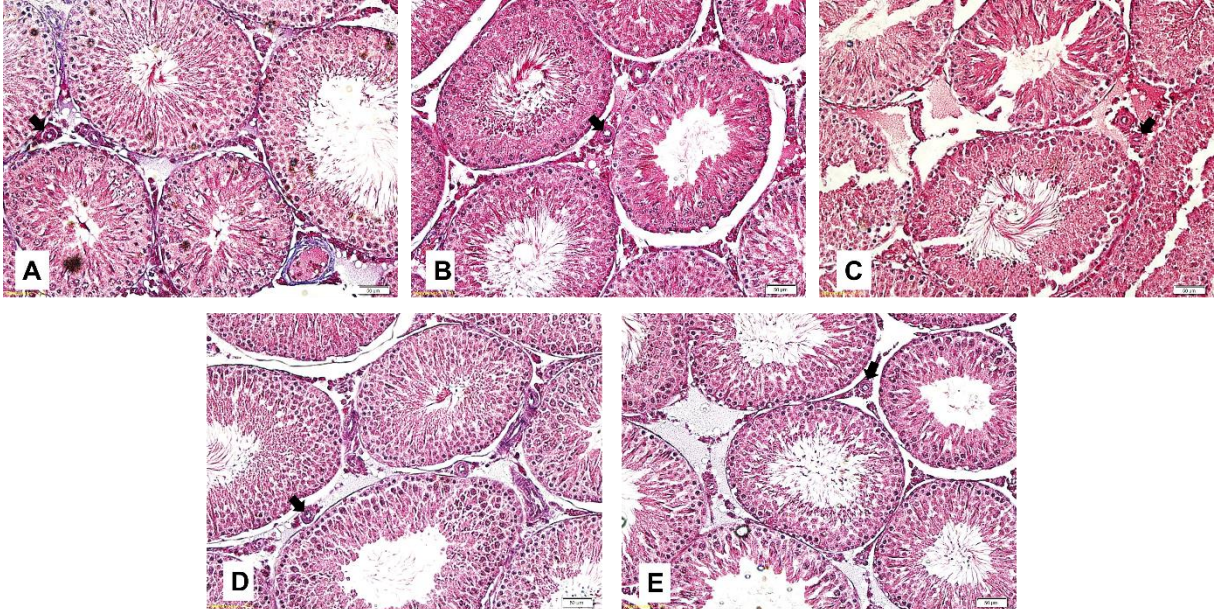
Tablo 20. Arter apı ölçümleri (μm).

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	15,56	14,00	11,70	12,12	13,54
Maksimum	27,87	32,52	26,60	28,86	29,36
Ortalama	21,43	21,48	18,26	19,67	20,31
Standart sapma	2,210	3,268	2,978	3,072	2,895

CON ve SM200 grupları arasında arter çapı ölçümü bakımında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamaktadır ($p=0,9996$). CON grubu ile CIS ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 ve CIS grupları arasında da aynı CON grubunda olduğu gibi oldukça önemli bir istatistiksel fark mevcuttur ($p<0,0001$). Yine SM200 ve CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). CIS grubu ile CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında önemli istatistiksel farklılıklar göze çarpmaktadır ($p<0,0001$). İkili olarak karşılaştırıldığında CIS+SM50 ve CIS+SM200 gruplarının kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemektedir ($p=0,1775$).



Şekil 30. Deney gruplarında yer alan hayvanların arter çap ölçümleri (μm). Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 20. Deney gruplarının x10'luk büyütmede, Masson's trikrom boyamada arter yapıları ok ile gösterilmiştir (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları)

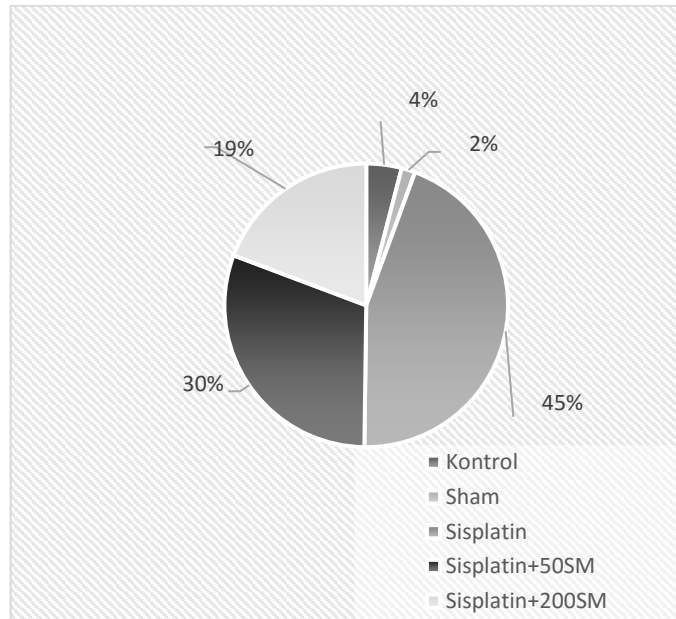
4.2.6. Peritubuler Atrofi Oranlarının İstatistiksel Analiz Sonuçları

Masson's trikrom boyalı preparatlarda peritubuler fibrozis veya atrofi varlığı, tubuli seminiferi contorti'leri çevreleyen kolajen birikiminin boyanmasının kalınlığına göre değerlendirildi. Peritubuler fibrozis veya atrofi; 0 (yok veya minimal) ile 1 (belirgin) arasında puanlandı ve sonuçların yüzde değeri hesaplandı.

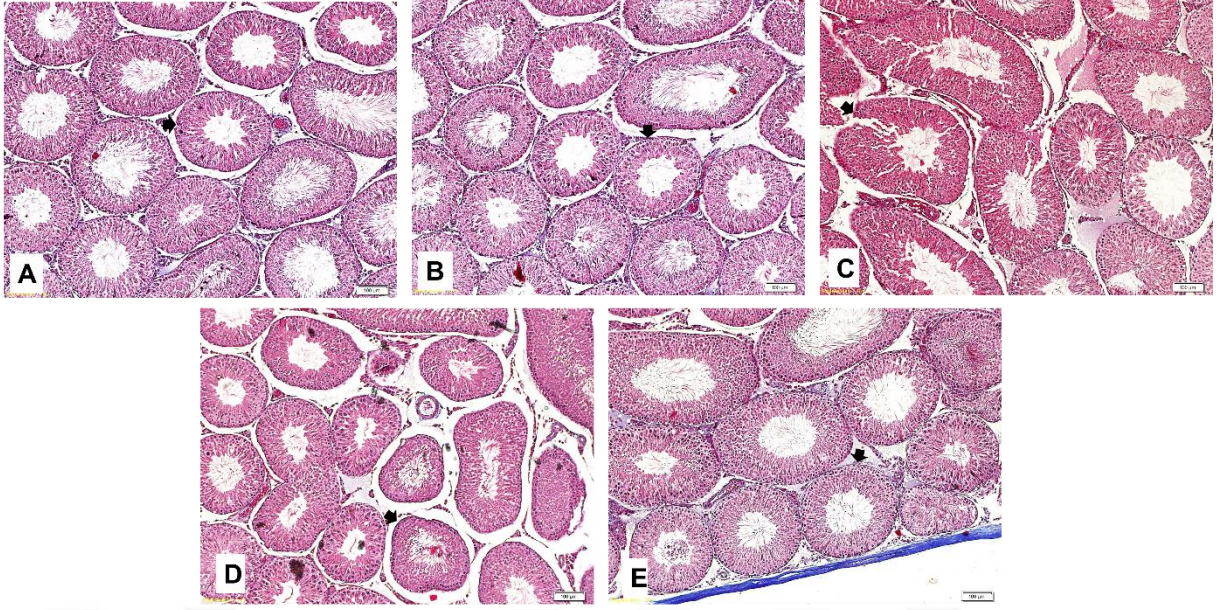
Tablo 21. Peritubuler atrofi oranı (%).

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Normal tubul yüzdesi	93,3	97,4	25,9	49,3	68,0
Atrofik tubul yüzdesi	6,7	2,6	74,1	50,7	32
Toplam	100	100	100	100	100

Yalnızca CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,178$). Diğer tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli derecede anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). En yüksek peritubuler atrofi oranı CIS grubunda yer almaktadır. Yüksek doz tedavi grubu olan CIS+SM200 grubuna ait atrofik tubul oranı düşük doz tedavi grubuna kıyasla önemli derecede farklılık göstermiştir.



Şekil 31. Gruplara göre peritubuler atrofi oranı (%). Veriler '%' değer olarak ifade edilmiştir.



Resim 21. Deney gruplarının x10'luk büyütmede, Masson's trikrom boyamada tubul çevreleri ok ile gösterilmiştir (A;CON, B;SM200, C;CIS, D;CIS+SM50, E;CIS+SM200 grupları).

4.2.7. Spermium sayımı İstatistiksel Analiz Sonuçları

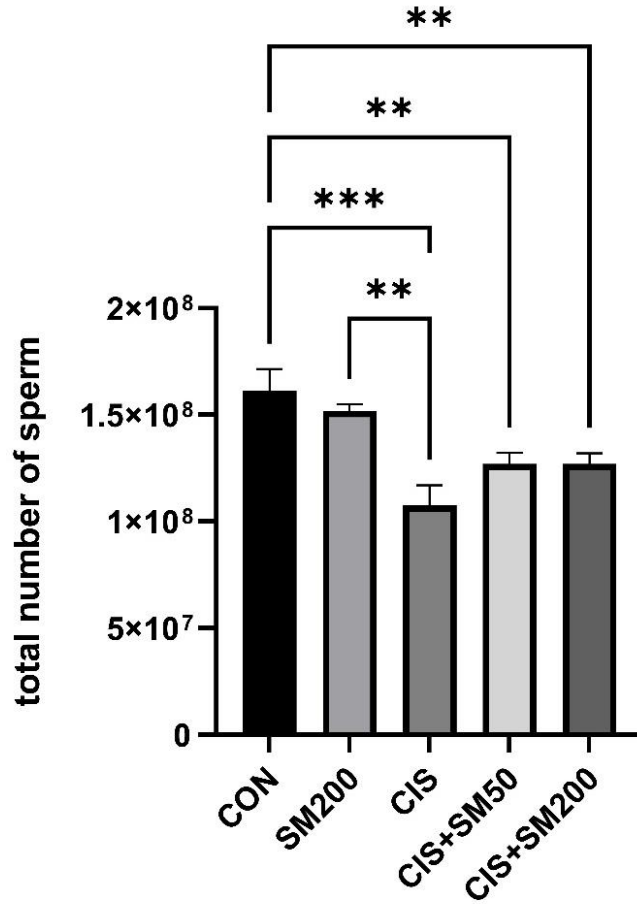
Çalışma sonucunda uygun yöntem ve tekniklerle elde edilen spermiumler Thoma lamı ile faz kontrast mikroskobunda (Olympus-CX41) incelenmiş ve sonuçlar aşağıda tablo ve grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 22. Spermium sayım sonuçları

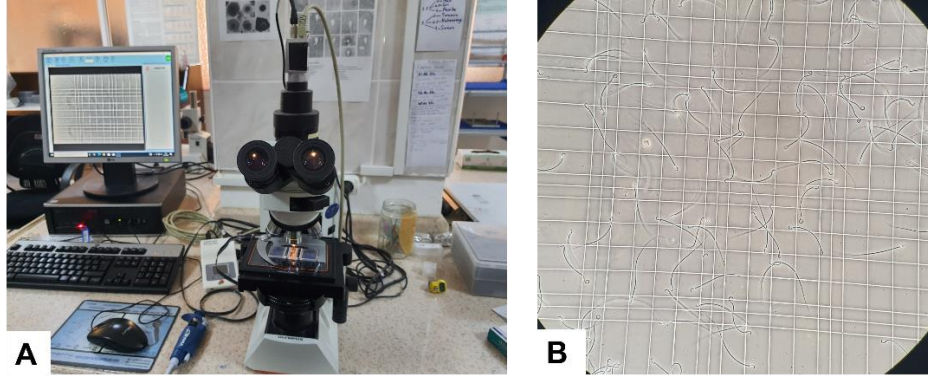
	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM
Minimum	$1,2 \times 10^8$	$1,275 \times 10^8$	$8,25 \times 10^7$	$1,05 \times 10^8$
Maksimum	$2,15 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
Ortalama	$1,6125 \times 10^8$	$1,51 \times 10^8$	$1,075 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$
Standart sapma	32215636	9921567	23021729	16142809

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,8549$). CON ve CIS grupları arasında spermium sayısı bakımından oldukça yüksek düzeyde anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,0001$). CON ve CIS+SM50 grupları arasında orta derecede önemli bir istatistiksel farklılık saptanmıştır ($p=0,0081$). Gene CON ve CIS+SM200

grupları arasında istatistiksel açıdan orta derecede anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p=0,0062$). Gene SM200 ve CIS grupları arasında da istatistiksel açıdan önemli farklılıklar göze çarpmaktadır ($p=0,0024$). SM200 ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar görülmemektedir ($p=0,1095$). SM200 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmamaktadır ($p=0,0955$). CIS+SM50 ve CIS grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemesine rağmen CIS grubunda spermium sayısı daha düşük olarak bulunmuştur ($p=0,4082$). Aynı şekilde CIS+SM200 grubunda spermium sayısı daha fazla olmasına karşın istatistiksel açıdan bir anlam farklılığı görülmemektedir ($p=0,3874$). CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan bir farklılık gözlenmemektedir ($p>0,9999$).



Şekil 32. Spermium sayım sonuçları. Veriler ortalama± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 22. A) Faz kontrast mikroskobu B) Thoma lamında spermium sayımı genel görünümü

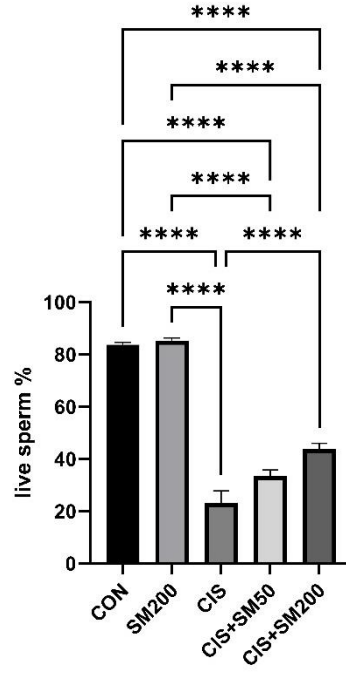
4.2.8. Ölü-Canlı Spermium Oranı İstatistiksel Analiz Sonuçları

Çalışmada elde edilen spermiumlerin ölü-canlı oranlarını belirlemeyebilmek amacı ile Eosin-nigrosin boyası kullanılarak ışık mikroskobunda her bir hayvan için x10'luk büyütmede 200 spermium sayılarak ölü-canlı oranı yüzdelik değer olarak belirlendi.

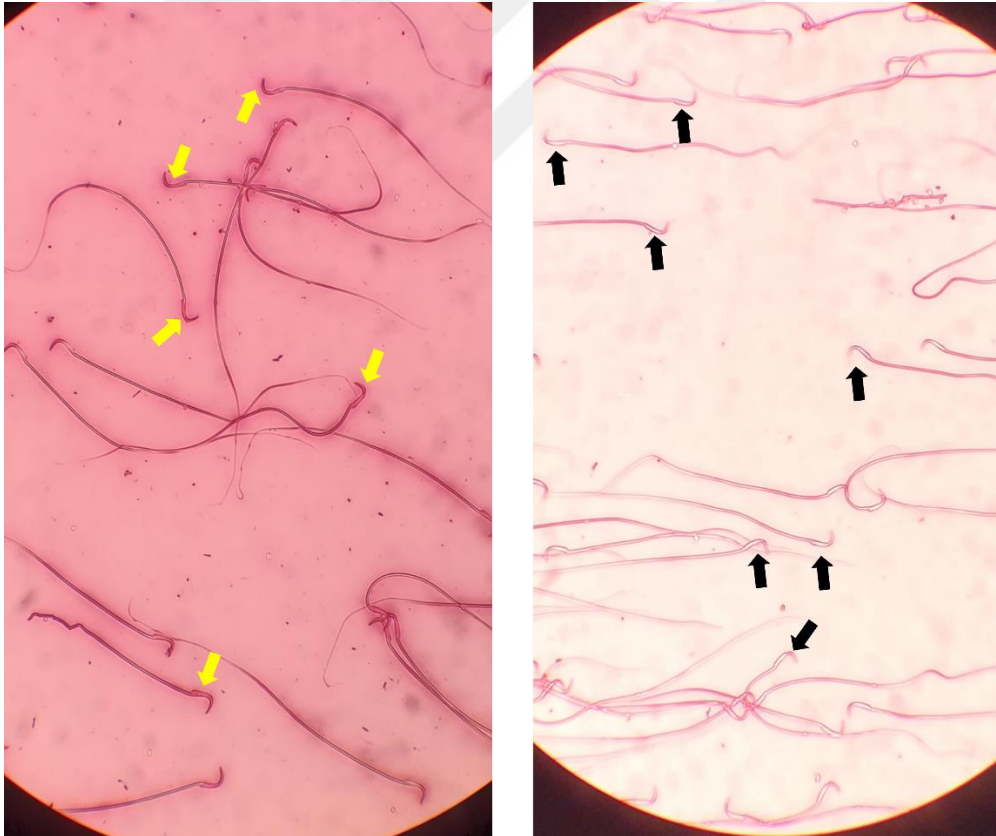
Tablo 23. Canlı spermium oranı (%)

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	80	89,81	0	20,5	32,5
Maksimum	88	89,5	60	43,5	57
Ortalama	83,7	85,22	23,06	43,69	66,61
Standart sapma	2,899	3,124	14,28	7,149	7,210

CON ve SM200 grupları arasında canlı spermium oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,9935$). CON grubu ve CIS, CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan oldukça belirgin bir farklılık vardır ($p<0,0001$). CON grubunda olduğu gibi SM200 grubunda da CIS, CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında oldukça önemli istatistiksel farklılıklar mevcuttur ($p<0,0001$). CIS ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmemiştir ($p=0,0626$). CIS ile CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar görülmüştür ($p<0,0001$). CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmemiştir ($p=0,0540$).



Şekil 33. Canlı spermium oranları ‘%’ olarak ifade edilmiştir.



Resim 23. Işık mikroskopunda, x10’luk büyütmede Eosin-nigrosin boyama ile ölü spermiumlar (sarı ok ile gösterilenler) ve canlı spermiumlar (siyah ok ile gösterilenler) görünümü.

4.2.8. Normal-Anormal Spermium Oranı İstatistiksel Analiz Sonuçlar

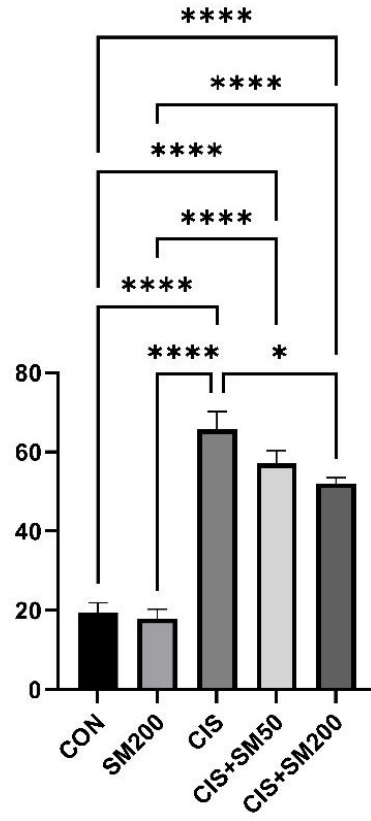
Spermium morfolojisini incelemek için Hancock solüsyonu ile muamele edilen spermiumler faz-kontrast mikroskobunda $\times 10^3$ luk büyütmede incelendi. Spermium başı gövdesi ve kuyruğunda meydana gelebilecek anomaliler arandı. Yalnızca spermium baş kısmında morfolojik değişikliklerin meydana geldiği tesbit edildi ve bu değişiklikler kopuk spermium başı, gelişmemiş (rudimenter) spermium başı ve küçük spermium başı olarak gözlemlendi. Sonuçlar aşağıda normal-anormal spermium oranı olarak tablo ve grafik halinde gösterildi

4.2.8.1. Anormal Spermium Oranı İstatistiksel Analiz Sonuçları

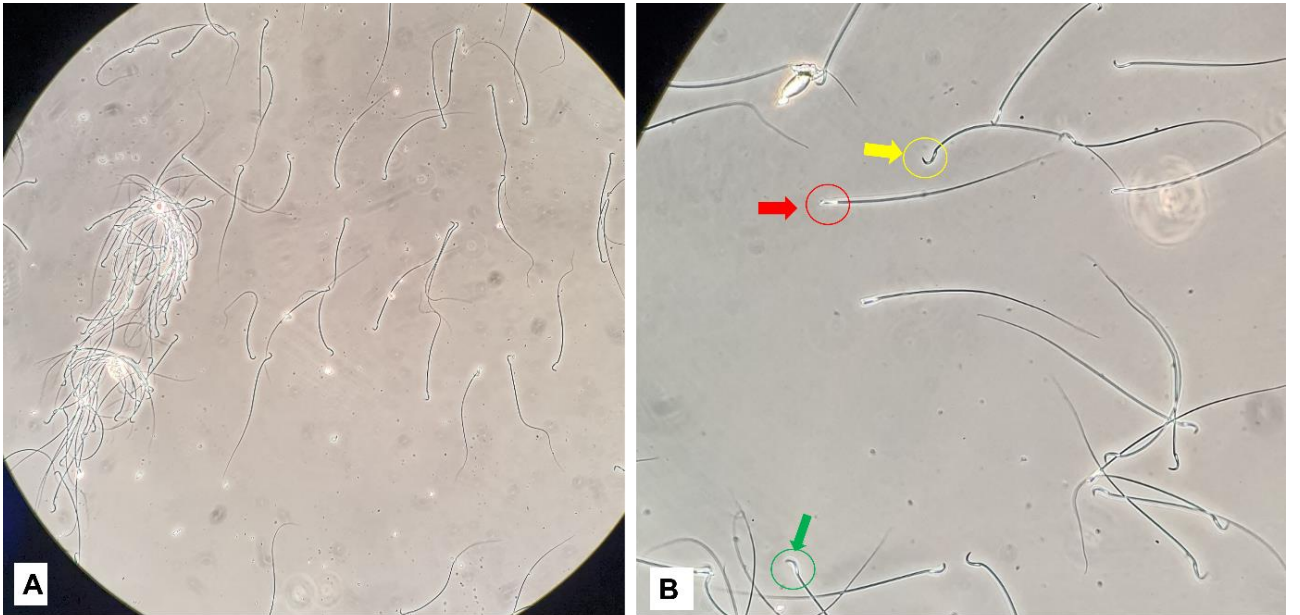
Tablo 24. Anormal spermium oranı (%)

	CON	SM200	CIS	CIS+50SM	CIS+200SM
Minimum	5,500	9,190	51,26	40,07	45,74
Maksimum	27,34	34,04	86,96	74,01	58,94
Ortalama	19,35	17,89	65,75	57,15	52,05
Standart sapma	7,967	7,332	2,75	9,579	4,155

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,9961$). Ancak CON grubu diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel açıdan önemli derecede farklılık göstermiştir ($p<0,0001$). CON ve CIS grupları arasında istatistiksel açıdan önemli derecede farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). En yüksek anormal spermium oranı CIS grubunda bulunmuştur. CON grubu ile CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmuştur ($p<0,0001$). SM200 grubu ile CIS, CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar mevcuttur ($p<0,0001$). CIS grubu ile CIS+SM50 grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir ($p=0,2766$). CIS grubu ile CIS+SM200 grubu arasında istatistiksel açıdan düşük düzeyde bir farklılık görülmüştür ($p=0,0261$). Düşük ve yüksek doz tedavi grupları olan CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık görülmemiştir ($p=0,7523$).



Şekil 34. Anormal spermium oranı ‘%’ olarak ifade edilmiştir.



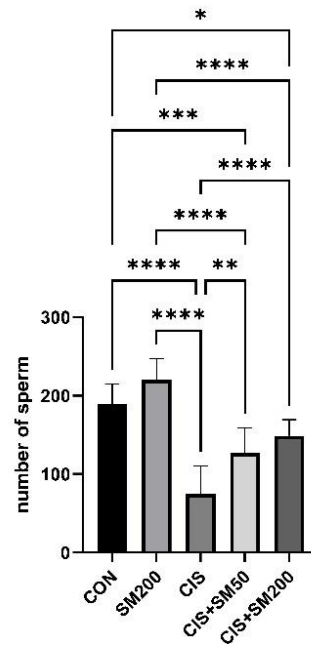
Resim 24. Faz-kontrast mikroskobunda, x10’luk büyütmede (A) Hancock solüsyonu ile muamele edilen spermiumların genel görünümü, (B) spermium yapıları (normal spermium; sarı ok, küçük başlı spermium; yeşil ok, rudimenter başlı spermium; kırmızı ok).

4.2.8.2. Normal Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 25. Normal spermium sayısı

	CON	SM200	CIS	CIS+50SM	CIS+200SM
Minimum	153	190	0	85	123
Maksimum	230	257	111	169	193
Ortalama	189,4	220,1	74,44	126,5	146,4
Standart sapma	25,35	27,37	36,21	32,71	20,49

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,1746$). CON ve CIS grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık saptanmıştır ($p<0,0001$). Normal spermium sayısı CIS grubunda normal gruba kıyasla önemli derecede düşmüştür. CON ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel açıdan orta düzeyde bir farklılık saptanmıştır ($p=0,0004$). CON ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan oldukça düşük düzeyde bir farklılık saptanmıştır ($p=0,0395$). SM200 grubu ile CIS, CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan önemli düzeyde bir farklılık görülmüştür ($p<0,0001$). CIS ve CIS+SM50 grupları arasında orta düzeyde istatistiksel bir farklılık saptanmıştır ($p=0,0057$). Bunun yanı sıra CIS ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan yüksek düzeyde farklılık saptanmıştır ($p<0,0001$). CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark görülmemiştir ($p=0,5460$)



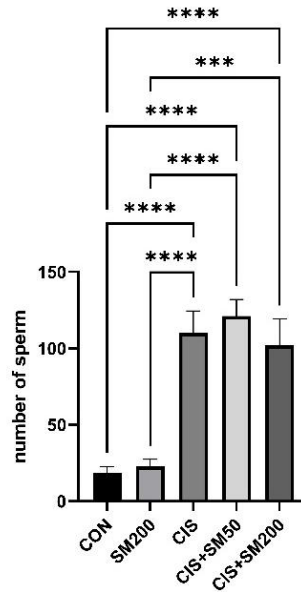
Şekil 35. Normal spermium sayısı. Veriler ortalama± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

4.2.8.3. Küçük Başlı Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 26. Küçük başlı spermium sayısı

	CON	SM200	CIS	CIS+50SM	CIS+200SM
Minimum	3,000	8,000	68,00	87,00	39,00
Maksimum	46,00	50,00	173,0	178,0	196,0
Ortalama	18,60	22,78	110,1	121,2	101,9
Standart sapma	13,02	14,08	40,70	32,63	52,07

CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,9991$). SM200 grubu hariç diğer tüm gruplar ve CON grubu arasında istatistiksel açıdan çok anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 grubu ile CIS ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,0001$). SM200 grubu ile CIS+SM200 grubu arasında ise orta düzeyde anlamlı istatistiksel bir farklılık göze çarpmaktadır ($p=0,0001$). CIS grubu ile CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında ise istatistiksel açıdan bir farklılık görülmemiştir (p değerleri sırası ile $p=0,9593$ ve $p=0,9863$). CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0,7377$).



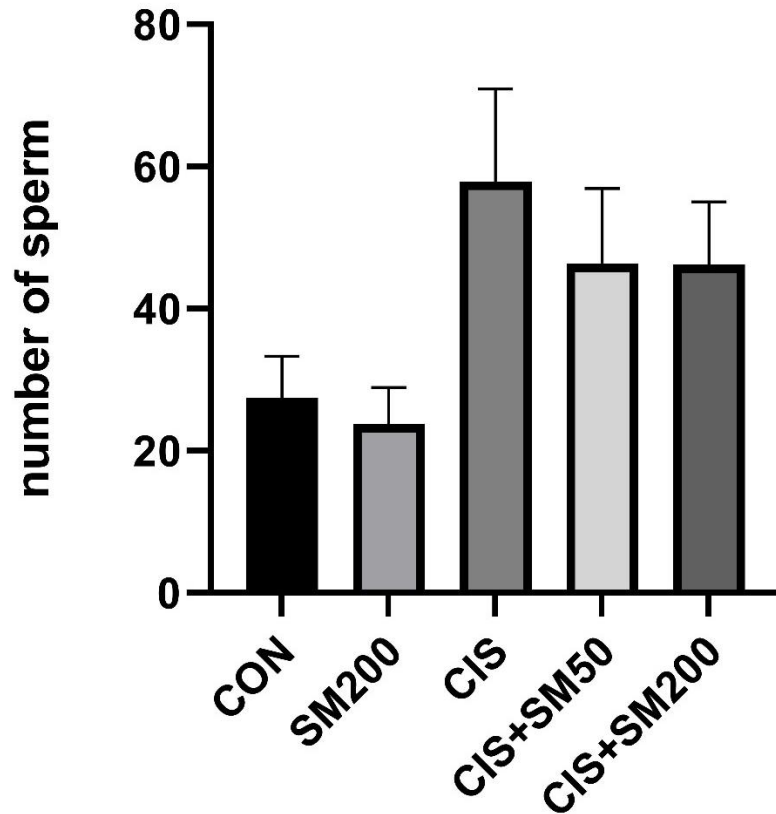
Şekil 36. Küçük başlı spermium sayısı. Veriler ortalama± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

4.2.8.3. Rudimenter Başlı Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 27. Rudimenter başlı spermium sayısı

	CON	SM200	CIS	CIS+50SM	CIS+200SM
Minimum	3	9	14	6	2
Maksimum	49	52	130	112	75
Ortalama	27,40	23,78	57,88	46,33	46,22
Standart sapma	18,63	15,42	36,76	31,78	26,45

Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p>0,005$).



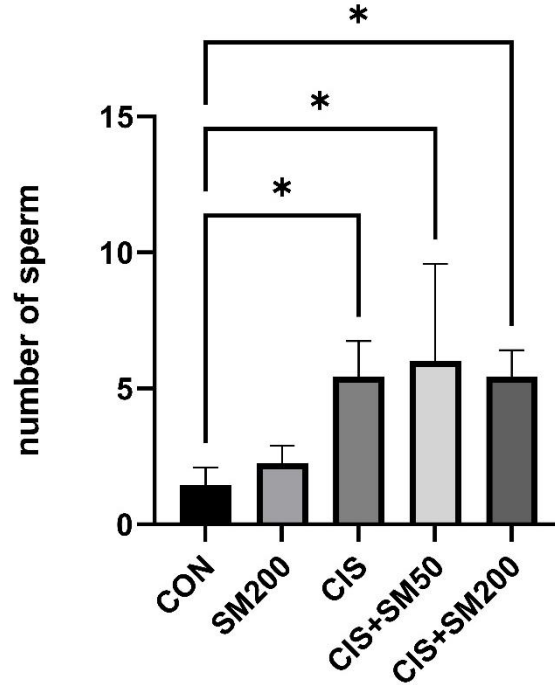
Şekil 37. Rudimenter başlı spermium sayısı. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

4.2.8.4. Kopuk Başlı Spermium Sayısı İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 28. Kopuk başlı spermium sayısı

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	0	0	0	2	2
Maksimum	5	5	10	12	10
Ortalama	1,444	2,250	5,444	6	5,444
Standart sapma	1,944	1,832	3,909	3,578	2,877

CON ve CIS grupları arasında düşük düzeyde istatistiksel bir farklılık görülmektedir ($p=0,0457$). CON ve CIS+SM50 grupları arasında da istatistiksel anlamda düşük düzeyde bir farklılık tespit edilmiştir ($p=0,0402$). CON ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan düşük düzeyde bir farklılık bulunmuştur ($p=0,0457$). Geri kalan tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (kalan tüm gruplar için $p>0,005$).



Şekil 38. Kopuk başlı spermium sayısı. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Resim 25. Faz-kontrast mikroskobunda x10'luk büyütmede kopuk başlı spermiumların görünümü (kırmızı ok ile gösterilen).

4.2.8. Biyokimyasal Analiz Bulguları

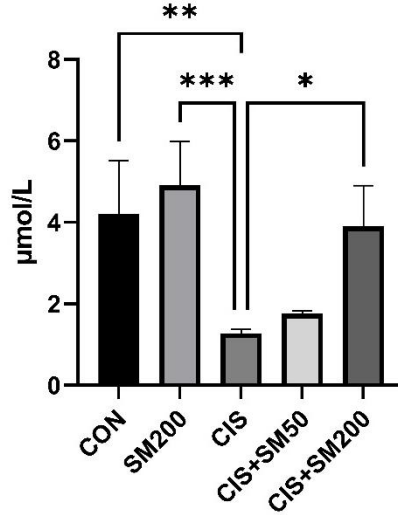
Deney hayvanlarından elde edilen kan serumları, biyokimyasal testler yapılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Testler yapılmadan 1 gün önce dolaptan çıkartılıp +4°C'de bekletilmiştir. TAS (total antioksidan seviyesi), TOS (total oksidan seviyesi), inhibin A ve inhibin B değerleri aşağıda tablo ve grafik halinde verilmiştir.

4.2.8.1. TAS (total antioksidan seviyesi) İstatistiksel Analiz Bulguları

Tablo 29. TAS (total antioksidan seviyesi) ($\mu\text{mol/L}$)

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	1,810	2,780	0,8600	1,480	1,600
Maksimum	8,050	8,020	1,650	2,020	6,630
Ortalama	4,202	4,920	1,280	1,758	3,905
Standart sapma	2,935	2,390	0,2468	0,2038	2,440

CON ve CIS grupları arasında istatistiksel açıdan orta düzeyde bir farklılık bulunmuştur ($p= 0,0019$). Yine CIS grubu ile CIS+SM200 grubu arasında istatistiksel açıdan farklılık saptanmıştır ($p= 0,0034$). Diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir (diğer tüm gruplar için $p>0,005$).



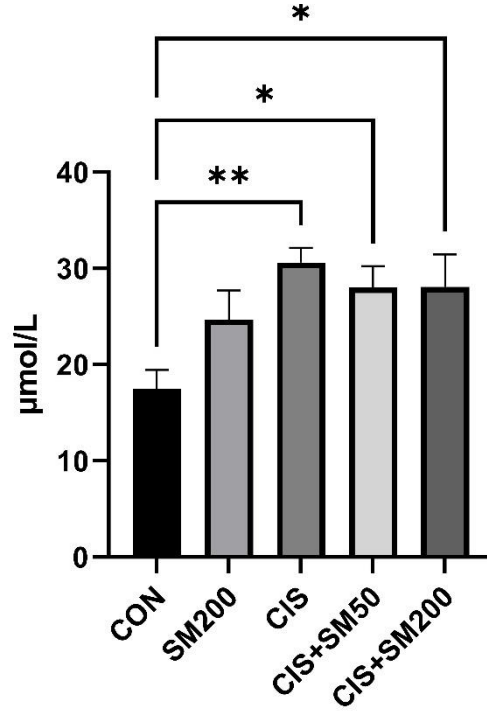
Şekil 39. TAS (total antioksidan seviyesi) (µmol/L) Veriler ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

4.2.8.2. TOS (total oksidan seviyesi) İstatistiksel Analiz Bulguları

Tablo 30. TOS (total oksidan seviyesi) (µmol/L)

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	10,13	9,560	25,48	19,99	17,59
Maksimum	23,23	29,14	36,61	36,18	44,92
Ortalama	17,47	23,04	30,61	28,05	28,07
Standart sapma	5,613	7,488	4,072	6,187	9,548

CON ve CIS+SM50 grupları arasında istatistiksel olarak düşük düzeyde ancak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,0363$). CON ve CIS+SM200 grupları arasında da zayıf düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görüldü ($p=0,0359$). CON ve CIS grupları arasında ise biraz daha yüksek düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görüldü ($p=0,0080$). Diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi (geri kalan tüm gruplar için $p>0,005$).



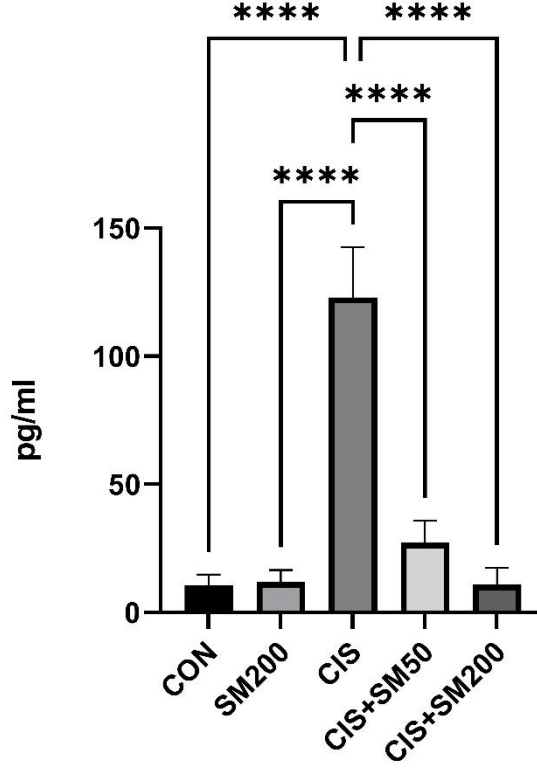
Şekil 40. TOS (total oksidan seviyesi) (µmol/L) Veriler ortalama± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

4.2.8.3. İnhibin A Sonuçları İstatistiksel Analiz Bulguları

Tablo 31. İnhibin A Düzeyleri (pg/ml)

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	4,950	4,170	4,950	4,950	2,250
Maksimum	30,72	37,64	173,2	68,32	56,42
Ortalama	10,62	11,97	123,0	27,22	10,97
Standart sapma	10,21	13,95	55,54	24,23	18,39

CON ve CIS grupları arasında yüksek düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,0001$). CIS grubu ile SM200 grubu arasında da aynı CON grubunda olduğu gibi istatistiksel açıdan büyük bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,0001$). CIS grubu ile her iki tedavi grubu arasında (CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları) da istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p < 0,0001$). Geri kalan diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir (geri kalan tüm gruplar için $p > 0,005$).



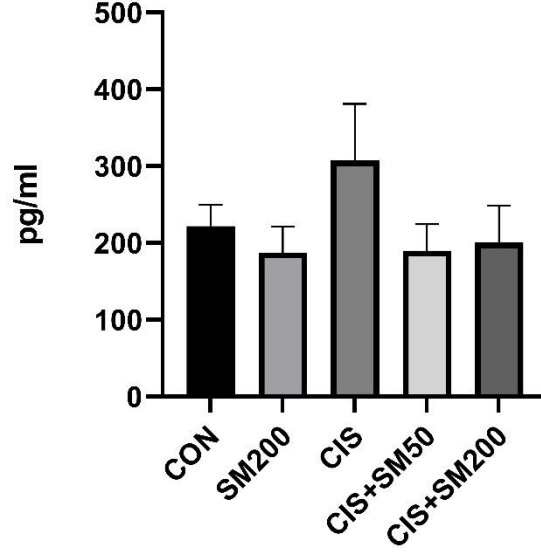
Şekil 41. İnhibin A düzeyleri (pg/ml) Veriler ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

4.2.8.3. İnhibin B Sonuçları İstatistiksel Analiz Bulguları

Tablo 32. İnhibin B Düzeyleri (pg/ml)

	CON	SM200	CIS	CIS+50 SM	CIS+200SM
Minimum	99,99	59,97	36,36	34,92	131,6
Maksimum	320,7	298,1	264,7	376,1	570,1
Ortalama	221,7	187,4	189,7	200,6	307,6
Standart sapma	84,44	89,71	84,65	127,1	164,5

Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (tüm gruplar için $p > 0,005$).



Şekil 42. İnhibin B düzeyleri (pg/ml). Veriler ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Sisplatin, mide kanseri, akciğer kanseri ve yumurtalık ve testis kanseri gibi çeşitli solid tümörlerin tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılan, klinik olarak oldukça gelişmiş ve etkili bir antikanser ilaçtır. Ancak testis toksisitesi, sisplatinin kullanımını sınırlandırmaktadır (Boekelheide, 2005; Dasari ve Tchounwou, 2014). Özellikle testis kanseri, 15-35 yaş aralığında yer alan erkeklerde en çok görülen solid tümördür. Bu tümör aynı zamanda tedavi edilebilen bir katı neoplazmadır. Neoplazma, bir sınır göstermeyen, canlılığın kontrolü haricinde hareket edebilen ve aynı zamanda kontrolsüz bir biçimde çoğalabilen, anormal yapıda doku anlamındadır. Sitotoksik kemoterapi, genç hastalarda uzun süreli remisyonu geliştirir ya da tedavi eder (Aminsharifi ve diğerleri 2007).

Sisplatin esas olarak platin bazlı bir kemoterapötik bir ajandır. Sisplatin, hücre çekirdeğine girdiği andan itibaren meydana gelen platin-DNA eklentileri dolayısıyla platin ilaçları sitotoksikite oluştururlar. Sisplatin uygulaması sonucunda hayvanlarda testiküler steroidejenik bozulma ve Leydig hücrelerinin işlevlerinin bozulması ile tedavi sonucu belirgin bir testis hasarı ve germ hücre apoptozu meydana gelir (Wang ve Dong, 2005). Sisplatin uygulaması, testis antioksidan düzeyini önemli ölçüde düşürür ve lipid oksidasyonuna sebep olur (Amin ve Hamza, 2006). Ayrıca sisplatin tedavisinin yan etkilerinden biri de germ hücre apoptozudur (Cherry ve diğerleri 2004).

Sisplatin gibi kemoterapötik ilaçların yaygın yan etkilerinden biri erkek infertilitesidir. Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri bu ilaçlardan daha az etkilenirken spermatojenik hücreler bu ilaçlara çok duyarlıdır. Kemoterapötik ajanlar, DNA hasarı ya da oksidatif strese sebep olarak erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkiler (Aksu ve diğerleri 2017).

Bu bilgilerden yola çıkarak deney tasarımı oluşturduğumuz çalışmada, 16 haftalık sıçanlara tek doz 7mg/kg/gün sisplatin, intraperitoneal olarak uygulanarak testis hasarı oluşumu sağlandı. Yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak antioksidan ajan olan silymarin'in dozu 2'ye bölünerek 12 saatte bir olmak üzere günde 2 kere oral gavaj yolu ile hayvanlara verildi ve 3. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Deney süreci kısa olduğundan dolayı hayvanlarda ağırlık değişimi ya da gözle görülür bir değişim gözlenmedi. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra çıkartılan testislerin de morfometrik ölçümleri ile ağırlık ölçümleri kaydedilerek TAI (testis ağırlık indeksi) hesaplandı. Hayvan ağırlıkları, sağ ve sol testis ağırlıkları ve TAI açısından gruplar arasında karşılaştırılarak aralarında istatistiksel bir farklılık bulunmadığı

belirlendi. Şentürk (2020) yapmış olduğu çalışmada, bizim çalışmamız ile benzer şekilde tek doz 7mg/kg/gün sisplatin uygulamış ancak bizden farklı olarak verilen antioksidan maddeyi, sisplatin uygulamasından 15 gün önce vermeye başlamışlardır. Çalışma sonucunda, sisplatin ve sisplatin+kurkumin gruplarında, bizim çalışmamızın sonuçlarından farklı olarak, hayvan ağırlıklarının ve testis ağırlıklarının azaldığını bildirmiştir. Bu farklılığın, deney ilaç uygulama sürelerinin farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. İlbey ve ark (2009) yapmış oldukları çalışmada 6 haftalık Wistar Albino erkek sıçan kullanmış ve sisplatin 7 mg/kg/gün'lük tek dozda intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Kullanmış oldukları antioksidan madde olan melatonin hem ayrı ayrı hem de siklofosfamid ve sisplatin ile birlikte 10 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışma sonucunda siklofosfamid ve sisplatin alan gruplarda önemli testisküler ağırlık kaybı gözlenmiştir ($p<0,001$). Sisplatin+melatonin grubuna kıyasla siklofosfamid+melatonin grubunda testis ağırlığı daha iyi korunmuştur. Bu durum sisplatin'in daha az toksik etki göstermesi sebebiyle açıklanabilir. Aynı çalışmada hayvan ağırlıkları sonuçlarına bakacak olursak sadece sisplatin ve sadece siklofosfamid verilen gruplarda, kontrol grubuna kıyasla önemli bir vücut ağırlığı kaybı gözlenmiştir ($p<0,001$). Kemoterapötik ajanlar ve melatonin ile birlikte tedavi edilen gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Sisplatin ve siklofosfamid grupları arasında hayvan ağırlığı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Sisplatin verilen grubun testisküler ağırlıkları ve hayvan vücut ağırlıkları arasında istatistiksel anlamda farklılıkların olmasının sebebi, deney tasarımının ve sisplatin dozunun çalışmamızdan oldukça farklı olması ile açıklanabilir. İlbey ve ark (2009)'nın yapmış oldukları başka bir çalışmada Wistar albino sıçanlara 7 mg/kg/gün'lük tek doz sisplatin enjeksiyonundan sonra 10 gün boyunca oral gavaj yolu ile mısırözü yağı içinde çözünmesini sağladıkları kurkumini 200 mg/kg/gün dozunda vermişlerdir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu ile sisplatin grubu arasında testisküler ağırlık açısından istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmüştür ($p=0,001$). Diğer gruplar arasında testisküler ağırlık açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir. Sisplatin ve kurkumin'in birlikte uygulandığı tedavi grubunda ise testisküler ağırlığın korunduğu tespit edilmiştir. Türk ve ark (2008) yapmış oldukları çalışmalarında, bizim çalışmamızda kullanmış olduğumuz 7 mg/kg/gün tek doz sisplatin, Wistar albino sıçanlara intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve ellagik asit, mısırözü yağında 5 mg/mL konsantrasyonunda süspanse edilerek 10 gün boyunca oral gavaj yolu verilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla sisplatin grubunda testis ($p<0,01$), epididymis ($p<0,05$) ve vesicula seminalis ($p<0,01$) ağırlıklarında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmalar meydana gelmiş ve prostat ağırlığında önemsiz düzeyde ($p>0,05$)

azalma meydana gelmiştir. Lirdi ve ark (2008) sisplatin ile tedavi edilmiş sıçan testisleri üzerine Amifostin'in koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında, bizim çalışmamızdan farklı olarak 30 günlük Wistar albino sıçanlara 5mg/kg/gün doz sisplatin uygulamış ve hayvanları 3,6 ve 12 saat sonra sakrifiye etmişlerdir. Deney sonucunda, çalışmamız ile benzer şekilde testis ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Mesbahzadeh ve ark (2021) yapmış oldukları çalışmada hayvanlara bizim çalışmada uyguladığımız doz olan 7mg/kg/gün sisplatin vererek krosin'in koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak hayvanlara sisplatin enjeksiyonundan 3 gün önce krosin intraperitoneal (i.p.) olarak vermeye başlanmış ve daha sonra 13.güne kadar günde tek doz olarak verilemeye devam edilmiş ve 14.günde deney sonlandırılmış. Çalışmanın sonucunda kontrol grubuna kıyasla sisplatin grubu nispi testis ağırlığı (0,28'e karşı 0,39, $p<0,001$) azalmıştır. Sisplatin ile tedavi edilen hayvanlar, kontrol grubuna kıyasla daha düşük vücut ağırlığı, mutlak ve bağıl testis ağırlıkları sergilemiştir (tümü için $p<0,001$). Ashrafi ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmalarında hayvanlara 10 gün boyunca sırasıyla 20, 80 ve 200 mg/kg magnezyum sülfat verip 3. günde tek doz sisplatin (7 mg/kg/gün,i.p.) uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda sisplatin ile tedavi edilen tüm hayvanlarda kilo kaybı görülmüş ve normalize testis ağırlıkları ile patoloji hasar skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir (testis, $r = 0,335$, $p<0,05$). Coşkun ve ark (2013) sisplatin hasarı üzerine asetil L-karnitin'in olası etkilerinin incelenmesi amacıyla yapmış oldukları çalışmada, sisplatinin verdiği hasarı incelemiş ve bulgularını morfolojik ve histolojik olarak belirtmişlerdir. Deney dizaynında, bizim çalışmamızda olduğu gibi tek doz sisplatin intraperitoneal olarak uygulanmış ve bizim çalışmamızdan farklı olarak 13 mg/kg/gün doz seçilmiştir. Deney süreci bizim çalışmamız ile aynı şekilde devam etmiştir. Sisplatin ile indüklenen gonadotoksisite yaşayan sıçanlarda kilo kaybının diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazla olduğunu ($p<0,05$) gözlemişlerdir. Kohsaka ve ark (2020) relaksin'in sisplatin toksisitesi üzerine etkilerini incelemek için yapmış oldukları çalışmada Sprague-Dawley sıçanlara kullanmışlardır. Hayvanlara intraperitoneal olarak sisplatin (6 mg/kg/gün) enjekte edilmiş ve bunu takiben ozmotik mini bir pompa kullanılarak 5 gün süreyle relaksin infüze edilmiştir. Sisplatin uygulamasından 5 gün sonra, hayvanlar sakrifiye edilmiş ve testis ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Hayvan ağırlıkları ise sisplatin grubunda belirgin bir düşüş göstermiştir (hayvan ağırlıkları, kontrol grubu ortalama $266,7 \pm 3,0$, sisplatin grubu ortalama $209,6 \pm 3,0$). Tian ve ark (2018) yapmış oldukları çalışmalarında sisplatin ile indüklenen testis lezyonu oluşturdukları hayvan modelini, sisplatin tek doz 10 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak uygulamış ve üzüm çekirdeği prosiyanidin özünü intragastirik olarak

uygulayarak bu etken maddenin sisplatin üzerine olası etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmanın sonucunda sisplatin ile tedaviden sonra testis ağırlığı, vücut ağırlığı ve gıda kullanım oranının önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Reddy ve ark (2016) yapmış oldukları çalışmada sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis ve epididymal toksisiteye karşı resveratrolün olası koruyucu etkisini incelemişlerdir. Bu deneyde diğer bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak sisplatin ilk 3 gün arayla 3 mg/kg/gün doz olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Resveratrol uygulaması ise 20 mg/kg/gün doz olacak şekilde 45 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile verilmiştir. Çalışma sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sisplatin alan hayvanların ilaç uygulamasından sonra haftalık vücut ağırlığı artışları, yiyecek ve su alımı açısından önemli bir değişiklik göstermediğini belirtmişlerdir. Bunun tersine testis ve diğer gonadal organların ağırlıklarının önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir. Sisplatin uygulamasının testis boyut ve hacimlerinde ($F= 63,426$; $df = 3,28$; $p<0,001$) anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun sonucu olarak TAI (testis ağırlık indeksi)'de de sisplatin grubunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Kapsamlı literatür taraması sonucu çalışmaların çoğunda, testis ve hayvan ağırlığının sisplatin tedavisinden sonra belirgin ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Ancak ilaç dozu ve kullanılan tedavi edici ajanın süresi değişikçe sonuçlar da değişmektedir. Bizim çalışmamızda, şimdiye kadar yapılmış çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde CIS grubunda hayvan ağırlığı açısından bir düşüş görülse de diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadır. Aynı şekilde testis ve hayvan vücut ağırlıklarında önemli bir değişme olmadığı için TAI'de de istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda sisplatin'in dozu ve uygulama şekline göre testis ve hayvan vücut ağırlığını etkilediği, yapılan çalışmalar sonucu açıkça görülmektedir.

Malekinejad ve ark (2012) yapmış oldukları deneysel çalışmalarında, doksorubisin kaynaklı testis hasarı üzerine silymarin'in koruyucu ve önleyici etkilerini incelemişlerdir. Deney öncesi ve sonrasında hayvan vücut ağırlıklarına bakıldığında, 28 günlük silymarin uygulamasının vücut ağırlığını, kontrol grubuna göre biraz arttırdığını ancak bu sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmada doksorubisin kullanılan hayvanlarda vücut ağırlığı önemli ölçüde düşüş göstermiş ve silymarin ön tedavisi ve eş zamanlı tedavisi, doksorubisin uygulaması sonucu meydana gelen vücut ağırlığındaki azalmayı önemli ölçüde önlemeyi başarmıştır ($p<0,05$). Ayrıca bu çalışmada silymarin'in doksorubisin kaynaklı testis hasarları üzerindeki koruyucu ve önleyici etkilerinin, c-myc gen ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Rafee ve ark (2016) yapmış

oldukları çalışmalarında Wistar albino sıçanlar üzerine karbon tetraklorür ile oluşturulan testis hasarı üzerine 7 mg/kg/gün dozunda silymarin uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda silymarin ile tedavi edilen sıçanlarda, tedavi edilmeyen gruplara kıyasla testis ağırlığında önemli bir artış meydana geldiğini (%76,08) belirtmişlerdir. Moshtaghion ve ark (2013) yapmış oldukları çalışmalarında varikozel hasar modeli üzerine silymarinin olası etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda varikozel grubundaki testis-vücut ağırlığı oranı, kontrol grubu grubuna kıyasla önemli bir düşüş gösterirken, silymarin uygulaması hayvanlarda testis ağırlığında önemli bir ($p < 0,05$) iyileşme gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Alkol ve kadmiyum klorür ile testis hasarı oluşturulan Wistar albino sıçanlarda silymarinin olası etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada 30m/kg/gün dozunda 3 hafta boyunca silymarin kullanılmıştır. Çalışmada kadmiyum klorür verilmeden önce 3 hafta silymarin verilen sıçanlarda vücut ağırlığı önemli ölçüde korunabilmiştir. Bu çalışma sonucunda silymarin uygulamasının alkol ve kadmiyum klorürün erkek üreme sistemi üzerine olan toksik etkilerinin hafiflettiğini ortaya koymuşlardır. Silymarin'in onarıcı etkisinin, alkol ve kadmiyum klorürün oksidatif stres indikatörlerini artırmadaki görevini sınırlama aracı olarak, silymarin öncesi uygulamanın, silymarin sonrası uygulamaya göre daha güçlü olduğu ortaya konulmuştur (Enebeli ve diğerleri 2022). Diyabetik sıçanlar üzerine yapılmış bir çalışmada silymarin ve metformin'in sperm parametreleri ve testislerin histopatolojik değişimleri üzerine olan etkilerininin incelendiği bir diğer deneysel çalışmada, streptozotosin enjeksiyonundan bir gün önce ve deney sonucu hayvan ağırlıkları tartılarak kaydedilmiş ve çalışma sonucunda silymarin ve metformin ile tedavi edilen hayvanlarda vücut ağırlığında kısmi bir iyileşme gözlenmiş olup diyabetik hayvanlar ve tedavi edilen hayvanlar arasında vücut ağırlığında önemli bir fark olduğu ortaya konulmuştur ($p \leq 0,001$). Ayrıca doğal olarak diyabetik grupta, kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla testis ağırlığının oldukça azaldığı gözlenirken ($p \leq 0,001$) silymarin ve metformin tedavisinin testis ağırlığında anlamlı bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir ($p \leq 0,001$) (Pourheydar ve diğerleri 2021).

Biz de yapmış olduğumuz çalışmada testis ağırlıklarına baktığımızda sağ ve sol testis ağırlıklarının, CIS grubunda (sağ testis ortalama 1,520gr, sol testis ortalama 1,526 gr), CON (sağ testis ortalama 1,602 gr, sol testis ortalama 1,642 gr) grubuna nazaran biraz azaldığı, ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görüldü. Bununla birlikte düşük ve yüksek doz tedavi grupları olan CIS+SM50 (sağ testis ortalama 1.571 gr, sol testis ortalama 1,549 gr) ve CIS+SM200 (sağ testis ortalama 1,717 gr, sol testis ortalama 1,704 gr) gruplarında ise testis ağırlıklarında, CIS grubuna kıyasla bir artış olduğu gözlemlendi ve CON grubu ile yaklaşık aynı düzeyde olduğu görüldü, ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı

bulunmadı ($p>0,005$). Bu sonuçlara dayanarak silymarin tedavisinin hem düşük doz hem yüksek doz verilen gruplarda, sisplatin uygulamasının testis ağırlığında meydana getirdiği hasarı azalttığı söylenebilir.

Ateşşahin ve ark (2006) sıçanlarda sisplatin ile indüklenmiş testis hasarına karşı melatoninin olası koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında 7 mg/kg/gün dozda, intraperitoneal olarak enjekte ettikleri sisplatine karşı, 10 mg/kg/gün dozda melatonin uygulamış ve testis üzerinde meydana gelen morfolojik değişimleri rapor etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda testis ağırlığı kontrol grubunda ortalama $1,29\pm 0,03$ gr, sisplatin grubunda ortalama $1,16\pm 0,07$ gr, sisplatin+melatonin grubunda ortalama $1,25\pm 0,05$ gr olarak tespit edilmiştir. Testis longitudinal çapı kontrol grubunda ortalama $1,84\pm 0,03$ cm, sisplatin grubunda ortalama $1,79\pm 0,15$ cm, sisplatin+melatonin grubunda ortalama $1,85\pm 0,02$ cm olarak rapor edilmiştir. Testis transvers çapı ise kontrol grubunda ortalama $0,99\pm 0,03$ cm, sisplatin grubunda ortalama $0,95 \pm 0,02$ ve sisplatin+melatonin grubunda ortalama $0,99\pm 0,01$ cm olarak belirtilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre sisplatin, testis morfolojik uzunluk ve ağırlıklarında belirgin ölçüde azalmaya sebep olmuştur. Nosseir ve ark (2012) yapmış oldukları deneysel çalışmada, Wistar albino sıçan testisi üzerine monosodyum glutamatın toksik etkisini incelemiş ve bu çalışma sonucunda testis longitudinal ve transvers çaplarının monosodyum glutamat uygulaması sonucu azaldığını ve bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir ($p<0,005$). Çalıştıkları hayvanlar 10 haftalık (100-150gr) olup testis longitudinal çap ölçüm sonuçları kontrol grubunda ortalama $16,05\pm 0,20$ mm ve hasarlı grup ortalama $10,22\pm 0,54$ mm olarak verilmiştir. Transvers çap ölçüm sonuçları ise kontrol grubunda ortalama $7,20 \pm 0,17$ mm ve hasarlı grup ortalama $3,01\pm 0,01$ mm olarak tespit edilmiştir.

Biz, yapmış olduğumuz çalışmada 300-350 gr ağırlığında hayvanlar kullandık ve testis longitudinal çaplarını CON grubunda sırası ile sağ testiste ortalama $20,98\pm 1,016$ mm, sol testiste ortalama $21,35\pm 1,468$ mm, SM200 grubunda sağ testiste $21,54\pm 1,109$ mm ve sol testiste ise $20,32\pm 3,546$ mm olarak belirledik. CIS grubunda ise longitudinal çap sağ testiste ortalama $11,24\pm 0,5317$ mm ve sol testiste ortalama $19,81\pm 2,371$ olarak belirlendi. Bu üç grup arasındaki değerler arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. CIS+SM50 grubunda longitudinal çap sağ testiste ortalama $11,49\pm 0,6373$ mm ve sol testiste ortalama $21,20\pm 1,269$ mm olarak bulundu. CIS+SM200 grubunda ise ortalama $21,65\pm 1,574$ mm olarak belirlendi. Bu verilere dayanarak gruplar arasında longitudinal çap açısından anlamlı bir farklılık görülmedi. Aynı şekilde transvers çap ölçümü de alındı. Transvers çap ölçümü CON grubunda sağ testiste ortalama $11,49\pm 0,6373$ mm ve sol testiste ortalama $11,43\pm 1,286$ mm, SM200 grubunda sağ testis

ortalama $11,64 \pm 0,5725$ mm, CIS grubunda sağ testiste ortalama $11,24 \pm 0,5317$ mm, CIS+SM50 grubunda sağ testis ortalama $11,49 \pm 0,6373$ mm sol testis ortalama $11,43 \pm 1,286$ mm ve son olarak CIS+SM200 grubunda sağ testis ortalama $11,49 \pm 0,6373$ mm sol testis ortalama $11,43 \pm 1,286$ mm uzunlukta ölçüldü. Bu ölçümler için gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Yapılan detaylı literatür taraması sonucunda sisplatin veya silymarin kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda transvers ve longitudinal çap ölçümlerinin alınmadığı görüldü. Daha kapsamlı sonuçlar için, ileride yapılacak çalışmalarda morfometrik olarak testiste meydana gelebilecek olası değişikliklerin gözle görülebilir düzeyde olması ihtimali göz önünde bulundurularak, bakılacak parametreler arasına transvers ve longitudinal çap ölçümlerinin de eklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Iman ve ark (2014) sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarı üzerine arjunolik asitin koruyucu etkisini inceledikleri deneysel çalışmalarında, bizim çalışmamızda kullandığımız doz olan 7 mg/kg/gün dozda sisplatin intraperitoneal enjeksiyon ile uygulamış ve tedavi grubuna 10 gün boyunca arjunolik asit 20 mg/kg/gün dozda verilmiştir, $3.$ günde ise sisplatin enjeksiyonu yapılmıştır. Hayvanlar $10.$ günde sakrifiye edilmişlerdir. Çalışmanın sonucunda sisplatin uygulanan grupta tubulus seminiferi contorti'lerin çaplarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Arjunolik asit uygulamasından sonra ise önemli farklılıkların gözlemlendiği rapor edilmiştir. Azarbarz ve ark (2020) yapmış oldukları deneysel çalışmada sodyum hidrojen sülfürün (NaHS), sisplatin kaynaklı testis hasarında ne gibi etkileri olduğunu araştırmayı amaçlamışlardır. Bu sebeple Sprague-Dawley sıçanlara 5 mg/kg/gün dozda sisplatin tek doz olarak verilmiş ve ardından tedavi edici ajan olarak 15 gün boyunca intraperitoneal olarak 200 µg/kg/gün dozda NaHS verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda tubulus seminiferi contorti çapı ve germinal epitel yüksekliği, sisplatin enjeksiyonu sonucunda anlamlı düzeyde azalırken ($p < 0,01$), NaHS tedavi grubunda ise sisplatin grubuna kıyasla tubul çapı ve germinal epitel yüksekliği açısından önemli düzeyde artış tespit edilmiştir. Coşkun ve ark (2013) çalışmalarında sisplatinin oluşturduğu testis toksisitesi üzerine asetil L-karnitinin olası koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Tedavi grubuna sisplatin uygulamasından önce L-karnitin ile ön işlem uygulanmış (200 mg/kg/gün dozda) ve ardından 30 dk sonra tek doz 13 mg/kg/gün sisplatin intraperitoneal olarak verilmiştir. Sisplatin uygulamasından 72 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş ve dokuları alınmıştır. Sadece sisplatin uygulanan grupta tubulus seminiferi contorti çapları kontrol ve L-karnitin gruplarına göre oldukça düşük seviyede bulunmuştur ($p = 0,000$). Germinal epitel kalınlığı da sisplatin uygulanan grupta, diğer gruplara nazaran oldukça düşük düzeyde ölçülmüştür ($p = 0,000$). L-karnitin tedavisinin, sisplatin

uygulamasının verdiği hasarı anlamlı düzeyde azalttığını çalışma sonucunda belirtmişlerdir. Favareto ve ark (2011) ergenlik döneminde sisplatin uygulanan yetişkin sıçanlarda testis ve sperm motilitesindeki değişiklikleri araştırdıkları çalışmalarında klinik uygulamaları temel olarak farklı bir yol izlemiş ve insanda uygulanan dozu sıçanlara uyarlayarak sisplatin grubuna %0,9 salın solüsyonunda seyreltilmiş 1 mg/kg/gün dozda sisplatin haftada 5 gün süre ile 3 hafta boyunca verilmiştir. Çalışma sonucunda elde ettikleri verileri değerlendirirken sisplatin grubundaki sıçan testislerine ait dokularda tubulus seminiferi contorti çaplarında, kontrol grubundakilere kıyasla önemli bir azalma olduğu rapor edilmiş ($p<0,05$) ancak germinal epitel kalınlığında anlamlı bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Sonuçlara bakıldığında sisplatinin testis histolojisine zarar vermesine rağmen spermatogenez kinetiğinde ve tubulus seminiferi contorti başına Sertoli hücre sayısında herhangi bir bozulma olmadığını açıklamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada Sprague-Dawley sıçanlarda sisplatin ile testis hasarı oluşturulmuş ve D-Ribose-L-Sistein'in (DRLC) besinsel diyet takviyesinin bu toksik maruziyete karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. Gruplardan birine intraperitoneal olacak şekilde tek doz 8 mg/kg/gün sisplatin verilmiş ve arkasından oral gavaj yolu ile 30 mg/kg/gün dozda DRLC verilmiştir. Başka bir gruba intraperitoneal olarak tek doz 8 mg/kg/gün sisplatin ve ardından oral gavaj yolu ile 50 mg/kg/gün dozda C vitamini verilmiştir. Bir diğer tedavi grubuna ise intraperitoneal yolla tek doz 8 mg/kg/gün sisplatin verilmiş ve hemen ardından oral gavaj yolu ile 30 mg/kg/gün dozda DRLC ve 50 mg/kg/gün dozda C vitamini verilmiştir. Deneyin 56 gün sürdüğü ayrıca belirtilmiş ancak hayvanlara kaçınıcı günde sisplatin verildiği açıkça makalede belirtilmemiştir (Adelakun ve diğerleri 2021). Deney sonuçlarına bakıldığında sisplatin uygulamasının kontrol grubuna göre tubulus seminiferi contorti çapını ve enine kesit alanını anlamlı düzeyde azalttığını ortaya koymuşlardır ($p<0,05$). Tedavi gruplarında (DRLC ve DRLC+Vit.C grupları) ise sisplatin grubuna kıyasla tubulus seminiferi contorti çapı ve enine kesit alanı istatistiksel açıdan önemli düzeyde artmıştır ($p<0,05$) (Adelakun ve diğerleri 2021). Marzban ve ark (2017) yapmış oldukları deneysel çalışmalarında, gama ışınlarının testis üzerine zararlı etkileri ve bu etkilerin üzerine silymarin'in koruyucu rolünü incelemişlerdir. Çalışma süreci içerisinde bir gruba 100mg/kg/gün silymarin verildikten sonra hayvanlar 24 saat 2 Gy γ -ışınları ile ışınlanmıştır. Diğer gruba ise 200mg/kg/gün silymarin verildikten sonra hayvanlar 24 saat 2 Gy γ -ışınları ile ışınlanmıştır. Silymarin deney sırasında, gama ışınlanmasından 24 saat önce oral gavaj yöntemi ile doğrudan farelerin midesine verilmiştir. Bu çalışma sonucunda tubulus seminiferi contorti çapı yalnızca γ ışınlarına maruz kalan grupta kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde düşüş göstermiştir ($p=0,0078$). Aynı şekilde lümen çapı ve germinal epitel kalınlığı da yalnızca γ ışınlarına maruz kalan grupta, kontrol grubuna

kıyasla önemli bir düşüş göstermiştir. Düşük doz (Silymarin (100 mg/kg) & γ -ışınları) ve yüksek doz (Silymarin (200 mg/kg) & γ -ışınları) tedavi gruplarında ise tubulus seminiferi contorti çapı, lümen çapı ve germinal epitel kalınlığı, yalnızca γ ışınlarına maruz kalan gruba kıyasla istatistiksel açıdan önemli düzeyde artış göstermiştir. Sonuçlara göre, yüksek doz silymarin alan grupta, düşük doz silymarin alan gruba kıyasla testis histolojik yapısı daha iyi korunmuştur. Afsar ve ark (2017) ise yetişkin erkek sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarı üzerine Acacia hydaspica etil (AHE) asetat ekstresinin ve silymarinin olası faydalı etkilerini inceledikleri çalışmalarında gruptan birine, testis toksisitesi oluşturmak amacı ile deneyin 16. gününde tek doz olacak şekilde 7,5 mg/kg/gün dozda gün sisplatin verilmiş ve oral yolla 21 gün distile su almıştır. Diğer gruptan birine, sürekli oral distile su uygulamasından sonra 16. günde sisplatin (i.p.) enjeksiyonu yapılmış ve 16. günden 21. güne kadar 400 mg/kg/gün dozda AHE oral yolla verilmiştir. Silymarin tedavi grubuna ise 100 mg/kg/gün dozda silymarin gün aşırı (11 doz/21 gün) olacak şekilde uygulanmış ve 16. günde 7,5 mg/kg/gün dozda sisplatin intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve sonuçlar incelenmiştir. Çalışma sonucunda tubulus seminiferi contorti çapının ve germinal epitel yüksekliğinin, kontrol grubuna kıyasla sisplatin grubunda anlamlı bir düzeyde azaldığı ortaya konulmuştur ($p < 0,001$). Silymarin ile tedavi edilen hasar grubuna bakıldığında tubul çapı ve germinal epitel yüksekliği, sisplatin grubuna kıyasla oldukça iyi korunmuş olarak gözlenmiştir. Sonuçlara bakılacak olursa kontrol grubu tubulus seminiferi contorti çapı $177,4 \pm 2,04 \mu\text{m}$, germinal epitel yüksekliği $70,90 \pm 1,25 \mu\text{m}$, silymarin tedavi grubu tubulus seminiferi contorti çapı $173,8 \pm 1,25 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği $66,33 \pm 0,79 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir ve aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sisplatin grubunda ise tubulus seminiferi contorti çapı $163,9 \pm 1,60 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği $21,15 \pm 0,86 \mu\text{m}$ olarak kayıt edilmiştir. Sisplatin grubu ile kontrol ve silymarin grupları arasında istatistiksel açıdan oldukça anlamlı bir farklılık göze çarpmaktadır ($p < 0,0001$). Silymarin tedavisinin, sisplatin hasarına karşı oldukça koruyucu bir etkisi olduğunu bu çalışma sonucu ortaya koymuşlardır.

Biz kendi çalışmamızda tubulus seminiferi contorti çaplarını ortalama olarak CON grubunda $323,9 \pm 40,25 \mu\text{m}$ ve SM200 grubunda $326,0 \pm 27,51 \mu\text{m}$ olarak ölçtük. CIS grubunda ise $314,2 \pm 25,96 \mu\text{m}$ olarak belirledik. SM200 grubu ve CON grubu arasında istatistiksel olarak biraz anlamlı bulundu. SM200 grubuna ait tubulus seminiferi contorti çapları kontrol grubuna kıyasla çok az yüksek bulundu ($p; 0,0027$). Dolayısı ile yüksek doz silymarinin herhangi bir toksik özelliği olmadığı bu veri sonucunda da açıkça görülmektedir. CIS grubunda tubul çapları istatistiksel olarak hem CON hem de SM200 grupları ile istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p; 0,0002$). CIS grubuna ait tubullerin çapları önemli ölçüde düşük çıktı.

CIS+SM50 grubunda tubulus seminiferi contorti çapları ortalama $320,7 \pm 33,28 \mu\text{m}$ ve CIS+SM200 grubunda ise $323,6 \pm 28,88 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Her iki tedavi grubu da CIS grubundan istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p;0,0041$). Bu sonuçlara bakılacak olursa düşük doz tedavi grubunda (CIS+SM50) tubul çapı daha az korunmuşken yüksek doz tedavi grubunda (CIS+SM200) tubul çapı neredeyse kontrol grubuna yakın düzeyde ölçüldü. Bu sonuçlara göre yüksek doz tedavinin daha faydalı olduğu ve dokuyu sispaltinin toksik etkisine göre daha iyi koruduğu söylenebilir.

Çalışmamız sonucunda germinal epitel kalınlıkları ortalama olarak CON grubunda $92,78 \pm 7,105 \mu\text{m}$, SM200 grubunda $90,82 \pm 4,842 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi. CIS grubunda germinal epitel kalınlığı ortalama $78,72 \pm 10,73 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Bu değer CON ve SM200 gruplarına kıyasla CIS grubunda dramatik bir düşüş gösterdi ve bu gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük çıktı ($p < 0,0001$). Bu sonuçlara bakarak sispaltinin germinal epitel yapısına önemli ölçüde zarar verdiğini söyleyebiliriz. Diğer taraftan CIS+SM50 grubunda bu parametre ortalama $87,81 \pm 11,79 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Bu değer, CIS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Düşük doz silymarinin, sispaltin toksisitesini azalttığı bu grupta görüldü ($p < 0,0001$). Düşük doz antioksidan uygulanmasına rağmen oldukça iyi düzeyde bir koruma sağlandığı görülmektedir. CIS+SM200 grubunda ise germinal epitel kalınlığı ortalama $90,21 \pm 9,004 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Bu parametre, CIS grubuna kıyasla oldukça yüksek düzeyde bulundu. Tüm bu sonuçları yorumlayacak olursak, uygulanan silymarin dozu arttıkça, testiste yer alan germinal epitel yapısının, sispaltinin verdiği hasara karşı korunma düzeyi de o kadar artmaktadır denilebilir.

Manesh ve ark (2018) yapmış oldukları deneysel çalışmada iki grup hayvana, deneyin 1. ve 5. haftalarında sırası ile $2,5 \text{ mg/kg/gün}$ ve 5 mg/kg/gün olmak üzere iki tekrarlı doz sispaltin intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Bu işleminden 8 hafta sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir. Deney sonucunda incelenen preparatlarda tubulus seminiferi contorti çapı ve germinal epitel kalınlığı açısından da kontrol ve deney grupları arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0,0001$). Ayrıca lamina propria'nın PNA lektinine pozitif reaksiyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Nosseir ve ark (2012)'nin sıçan testislerinde monosodyum glutamatın toksisitesi üzerine yapmış oldukları çalışmalarında lamina propria kalınlıklarını ölçmüş ve kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla monosodyum glutamat alan grupta yer alan hayvanların lamina propria tabakalarında dramatik bir düşüş olduğunu göstermişlerdir (kontrol grubu ortalama $8.20 \pm 2.70 \mu\text{m}$, monosodyum glutamat hasat grubu ortalama $2.10 \pm 3.80 \mu\text{m}$). Bu

çalışma sonuçlarına göre toksik etkili bir madde uygulandığında lamina propria tabakasının hasar gördüğü söylenebilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada lamina propria tabakasını içerdiği için bazal tabaka kalınlıklarını da ölçtük. Bazal tabaka kalınlıkları; CON grubunda ortalama $7,739 \pm 1,625 \mu\text{m}$, SM200 grubunda ortalama $7,060 \pm 1,858 \mu\text{m}$, CIS grubunda ortalama $4,440 \pm 1,210 \mu\text{m}$, CIS+SM50 grubunda ortalama $6,655 \pm 0,9188 \mu\text{m}$, CIS+SM200 grubunda ise $7,477 \pm 1,173 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadı. CIS grubunda ise CON ve SM200 grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş görüldü ($p < 0,0001$). CIS ve CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görüldü. Bu sonuçlara bakıldığında sisplatinin sıçan testis bazal tabaka yapısına verdiği hasarı, silymarin uygulamasının önemli ölçüde engellediğini söyleyebiliriz. Literatüre baktığımızda sisplatin testis hasar modelinde birçok parametre incelenmiş olmasına rağmen bazal tabaka kalınlığının incelenmiş olduğunu gördük. Bundan sonraki çalışmalarda bu parametrenin de ölçülmesinin literatüre önemli katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Bostancıeri ve ark (2022) kuersetinin sisplatin hasarına karşı olası koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında, sisplatin uyguladıkları grupta bazal membrandan spermatogoninin ayrılmış olduğunu, tüm epitel duvar boyunca hücreler arasındaki boşlukların artmış olduğunu, germinal epitel tabakasının dejenere olduğunu ve hücrelerin lümeneye döküldüğünü, tubulus seminiferi contortide atrofi ve vakuolizasyonun görüldüğünü ve dev hücre oluşumlarının gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. PAS boyama uyguladıkları preparatlarda ise tubulus seminiferi contortilerin çevresinde hyalinizasyon görüldüğünü de ayrıca belirtmişlerdir. Tian ve ark (2018) sıçanlarda üzüm çekirdeği prosiyanidin özünün, sisplatin ile hasarlanmış testis üzerindeki olası koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında testis preparatlarını PAS boyama ile inceleyerek bu kesitlerde sisplatin grubunda tubulus seminiferi contorti lümenine hasarlı spermatojenik epitel hücrelerinin düştüğünü belirtmişlerdir ve bunun yanı sıra interstisyel arter hiperemisi ile birlikte vakuollerin gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Yaman ve ark (2017) yapmış oldukları deneysel çalışmada sıçan testislerinde sisplatin (5 mg/kg/gün tek doz) kaynaklı hasar üzerine L-karnitin'in olası etkilerini araştırmış ve bu çalışmada hem erişkin hem de prepubertal dönemdeki H&E ve PAS ile boyanmış kesitlerde tubulus seminiferi contorti epitelinin histolojisi incelenmiştir. Puberte öncesi dönemde sisplatine maruz kalan gruptaki histopatolojik değişiklikler çok belirgin olarak gözlemlenmiş ve interstisyel dokuda ödem, germ hücrelerinin dejenere olmasına bağlı olarak epitel dokuda düzensiz boşluklarla tubullerde dejenerasyon görülmüştür. Ayrıca kesitlerde spermatozoid gruplarının ayrılmış ve lümen içerisinde olgunlaşmamış hücrelerin varlığı rapor edilmiştir.

Biz çalışmamızda bazal lamina kalınlığını PAS boyama yapılan preparatlarda inceledik ve sonuçlar gruplara göre şu şekilde rapor edildi; CON grubunda ortalama $6,719 \pm 0,7710 \mu\text{m}$, SM200 grubunda ortalama $6,447 \pm 0,8259 \mu\text{m}$, CIS grubunda ortalama $3,720 \pm 1,115 \mu\text{m}$, CIS+SM50 grubunda ortalama $4,886 \pm 0,9893 \mu\text{m}$, CIS+SM200 grubunda ise ortalama $5,518 \pm 0,8045 \mu\text{m}$ olarak belirledik. CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi ve iki gruba ait preparatlar birbirine çok benzer şekilde görüntülendi. CIS grubu ile CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan çok anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p < 0,0001$). Histolojik preparatlarda görüldüğü gibi, sisplatin uygulamasının bazal membran tabakasına oldukça zarar verdiği söylenebilir. Düşük doz grubu olan CIS+SM50 grubunda bazal membran kalınlığı CIS grubuna göre oldukça arttı ($p < 0,0001$). CIS grubu ile yüksek doz tedavi grubu olan CIS+SM200 grubu arasındaki farklılık CIS+SM50 grubuna kıyasla biraz daha belirgin hale geldi ($p < 0,0001$). Ayrıca CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($p < 0,0001$), yani bu durumda silymarinin dozunun artması, bazal lamina kalınlığının korunmasında önemli bir etken oldu denilebilir. Bu deney sonucunda PAS boyalı preparatlarda incelemiş olduğumuz bazal membran kalınlıkları göz önüne alındığında, silymarin uygulamasının bazal membran yapısını koruduğu ve dozun yükselmesinin koruma miktarını artırdığını söyleyebiliriz. İleride yapılacak olan deneysel çalışmaların histopatolojik bölümünde bu parametrenin de diğer ölçüm parametrelerine eklenmesinin literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Ijaz ve ark (2020a) yapmış oldukları deneysel çalışmalarında Sprague Dawley cinsi sıçanlar üzerine (tek doz) 10 mg/kg/gün doz sisplatin kullanarak testis hasarı oluşturmuş ve kastisin'in (CAS) (50 mg/kg/gün dozda) sisplatinin meydana getirdiği hasar üzerindeki olası etkilerini incelemişlerdir. Deney sonucunda dokular incelendikten sonra tunica albuginea yüksekliğinin kontrol grubu ($21,2 \pm 0,70 \mu\text{m}$) ile kıyaslandığında sisplatin toksisitesi grubundaki hayvanlarda ($15,05 \pm 0,26 \mu\text{m}$) önemli ölçüde azalmış olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer yandan sisplatin toksisitesi grubuna CAS tedavisi uygulandığında ise tunica albuginea kalınlığının önemli ölçüde arttığını kaydetmişlerdir (tedavi grubu ortalama $19,5 \pm 0,31 \mu\text{m}$). Ijaz ve ark (2020b) yapmış oldukları başka bir deneysel çalışmada sisplatin kaynaklı testis toksisitesi (10 mg/kg/gün doz) oluşturmuş ve Fraxinus xanthoxyloides'in metanolik özünün (200 mg/kg/gün) ve 400 mg/kg/gün dozlarda sisplatin toksisitesi üzerindeki olası etkilerini incelemişlerdir. Deney sonucunda histolojik incelemeler sonucu sisplatin verilen gruptaki hayvanlarda tubulus seminiferi contorti çapında (kontrol grubu ortalama $178,52 \pm 0,5 \mu\text{m}$, sisplatin grubu ortalama $66,55 \pm 0,99 \mu\text{m}$), tunica albuginea kalınlığında (kontrol grubu ortalama $22,89 \pm 0,45 \mu\text{m}$, sisplatin grubu ortalama $12,31 \pm 0,76 \mu\text{m}$) ve germinal epitel kalınlığında (kontrol grubu

ortalama $72,79 \pm 0,57 \mu\text{m}$, sisplatin grubu ortalama $20,06 \pm 0,42 \mu\text{m}$) istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma görüldüğü rapor edilmiştir ($p < 0,05$). Fraxinus ile tedavi edilen gruplarda ise bu parametrelerin, sisplatin grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı rapor edilmiştir ($p < 0,05$). 200 mg/kg/gün doz verilen grupta tubulus seminiferi contorti çapı ortalaması $176,03 \pm 0,38 \mu\text{m}$, tunica albuginea kalınlığı ortalaması $15,54 \pm 0,34 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüşken germinal epitel kalınlığı ortalaması $49,36 \pm 0,99 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. 400 mg/kg/gün doz verilen grupta ise tunica albuginea kalınlığı ortalaması $18,57 \pm 0,31 \mu\text{m}$, germinal epitel kalınlık ortalaması $52,68 \pm 0,47 \mu\text{m}$, ve tubulus seminiferi contorti çapı ortalaması $178,28 \pm 0,59 \mu\text{m}$ olarak belirtilmiştir. Jahan ve ark (2018), sisplatinin testis toksisitesi üzerine flavonol kuersetin ve disakkarit rutinozdan oluşan bir flavon türevidir olan rutin'in olası iyileştirici etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 7 mg/kg/gün dozda sisplatin verdikleri hayvanlara 13 gün boyunca oral gavaj yolu ile 75 mg/kg/gün dozda rutin verilmişlerdir. Deney sonucunda sisplatin uygulaması yapılan grupta tubulus seminiferi contortilerde önemli miktarda dejenerasyon ile birlikte spermatogenez safhasında belirgin bir bozulma, tunica albuginea kalınlığında ve tubulus seminiferi contorti çapında azalma, germinal epitel dokusunun dökülmesi ve interstisyel boşlukta artma olduğu rapor edilmiştir. sisplatin+rutin grubunda ise tunica albuginea kalınlığında, sisplatin uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Sisplatin+rutin grubunda, sisplatin grubu ile kıyaslandığında tubulus seminiferi contorti lümen çapı ($p < 0,01$) ve interstisyel boşluk ($p < 0,05$) değerlerinin önemli ölçüde düzeldiği belirtilmiştir. Sonuçlara bakıldığında tunica albuginea kalınlıkları, kontrol grubunda ortalama $30,55 \pm 0,37 \mu\text{m}$, sisplatin grubunda ortalama $15,96 \pm 0,53 \mu\text{m}$, sisplatin+rutin grubunda $22 \pm 0,53 \mu\text{m}$ olarak kaydedilmiştir. Adelakun ve ark (2022) gerçekleştirmiş oldukları deneysel çalışmalarında yetişkin Sprague-Dawley sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasar modeli oluşturmuş ve bu toksik etkiye karşı çinko sülfatın besin takviyesinin (Zn sülfat) olası koruyucu etkileri olduğunu araştırmışlardır. Sisplatin hasar grubu tek doz olacak şekilde 10 mg/kg/gün dozda (i.p.) sisplatin maruz bırakılmış ve sisplatin+Zn sülfat grubu ise testiküler toksisite indüklenmesinden hemen sonra 1 mg/kg/gün dozda Zn sülfat ile tedavi edilmiş ve işlem 8 hafta sürmüştür. Deney sonucunda kontrol grubu verileri ile kıyaslandığında sisplatin hasar grubundaki hayvanlarda tubulus seminiferi contorti çapı ve germinal epitel kalınlığında önemli bir azalma ($p < 0,05$) meydana gelmiş, sisplatin+Zn sülfat grubundaki hayvanlarda ise sisplatin hasar grubundaki hayvanlara kıyasla tubulus seminiferi contorti çapı ve germinal epitel kalınlığında önemli bir artış gerçekleştiği ($p < 0,05$) gözlenmiştir. Sisplatin hasar grubundaki hayvanların tunica albuginea kalınlıkları kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma göstermiş ($p < 0,05$) ancak sisplatin+Zn sülfat grubundaki hayvanlarda,

sisplatin grubundaki hayvanların tunica albuginealarına kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p<0,05$).

Biz çalışmamızda tunica albuginea kalınlıklarını gruplara göre şu şekilde bulduk; CON grubu ortalama $39,19\pm4,704 \mu\text{m}$, SM200 ortalama grubunda $35,23\pm3,287 \mu\text{m}$, CIS grubunda ortalama $24,37\pm4,764 \mu\text{m}$, CIS+SM50 grubunda ortalama $24,63\pm4,418 \mu\text{m}$ ve CIS+SM200 grubunda ise ortalama $30,19\pm7,257 \mu\text{m}$. CIS grubunda tunica albuginea kalınlığı kontrol grubuna kıyasla, literatürde yer alan diğer çalışmalarda olduğu gibi istatistiksel olarak oldukça düşük olarak belirlendi ($p<0,0001$). CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı. CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları yani düşük ve yüksek doz tedavi grupları, CIS grubuna kıyasla belirgin bir farklılık gösterdi. CIS+SM50 grubu, CIS grubuna kıyasla daha kalın ölçülürken CIS+SM200 grubu da CIS+SM50 grubundan daha yüksek değerde ölçüldü. Biz daha önce bahsedilen diğer literatürdeki çalışmalardan farklı olarak silymarın kullandığımız tedavi gruplarımızda tunica albuginea kalınlığını CIS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulduk. Diğer çalışmalarda tunica albuginea kalınlığının kullanılan ilaç/antioksidana bağlı olarak arttığını ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını belirtilmiş olduğu halde bizim çalışmamızda tunica albuginea tabakasının diğer çalışmalara kıyasla daha iyi korunmuş olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızın sonucu olarak silymarın hem düşük hem yüksek dozda, tunica albuginea tabakasını sisplatin hasarına karşı koruyabilmiş hatta doz arttıkça koruma düzeyi de artmıştır. Buna dayanarak silymarının özellikle yüksek dozda sisplatin hasarına karşı tunica albuginea tabakasını anlamlı düzeyde koruduğunu söyleyebiliriz.

Nosseir ve ark (2012) monosonyum glutamatın sıçan testisi üzerindeki toksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında testis arteriollerinin çaplarını da ölçmüşlerdir. Buna göre kontrol grubunda testis arter çapları ortalama $21.30\pm2.90 \mu\text{m}$ ve monosodyum hasar grubunda ortalama $10.40\pm4.90 \mu\text{m}$ olarak kaydedilmiştir.

Biz de kendi çalışmamızda histometrik parametreleri incelerken, sisplatin kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda genellikle tubul çapı, germinal epitel kalınlığı gibi yapıların ölçüldüğünü ancak hemen hemen hiçbir sisplatin çalışmasında arter çapı ölçümü alınmadığını belirledik ve arter çapları arasında sisplatin hasarı ile ilgili ne gibi değişikliklerin olabileceğini görebilmek için parametrelimize arter çapını da ekledik. Sonuç olarak CON grubunda arter çapı ortalama $21,43\pm2,210 \mu\text{m}$, SM200 grubunda ortalama $21,48\pm3,268 \mu\text{m}$, CIS grubunda $18,26\pm2,978 \mu\text{m}$, CIS+SM50 grubunda $19,67\pm3,072 \mu\text{m}$, CIS+SM200 grubunda ise $20,31\pm2,895 \mu\text{m}$ olarak belirledik. CON ve SM200 grupları arasında bir farklılık görülmedi. Bu iki grup ile CIS grubu arasında istatistiksel açıdan oldukça büyük farklılık görüldü

($p < 0,0001$). CIS+SM50 grubunda CIS grubuna kıyasla arter çapı anlamlı düzeyde artış gösterdi ve CIS+200SM grubunda arter çapı kontrol grubuna daha yakın bir değer gösterdi. Bu sonuçlara bakarak sisplatinin, diğer testis dokularının yanı sıra arteriyel dokulara da önemli derecede zarar verdiği görülmektedir. Silymarin ise düşük ya da yüksek dozda kullanıldığında sisplatinin verdiği hasara karşı koruyucu olarak görev yapmaktadır. Dolayısıyla silymarin yüksek dozda kullanıldığında, testis arteriollerini sisplatinin toksik etkisine karşı daha iyi koruyabilmektedir diyebiliriz.

Çalışmamızda Nosseir ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmada yer alan tubuler atrofi sınıflamasından farklı olarak testiste peritubuler atrofi oranını hesapladık. Atrofik tubul yüzdeleri, CON grubunda %6,7, SM200 grubunda %2,6, CIS grubunda %74,1, CIS+SM50 grubunda %50,7 ve CIS+SM200 grubunda ise %32 olarak belirlendi. CON ve SM200 grubunda bir farklılık görülmedi ancak CIS grubunda atrofik tubul yüzdesi diğer tüm gruplardan çok daha yüksek olarak görüldü. CIS+SM50 grubunda bu değer CIS grubuna kıyasla azaldı ve CIS+SM200 grubunda bu farklılık çok daha belirgin hale geldi. Bu deneyde sisplatinin tubul yapısına oldukça zarar verdiği gözlemlendi ve silymarin hem düşük hem yüksek dozda anlamlı düzeyde koruma sağladı. Diğer parametrelerde olduğu gibi silymarinin, özellikle yüksek dozda, testis tubul yapısını sisplatin toksisitesine karşı önemli düzeyde koruma sağladığını söyleyebiliriz.

Sisplatin tedavisi sperm sayısı, sperm hareketliliği ve testis ağırlığı gibi sperm parametrelerini negatif yönde etkileyerek önemli testiküler hasara neden olabilir (Jahnukainen ve diğerleri 2011; Shati, 2019). Sisplatin ile testis hasarı oluşturulup resveratrolün bu hasar üzerine olası etkilerinin incelendiği deneysel bir çalışmada resveratrol kontrol grubuna ait hayvanlarda vücut ağırlığı, testis ağırlığı ve sperm parametrelerinde kontrol grubuna kıyasla bir değişim gözlenmezken, sisplatin+resveratrol grubu hayvanlarda resveratrol uygulaması, son vücut ağırlığı ve testis ağırlığı, sperm sayısı ve hareketliliğini ($p > 0,001$) ve sisplatin ile hasar oluşturulan hayvanlara kıyasla kuyuksuz, başsız ve kuyruk kıvrımlı sperm yüzdelerini önemli ölçüde düşürmüş ve toplamda daha az anormallikle sonuçlandırmıştır ($p > 0,001$) (Shati, 2019). Yaman ve ark (2018) L-karnitin'in sisplatin testis toksisitesine olası etkileri üzerine yapmış oldukları deneysel çalışmalarında kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla, sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda sperm sayısı ($p < 0,01$), sperm hareketliliği ($p < 0,001$) ve sperm canlılığında önemli bir düşüş meydana geldiği gözlenmiştir ($p < 0,001$) ve kontrol grubunda yer alan hayvanlara kıyasla sisplatin grubundaki hayvanlarda anormal morfolojiye sahip sperm yüzdesinde artış ($p < 0,01$) meydana geldiği rapor edilmiştir. Sisplatin+ L-karnitin grubundaki hayvanlarda ise uygulanan L-karnitin, değişen bu sperm özelliklerini kısmen azaltmış ve sperm

sayısı ($p<0,05$) ile sperm canlılığının ($p<0,001$) önemli ölçüde artırmıştır. Gholami Jourabi ve ark (2021) sıçanlarda sisplatinin sebep olduğu toksik etkilerin üzerine metilen mavisinin olası iyileştirici özelliklerini inceledikleri deneysel çalışmalarında sisplatin toksisitesi 5 mg/kg/gün tek doz olarak belirlenmiş ve daha sonra metilen mavisi verilen tedavi grubuna sisplatin uygulamasından sonra 7 gün süre ile 2 mg/kg/gün ve 4 mg/kg/gün doz olmak üzere 2 farklı gruba metilen mavisi tedavi ajanı olarak verilmiştir. Deney sonucunda sisplatin grubundaki hayvanlarda sperm sayısı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,001$). 2 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta sperm sayısı istatistiksel olarak anlamsız düzeyde artış göstermiştir. Bununla birlikte 4 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta ise sperm sayısındaki artış sisplatin grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,001$). Sisplatin grubundaki hayvanlarda sperm canlılık yüzdesi de kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,001$). 2 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta, sisplatin grubuna kıyasla spermatozoa sağkalımında anlamlı bir artış gerçekleşmemiştir ancak sperm sağkalımında anlamlı bir artış meydana gelmiştir. 4 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta ise sperm sağkalımındaki artış sisplatin grubuna kıyasla 4 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirtilmiştir ($p<0,001$). Spermelerde görülen morfolojik anormallikler sisplatin grubunda ve 2 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede artmıştır ($p<0,001$). Kontrol grubuna kıyasla 4 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta morfolojik yapı açısından anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,8$). Her iki tedavi grubunda da sperm morfolojik anormallik yüzdesi sisplatin grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,001$). 2 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta sperm hareketliliği yüzdesindeki artış, sisplatin grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 4 mg/kg/gün doz tedavi alan grupta da sisplatin grubuna göre sperm hareketliliğinde yüksek düzeyde anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,001$). Ateşşahin ve ark (2006) sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarında sperm özellikleri ve bu toksisiteye karşı likopenin olası koruyucu etkilerini araştırdıkları deneysel çalışmalarında tek doz 7/mg/kg/gün doz sisplatin kullanarak testis toksisitesi oluşturmuş ve tedavi ajanı olarak mısır yağı içinde süspanse edilen likopen 4 mg/kg/doz olacak şekilde oral gavaj yolu ile sıçanlara verilmiştir (10 gün ön tedavi, 5 gün sisplatin uygulaması sonrası devam eden tedavi). Çalışma sonucunda sisplatin uygulaması gren gruptaki hayvanlarda kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük ($p<0,05$) sperm konsantrasyonu olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca sisplatin grubundaki hayvanların kontrol grubunda yer alanlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük ($p<0,001$) sperm motilitesine sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışmada sisplatin tedavisi gruplardaki hayvanların hiçbirinde sperm kuyruk anormalliklerine rastlanmamıştır. Sadece sisplatin uygulaması alan grup, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksek oranda baş

anormalliklerine sahip olduğu rapor edilmiştir ($p<0,05$). Toplam sperm anormallikleri incelendiğinde yalnızca sisplatin uygulaması alan hayvanlarda önemli ölçüde daha yüksek anormallik düzeyi olduğu saptanmıştır. Uygulanan likopen tedavisinin, sisplatinin neden olduğu toksik etkileri azalttığı ve toplam sperm anormalliklerini önlediği belirtilmiştir. Likopen tedavisinin motilite, sperm konsantrasyonu ve anormalliklerini önemli ölçüde azalttığı çalışma sonucu açıkça gösterilmiştir. Aldemir ve ark (2013) yapmış oldukları deneysel çalışmalarında sisplatin kaynaklı testis hasarına karşı kuersetinin olası etkilerini incelemiş ve çalışma sırasında testis hasarı meydana getirebilmek için 7 mg/kg/gün doz sisplatin (tek doz) uygulamış ve 10 gün boyunca oral gavaj yolu ile 50 mg/kg/gün dozda kuersetin tedavi edici ajan olarak kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda sisplatin uygulaması sperm hareketliliği ve morfolojisini olumsuz yönde etkilemiş ve sisplatin uygulanan gruplarda sperm hareketliliğinin azaldığı ve anormal sperm oranının arttığı belirlenmiştir. Sperm morfolojisine bakıldığında sisplatin uygulanan gruplarda en sık görülen anormalliğin baş anormallikleri olduğu (küçük ve düz kafa) ve ayırık sperm başı olduğu rapor edilmiştir.

Pourheydar ve ark (2021) silymarininin diyabetik sıçanlarda sperm ve testis parametreleri üzerine olası etkilerini inceledikleri çalışmalarında diyabetik sıçanlara 100mg/kg/gün dozda silymarin vermiş ve sonuç olarak diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük sperm sayısı bulunmuştur. Silymarin tedavisi uygulanan grupta diyabetik gruba göre sperm sayısının anlamlı düzeyde yükseldiği ($p\leq 0,001$) gözlenmiştir. Sperm hareketliliği diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış ($p\leq 0,001$) silymarin ile tedavi edilen diyabetli sıçanlarda sperm hareketliliği, diyabetik gruba göre önemli ölçüde iyileşmiştir ($p\leq 0,001$). Diyabetik gruptaki hayvanlarda, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde az miktarda normal morfolojiye sahip sperm bulunurken silymarin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi, diyabetik gruptaki hayvanlara kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır ($p\leq 0,001$). Diyabetik grupta sperm canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunurken ($p\leq 0,001$) silymarin ile tedavi edilen grupta sperm canlılığı diyabetik gruba kıyasla oldukça yüksek canlı sperm yüzdesi görüldü ($p<0,05$).

Biz kendi çalışmamızda sperm parametrelerini morfolojik düzeyde incelemeye önem verdik. Sperm sayısı, sperm ölü-canlı oranı ve sperm morfolojik değişikliklerini inceleyerek sonuçları belirledik. Bu sonuçlara göre sperm sayısını, CON grubunda ortalama $1,62 \times 10^8 \pm 3,2 \times 10^7$, SM200 grubunda ortalama $1,52 \times 10^8 \pm 9,9 \times 10^7$, CIS grubunda ortalama $1,08 \times 10^8 \pm 2,3 \times 10^7$, CIS+SM50 grubunda $1,27 \times 10^8 \pm 1,61 \times 10^7$ ve CIS+SM200 grubunda ise ortalama $1,28 \times 10^8 \pm 1,55 \times 10^7$ olarak bulduk. Kontrol ve SM200 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,8549$). Yani silymarin uygulaması sperm sayısını

azalacak toksik bir etki yaratmadı. Bununla birlikte CIS grubunda sperm sayısı kontrol ve SM200 gruplarına kıyasla önemli ölçüde azalma gösterdi ($p<0,0001$). Bundan dolayı CIS+SM50 grubunda sperm sayısının CIS grubuna göre anlamlı derecede arttığı görüldü. Silymarin uygulaması düşük dozda bile sperm sayısını sisplatin uygulamasının meydana getirdiği toksik etkiye karşı anlamlı düzeyde koruyabildi. CIS+SM200 grubunda sisplatin grubuna göre CIS+SM50 grubundan biraz daha yüksek düzeyde sperm sayısının korunduğu gözlemlendi. CIS+SM50 ve CIS+SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da bir farklılık olduğu, sperm sayısının CIS+SM200 grubunda daha yüksek bulunduğu belirlendi. Yapılan kapsamlı literatür taraması sonucunda bizim deney tasarımında kullandığımız doz olan 7 mg/kg/gün doz sisplatin çalışmaların çoğunda tercih edilmesine rağmen farklı dozların da kullanıldığı görüldü (10 mg/kg/gün veya 5 mg/kg/gün gibi). Bununla birlikte, hangi doz kullanılırsa kullanılsın sisplatin testiste önemli derecede hasar meydana getirmiş ve çalışmaların tamamında sperm sayısını azaltmıştır (S. A. Adelakun ve diğerleri 2022; El-Diasty ve diğerleri 2021; Ilbey, Ozbek, Cekmen, ve diğerleri 2009; Kohsaka ve diğerleri 2020).

Çalışmamızda sperm üzerine Eosin-nigrosin boyası kullanılarak yapılan preparatlarda ölü-canlı oranını da inceledik. Sonuç olarak CON grubunda canlı sperm oranı ortalama $83,7\pm 2,90$, SM200 grubunda ortalama $85,22\pm 3,13$ olarak bulundu. CON ve SM200 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Dolayısıyla silymarin uygulamasının sperm ölü-canlı oranı üzerine toksik bir etkisi görülmedi. CIS grubunda canlı sperm oranı ortalama $23,06\pm 14,28$ olarak bulundu. Hem CON hem de SM200 gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan çok yüksek bir farklılık olduğu görüldü ($p<0,0001$). Diğer çalışmalarda görüldüğü gibi bu çalışmada da sisplatin, sperm ölü oranını kontrol grubuna göre çok artırmıştır. CIS+SM50 grubunda canlı sperm oranı ortalama $43,69\pm 7,149$ olarak bulundu. CIS+SM50 grubunda düşük doz silymarin kullanılmasına rağmen sperm canlılığının CIS grubuna göre arttığı gözlemlendi. CIS+SM200 grubunda canlı sperm oranı $66,61\pm 7,21$ olarak bulundu. CIS+SM200 grubunda canlı sperm oranı CIS grubuna kıyasla istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeyde farklı görüldü ($p<0,0001$). Silymarinin uygulanma dozunun arttıkça canlı sperm oranının arttığını ve silymarin düşük dozda bile kullanılsa sisplatin toksik etkisine karşı koruyucu olacak görev yaptığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda sperm morfolojisini incelemek için alınan sperm numuneleri Hancock solüsyonunda muamele edildi ve spermier faz-kontrast mikroskopunda incelendi. Sperm morfolojisi gözlemlendi ve bu konu ile ilgili yapılmış literatürler baz alınarak sperm anormallikleri incelendi (Aldemir ve diğerleri 2014). Sperm numuneleri incelendiğinde

yalnızca sperm baş kısımlarında defektler saptandı ve literatürde yer aldığı üzere sınıflandırıldı (Van der Horst ve diğerleri 2018). Sperm baş kısmı defekti bulunanlar ve normal yapıda spermiler karşılaştırıldığında anormal sperm oranı CON grubunda ortalama $19,35 \pm 7,967$, SM200 grubunda ortalama $17,89 \pm 7,332$ olarak bulundu ve ikisi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,9961$). Silymarin bu parametrede de negatif bir etkiye sebep olmadı. CIS grubunda anormal sperm oranı ortalama $65,75 \pm 2,75$ olarak bulundu. Sisplatin uygulaması CON ve SM200 grubuna kıyasla CIS grubunda anormal sperm oranını istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde artırdı ($p<0,0001$). CIS+SM50 grubunda anormal sperm oranı ortalama $57,15 \pm 9,579$ olarak belirlendi. Düşük doz dahi olsa silymarin anormal sperm oranının gerilemesine yardımcı oldu ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmadı. CIS+SM200 grubunda ise anormal sperm oranı $52,05 \pm 4,155$ olarak belirlendi ve bu değer CIS grubuna göre istatistiksel açıdan düşük düzeyde de olsa istatistiksel açıdan anlamlı görüldü ($p=0,0261$). Çalışmanın sonucuna bakacak olursak düşük doz silymarin uygulaması anormal sperm oluşumunu biraz engelleyebilmiş ancak bu anlamlı bir iyileşme sağlamamışken yüksek doz silymarin istatistiksel olarak anlamlı derecede anormal sperm oluşumunu engellemeye yardımcı olmuştur diyebiliriz. Sperm baş defektleri çalışmamızda kopuk /ayrık sperm başı, rudimenter (düz) sperm başı ve küçük (gelişmemiş) sperm başı olarak gözlemlendi ve literatürde de bu şekilde yer aldığı tespit edildi (Aldemir ve diğerleri 2014).

Aldemir ve ark (2014) yapmış oldukları deneysel çalışmalarında kuersetinin sisplatin toksisitesine karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında TAS (toplam antioksidan seviyesi) ve TOS (toplam oksidan seviyesi) ölçümü yapmış ve TAS ve TOS seviyelerinde önemli ölçüde bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. Agcayazı ve ark (2021) sisplatin toksisitesine karşı resveratrolün olası iyileştirici etkilerini inceledikleri deneysel çalışmalarında 5 mg/kg/gün tek doz sisplatin ile testis toksisitesi oluşturmuş ve sisplatin verilen hayvanlara 25mg/kg/gün dozda resveratrol uygulayarak olası değişiklikleri rapor etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda resveratrol tedavisi alan gruptaki hayvanlardaki TOS düzeyleri, sisplatin hasar grubundakilere kıyasla anlamlı olarak düşük, TAS düzeyleri ise sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Ahıskalı ve ark (2021) sıçanlarda sisplatin toksisitesi sonucu meydana gelen oksidatif optik sinir hasarı üzerine taksifolinin etkilerini inceledikleri deneysel çalışmalarında hayvanlara 14 gün boyunca intraperitoneal yolla günde bir kez 2,5 mg/kg/gün dozda sisplatin enjekte etmiş ve tedavi edilecek gruba da sisplatin enjeksiyonundan 1 saat önce 50 mg/kg/gün dozda taksifolin oral gavaj yolu ile verilmiştir. Deney sonucunda sisplatin hasar grubunda TAS düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Ayrıca TOS düzeyi ise kontrol grubuna kıyasla sisplatin grubunda

belirgin bir artış göstermiştir ($p<0,001$). Sisplatin grubuna göre tedavi edici ajanın kullanıldığı grupta ise TAS değeri artarken TOS değerinin azaldığı görülmüştür. Güntürk ve ark (2019) sisplatin kaynaklı nefrotoksisite modeli oluşturdukları deneysel çalışmalarında N-asetilsisteinin (NAC) olası iyileştirici etkilerini incelemiş ve bu çalışmada sisplatin toksisitesi oluşturmak için sıçanlara tek doz olacak şekilde 10 mg/kg/gün dozda sisplatin vermiş ve tedavi edici ajan olarak NAC 250 mg/kg/gün dozda verilmiştir (3 gün). Deney sonucunda sisplatin ve sisplatin+NAC gruplarında kontrol grubuna kıyasla TAS düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğu gözlenmiştir. TOS düzeylerinin sisplatin kullanılan gruplarda arttığı gözlemlenmiş ancak NAC uygulamasıyla bu artışın azaltılamadığı belirtilmiştir. Kurt ve ark (2021) yapmış oldukları deneysel çalışmada sisplatin kaynaklı oksidatif karaciğer hasarı oluşturmuş ve bu hasar üzerine taksifolinin olası etkilerini incelemiştir. Karaciğer hasarı oluşturmak için 5 mg/kg/gün doz (toplam 4 doz, 2 günde 1 olacak şekilde) sisplatin uygulanmış ve tedavi edilecek gruba oral gavaj yolu ile 50 mg/kg/gün dozda taksifolin verilmiştir. Deney sonucunda tüm gruplar arasında TOS seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p<0,05$). Sisplatin+taksifolin verilen grupta TOS seviyeleri sisplatin grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Sisplatin+taksifolin verilen grubun karaciğer dokusundaki TAS düzeyi, sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Sisplatin grubundaki hayvanlarda TAS seviyesi en düşük seviyedeysen TOS seviyesi en yüksek seviyede bulunmuştur. Bilgiç ve ark (2018) sisplatin ile indüklenmiş karaciğer toksisitesi üzerine dekspantenolün olası iyileştirici etkileri üzerine yapmış oldukları deneysel çalışmada 7 mg/kg/gün sisplatin tek doz olacak şekilde uygulanmış ve tedavi grubundaki hayvanlara 3 gün süreyle intraperitoneal yolla 500 mg/kg/gün (tek doz) dekspantenol verilmiştir. Deney sonucunda sisplatin grubunda TAS ve TOS değerleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur (TAS ($p=0,001$), TOS ($p=0,001$)). Kontrol grubu ve sisplatin+dexspantenol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yücel ve ark (2019) sıçanlarda sisplatin ile indüklenmiş testis hasarında all trans retinoik asitin (ATRA) olası iyileştirici etkilerini inceledikleri deneysel çalışmalarında sisplatin toksisitesi 7 mg/kg/gün tek doz uygulanarak gerçekleştirilmiş ve tedavi grubundaki hayvanlara intraperitoneal yolla 10 gün süreyle tek doz ATRA (7,5 mg/kg/gün) vermiş ve 4. gün tek doz sisplatin (7 mg/kg/gün) enjekte edilmiştir. Deney sonucunda sisplatin uygulaması TOS seviyesini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır ($p<0,05$). Buna karşın sisplatin+ATRA grubunda testis dokusunda TOS seviyesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). TAS seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Adelakun ve ark (2022) sisplatin kaynaklı testis hasarı oluşturdukları

sıçanlar üzerine 1-izotiyosiyanat-4-metil sülfonil bütanın olası etkilerini inceledikleri deneysel çalışmalarında sisplatin hasarı oluşturmak için sıçanlara, intraperitoneal yolla tek doz olacak şekilde 10 mg/kg/gün doz sisplatin verilmiş ve tedavi grubuna da 100 mg/kg/gün dozda 1-izotiyosiyanato-4-metil sülfonil bütan (SFN) verilmiştir. Deney sonucunda sisplatin uygulamasının TOS seviyesini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artırdığını ($p<0,05$) raporlamışlardır. Bununla birlikte sisplatin+SFN grubunda TOS seviyesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Tüm tedavi grupları arasında TAS seviyesinde istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır.

Biz de çalışmamızda biyokimyasal parametrelerden TAS ve TOS seviyelerini ölçüp sisplatinin ne derece antioksidan düzeyini değiştirdiğini ve uyguladığımız silymarinin bu seviyeyi değiştirip değiştirmeyeceğini araştırmayı hedefledik. Deney sonucunda verilerimiz şu şekilde ortaya çıktı; CON grubunda TAS ortalaması $4,196\pm 2,311$ $\mu\text{mol/L}$, TOS seviyesi ortalama $17,47\pm 5,613$ $\mu\text{mol/L}$ ve SM200 grubunda TAS ortalaması $2,623\pm 2,025$ $\mu\text{mol/L}$, TOS seviyesi ise $24,67\pm 8,090$ $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. Bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar görülmedi. CIS grubunda TAS ortalaması $1,292\pm 0,2682$ $\mu\text{mol/L}$ ve TOS ortalaması $30,61\pm 4,072$ $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. TAS seviyesi CIS grubunda, CON grubuna kıyasla istatistiksel açıdan orta düzeyde bir farklılık gösterdi ($p=0,0019$). TOS seviyesi de CIS ve CON grupları arasında anlamlı bir farklılık gösterdi ($p=0,0080$). CIS grubunda CON grubuna kıyasla TAS seviyesi azalırken TOS seviyesinin arttığı gözlemlendi. CIS+SM50 grubunda ortalama TAS seviyesi $1,697\pm 0,2639$ $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunurken TOS seviyesi $28,05\pm 6,187$ $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. CIS+SM200 grubunda ise TAS seviyesi $5,241\pm 3,071$ $\mu\text{mol/L}$ ve TOS seviyesi $28,07\pm 9,548$ $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. CIS+SM200 grubunda TAS seviyesi CIS grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı bulunurken ($p=0,0034$), CIS+SM50 grubunda CIS grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. TOS seviyesi ise CIS+SM200 ve CIS+SM50 gruplarında, CIS gruplarına kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermedi. Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında kısa süreli deneysel çalışmalarda TAS ve TOS seviyelerinin genellikle anlamsız düzeyde değiştiği hatta çoğunlukla değişmediği gözlenmiştir. TAS ve TOS seviyelerinin anlamlı düzeyde değişiklik gösterebilmesi deney prosedürünün daha uzun olması ve dokularda daha fazla hasar meydana gelmesi gerektiğini aksi taktirde kısa süreli akut deneysel çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde edilemediğini düşünmekteyiz. Buna rağmen bizim çalışmamızda TAS ve TOS seviyesi, sisplatin maruziyetine bağlı olarak az da olsa anlamlı düzeyde değişiklikler göstermiştir.

Yeh ve ark (2008) dişi sıçanlarda sisplatin ile indüklenen ovaryum hasarı üzerine yapmış oldukları deneysel çalışmalarında sisplatin hasarını 4,5 mg/kg/gün doz ve 6,0

mg/kg/gün doz olmak üzere 2 farklı doz kullanarak yapmışlardır. Deney sonucunda serum inhibin A ve inhibin B'nin eksojen gonadotropin stimülasyonuna yanıt olarak arttığını belirtmişlerdir. 4,5mg/kg/gün ve 6,0 mg/kg/gün doz sisplatin uygulanan sıçanlar için uyarılmış serum inhibin A seviyeleri, doza bağlı bir şekilde kontrol grubuna kıyasla 2-5 kat körelmiş olduğu ortaya konulmuştur ($p<0,001$). İnhibin B seviyeleri, sisplatin verilen gruplarda gonadotropin ile uyarılmış olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında doza bağlı bir şekilde 2-3 kat azaldığı ($p<0,001$) ortaya konulmuştur. Fouad ve ark (2019) sıçanlarda sisplatin kaynaklı gonadal toksisite üzerine narigeninin olası etkilerini araştırdıkları deneysel çalışmalarında sisplatin toksisitesi için hayvanlara 10 mg/kg/gün tek doz sisplatin uygulamış ve tedavi grubuna sisplatin enjeksiyonunundan 6 gün öncesinden başlayarak 10 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozda naringenin (NG) vermişlerdir. Deney sonucunda sisplatin grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında inhibin B düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar olduğu ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. NG tedavisi ise sisplatin maruz bırakılan sıçanlarda inhibin B seviyesini sisplatin grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır ($p<0,05$).

Bu çalışmada kan serumlarından inhibin A ve inhibin B seviyelerini araştırdık ve sonuçlar şu şekilde ortaya çıktı; inhibin A seviyeleri CON grubunda ortalama $10,62\pm 10,21$ pg/ml, SM200 grubunda ortalama $11,97\pm 13,95$ pg/ml, CIS grubunda ortalama $123,0\pm 55,54$ pg/ml, CIS+SM50 grubunda ortalama $10,97\pm 18,39$ pg/ml ve son olarak CIS+SM200 grubunda ortalama $27,22\pm 24,23$ pg/ml olarak belirlendi. CIS grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmuş ($p<0,0001$) ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir. İnhibin B seviyesine bakacak olursak CON grubunda ortalama $221,7\pm 84,44$ pg/ml, SM200 grubunda ortalama $187,4\pm 89,71$ pg/ml, CIS grubunda ortalama $189,7\pm 84,65$ pg/ml, CIS+SM50 grubunda ortalama $200,6\pm 127,1$ pg/ml ve son olarak da CIS+SM200 grubunda ortalama $307,6\pm 164,5$ pg/ml olarak ölçüldü. Çalışmamızda sisplatin uygulaması, hücrelerde hücre membranı hasarı meydana getirmiş ve bu durumda inhibin A ve inhibin B hormonları sitoplazma içerisinden çıkararak kana karışmıştır. Dolayısıyla CIS grubunda yer alan hayvanların kan serumlarında inhibin A ve inhibin B hormon düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Silymarin uygulaması bu hasara engel olmuş ve sisplatin grubu hariç diğer gruplarda inhibin A ve inhibin B seviyelerinde bir farklılık görülmemiştir.

İnhibinler, inhibin A ve inhibin B şeklinde iki izoform formunda bulunan ve transformasyon edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) farklılaşma ve büyüme faktörleri ailesine ait üyeleri olan heterodimerik glikoprotein hormonlarıdır. Her bir glikoprotein, bölümü inhibin A ya da inhibin B olarak belirleyen beta alt birimi ile bir beta ve bir alfa alt biriminden meydana gelmektedir

(Spencer ve diğeri 1992). İnhibinler glandula hypophysialis anteriordan folikül uyarıcı hormon (FSH) üretiminin düzenlemesine katılan üretilen hormonlar olarak karakterize edilmiştir ve ayrıca inhibin A, ovaryumların granüloza hücreli tümörleri için tümör belirteci olarak da kullanılmaktadır (Farnworth ve diğeri 2006; Shearer ve diğeri 2017).

Sisplatin çok geniş çaplı kullanım alanı olan bir antikanser ilacı olduğu ve şimdiye kadar yapılan deneysel çalışmalarda bakılan biyokimyasal parametreler içerisinde genellikle testosteron, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve glutatyon redüktaz (GSR), tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) seviyesi gibi parametreler incelenmiş ve rapor edilmiştir (Ijaz, Khan, ve diğeri 2020; Ijaz, Tahir, ve diğeri 2020; Tian ve diğeri 2018). Yapılan kapsamlı literatür araştırması sonucunda sisplatin ile yapılan deneysel çalışmalarda inhibin hormonu ölçümleri ile ilgili detaylı araştırma ve sonuçlara rastlanmamıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda biyokimyasal parametrelere inhibin A ve inhibin B seviyelerinin de dahil edilerek ölçülmesi ve yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslanmasının literatüre önemli katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmanın sınırlılıkları olarak daha farklı süre ve dozlarda silymarin kullanımı olmaması, farklı yaşlarda hayvanlarda inceleme yapılamamış olması, immunohistokimyasal incelemelerin yapılamamış olması ve inflamasyon skorlamasının yapılamamış olması gösterilebilir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda bu hususların dikkate alınması, literatüre katkı sağlaması açısından önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışma ve yapılan kapsamlı literatür taraması sonucu elde ettiğimiz bilgiler sonucunda sisplatinin birçok organ ile beraber testis dokularında da önemli düzeyde histopatolojik ve biyokimyasal düzeyde zarar verdiği görülmüştür. Çalışmamızda literatürde yer alan çalışmalar temel alındı ve sıçanlara tek doz sisplatin uygulanarak akut bir hasar modeli oluşturuldu. Sisplatin bir kemoterapi ilacıdır ve genellikle insanlarda daha uzun süreli ve daha yüksek doz kullanılmaktadır bundan dolayı daha uzun süreli ve daha yüksek dozda sisplatin kullanımının testis ve sperm hasarını artıracığını düşünüyoruz. Deney tasarımımda daha önce literatürde yer alan çalışmalardan farklı olarak verilen antioksidan dozunu 2'ye böldük ve 12 saat arayla hayvanlara oral gavaj yolu ile verdik. Bunu yapmaktaki amacımız, kandaki antioksidan seviyesinin 24 saat boyunca azalmadan belirli bir düzeyde kalmasını sağlamaktır. Çalışmamızda, silymarin uygulamasının testiste histopatolojik hasarı azalttığını ve ayrıca sperm yapısının da korunmasına yardımcı olduğunu gözlemledik. Düşük ve yüksek doz uygulamaları arasındaki farklara bakılacak olursa yüksek doz silymarin uygulamasının testis hasarını önlemede daha etkili olduğunu söyleyebiliriz. İleride yapılacak deneysel çalışmalarda sisplatin hasarı üzerine daha farklı süre ve dozlarda silymarin uygulamasının etkilerinin incelenmesinin, klinik hasta tedavilerine önemli katkı sağlayacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- A Baudino, T. (2015). Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3-20.
- Abdelmeguid, N. E. ve Chmaisse, H. N. ve Zeinab, N. (2010). Protective effect of silymarin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pak J Nutr*, 9(7), 624-636.
- Abenavoli, L. ve Capasso, R. ve Milic, N. ve Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423-1432.
- AbouZid, S. F., Ahmed, H. S., Moawad, A. S., Owis, A. I., Chen, S. N., Nachtergael, A., ... & Pauli, G. F. (2017). Chemotaxonomic and biosynthetic relationships between flavonolignans produced by *Silybum marianum* populations. *Fitoterapia*, 119, 175-184.
- Abraham, J. ve Staffurth, J. (2011). Hormonal therapy for cancer. *Medicine*, 39(12), 723-727.
- Achkar, I. W., Abdulrahman, N., Al-Sulaiti, H., Joseph, J. M., Uddin, S., & Mraiche, F. (2018). Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Translational Medicine*, 16, 1-12.
- Adelakun, S. ve Akintunde, O. ve Ogunlade, B. ve Adeyeluwa, B. (2022). Histochemical and histomorphological evidence of the modulating role of 1-isothiocyanate-4-methyl sulfonyl butane on cisplatin-induced testicular-pituitary axis degeneration and cholesterol homeostasis in male Sprague-Dawley rats. *Morphologie*.
- Adelakun, S. A. ve Ogunlade, B. ve Fidelis, O. P. ve Omotoso, O. D. (2022). Protective effect of nutritional supplementation of zinc-sulfate against cisplatin-induced spermatogonial and testicular dysfunctions in adult male Sprague-Dawley rats. *Endocrine and Metabolic Science*, 6, 100116.
- Adelakun, S. A. ve Ogunlade, B. ve Iteire, K. A. ve Adedotun, O. A. (2021). Ameliorating potential and fertility enhancing activities of nutritional dietary supplementation of D-Ribose–l-Cysteine in cisplatin induced oligoasthenoteratozoospermia and seminiferous epithelium degeneration in adult male Sprague-Dawley rats. *Metabolism Open*, 12, 100128.
- Adhikari, M. ve Arora, R. (2015). Nano-silymarin provides protection against γ -radiation-induced oxidative stress in cultured human embryonic kidney cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 792, 1-11.

- Adhikari, M., Dhaker, A., Adhikari, J., Ivanov, V., Singh, V., Chawla, R., ... & Arora, R. (2013). In vitro studies on radioprotective efficacy of silymarin against γ -irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 89(3), 200-211..
- Afsar, T. ve Razak, S. ve Almajwal, A. (2017). Acacia hydaspica ethyl acetate extract protects against cisplatin-induced DNA damage, oxidative stress and testicular injuries in adult male rats. *BMC cancer*, 17(1), 1-14.
- Agarwal ve Tyagi, A. ve Kaur, M. ve Agarwal, R. (2007). Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis*, 28(7), 1463-1470.
- Agarwal, A. ve Mulgund, A. ve Hamada, A. ve Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, 13(1), 1-9.
- Agarwal, C. ve Tyagi, A. ve Kaur, M. ve Agarwal, R. (2007). Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis*, 28(7), 1463-1470.
- Agarwal, R. ve Agarwal, C. ve Ichikawa, H. ve Singh, R. P. ve Aggarwal, B. B. (2006). Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Research*, 26(6B), 4457-4498.
- Ahiskali, I., Ferah Okkay, I., Mammadov, R., Okkay, U., Keskin Cimen, F., Kurt, N., & Suleyman, H. (2021). Effect of taxifolin on cisplatin-associated oxidative optic nerve damage in rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 40(1), 1-6.
- Ajani, J. A., Winter, K. A., Gunderson, L. L., Pedersen, J., Benson, A. B., Thomas, C. R., ... & Willett, C. (2008). Fluorouracil, mitomycin, and radiotherapy vs fluorouracil, cisplatin, and radiotherapy for carcinoma of the anal canal: a randomized controlled trial. *Jama*, 299(16), 1914-1921.
- Aksu, E. H., Kandemir, F. M., Özkaraca, M., Ömür, A. D., Küçükler, S., & Çomaklı, S. (2017). Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. *Andrologia*, 49(1), e12593.
- Aldemir, M., Okulu, E. M. R. A. H., Kösemehmetoğlu, K. E. M. A. L., Ener, K., Topal, F., Evirgen, O., & Avcı, A. (2014). Evaluation of the protective effect of quercetin against cisplatin-induced renal and testis tissue damage and sperm parameters in rats. *Andrologia*, 46(10), 1089-1097.
- Alderden, R. A. ve Hall, M. D. ve Hambley, T. W. (2006). The discovery and development of cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83(5), 728.

- Amin, A., Abraham, C., Hamza, A. A., Abdalla, Z. A., Al-Shamsi, S. B., Harethi, S. S., & Daoud, S. (2012). A standardized extract of Ginkgo biloba neutralizes cisplatin-mediated reproductive toxicity in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Amin, A. ve Hamza, A. A. (2006). Effects of Roselle and Ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian journal of Andrology*, 8(5), 607-612.
- Amin, A. ve Hamza, A. A. ve Kambal, A. ve Daoud, S. J. A. j. o. a. (2008). Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian Journal of Andrology*, 10(2), 291-297.
- Aminsharifi, A. R., Talaei, T., Kumar, V., Sabayan, B., Samani, S., & Mohamadhoseini, E. (2007). A postulated role of testosterone for prevention of cisplatin gonadal toxicity. *Medical Hypotheses*, 68(3), 525-527.
- Appella, E. ve Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2764-2772.
- Arifoğlu, Y. (2021). Her Yönüyle Anatomi 3. Baskı.
- Arıncı, K. ve Elhan, A. (2014). *Anatomi: kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar: Güneş Tıp Kitabevleri*.
- Ashrafi, F., Haghshenas, S., Nematbakhsh, M., Nasri, H., Talebi, A., Eshraghi-Jazi, F., ... & Safari, T. (2012). The Role of Magnesium Supplementation in Cisplatin-induced Nephrotoxicity in a Rat Model: No Nephroprotectant Effect. *International Journal of Preventive Medicine*, 3(9).
- Astolfi, L., Ghiselli, S., Guaran, V., Chicca, M., Simoni, E. D. I., Olivetto, E., ... & Martini, A. (2013). Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncology Reports*, 29(4), 1285-1292.
- Atessahin, A. ve Yılmaz, S. ve Karahan, I. ve Ceribasi, A. O. ve Karaoglu, A. J. T. (2005). Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 212(2-3), 116-123.
- Ateşşahin, A., Karahan, İ., Türk, G., Gür, S., Yılmaz, S., & Çeribaşı, A. O. (2006a). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, 21(1), 42-47.
- Ateşşahin, A., Karahan, İ., Türk, G., Gür, S., Yılmaz, S., & Çeribaşı, A. O. (2006b). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, 21(1), 42-47.

- Ateşşahin, A., Şahna, E., Türk, G., Çeribaşı, A. O., Yılmaz, S., Yüce, A., & Bulmuş, Ö. (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of Pineal Research*, 41(1), 21-27.
- Awadalla, E. A. J. B. ve Nutrition, P. (2012). Ameliorative effect of the crude oil of the *Nigella sativa* on oxidative stress induced in rat testes by cisplatin treatment. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2(4), 265-268.
- Azarbarz, N. ve Shafiei Seifabadi, Z. ve Moaiedi, M. Z. ve Mansouri, E. (2020). Assessment of the effect of sodium hydrogen sulfide (hydrogen sulfide donor) on cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(8), 8119-8128.
- Azu, O. O., Duru, F. I. O., Osinubi, A. A., Oremosu, A. A., Noronha, C. C., Elesha, S. O., & Okanlawon, A. O. (2010). Histomorphometric effects of *Kigelia africana* (Bignoniaceae) fruit extract on the testis following short-term treatment with cisplatin in male Sprague–Dawley rats. *Middle East Fertility Society Journal*, 15(3), 200-208.
- Baghbahadorani, F. K. ve Miraj, S. (2017). The impact of silymarin on improvement of hepatic abnormalities in patients with severe preeclampsia: A randomized clinical trial. *Electronic physician*, 9(8), 5098.
- Barrett, K. E. ve Boitano, S. ve Barman, S. M. ve Brooks, H. L. (2010). Ganong's review of medical physiology twenty.
- Barry, N. P. ve Sadler, P. J. (2014). 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure and Applied Chemistry*, 86(12), 1897-1910.
- Basu, A. ve Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- Batra, N. ve Nehru, B. ve Bansal, M. (2001). Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 21(6), 507-512.
- Bayram, Ş., Ersoy, O., Çerkezayabekir, A., Sapmaz, M., Karaca, T., & Özfıdan, G. K. (2020). Fukoidanın Diyabetik Sıçan Testis Dokularındaki PCNA, INSL3, JNK, TGF- β 1, IL-1 β ve Akt İfadelerine Etkisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 46(3), 277-284.
- Benjamin, D. J. (2014). The efficacy of surgical treatment of cancer–20 years later. *Medical Hypotheses*, 82(4), 412-420.
- Bijak, M. (2017). Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22(11), 1942.

- Bilgic, Y., Akbulut, S., Aksungur, Z., Erdemli, M. E., Ozhan, O., Parlakpınar, H., ... & Turkoz, Y. (2018). Protective effect of dexpanthenol against cisplatin-induced hepatotoxicity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(5), 4049-4057.
- Bishop, M. ve Walton, A. (1960). Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. *Marshall's Physiology of Reproduction*, 1(Part 2), 1-129.
- Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54.
- Boekelheide, K. (2005). Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *JNCI Monographs*, 2005(34), 6-8.
- Bookstein, F. L. (2017). Atlas of Anatomy, Latin Nomenclature Edited by A. Gilroy and B. MacPherson. Illustrations by Markus Voll and Karl Wesker. New York, Stuttgart, Delhi, and Rio de Janeiro: Thieme Medical Publishers 2017. *Journal of Anatomy*, 231(6), 1019.
- Bostancıeri, N. ve Taşlıdere, A. ve Elbe, H. ve Taşlıdere, E. (2022). Protective effects of quercetin against testis damage caused by cisplatin. *Biotechnic & Histochemistry*, 97(3), 180-184.
- Brabec, V. ve Kasparkova, J. (2005). Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resistance Updates*, 8(3), 131-146.
- Brown, S. J. ve Kellett, P. J. ve Lippard, S. J. (1993). Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin. *Science*, 261(5121), 603-605.
- Brozovic, A. ve Ambriović-Ristov, A. ve Osmak, M. (2010). The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 347-359.
- Calani, L. ve Brighenti, F. ve Bruni, R. ve Del Rio, D. (2012). Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine*, 20(1), 40-46.
- Carter, S. (1984). Cisplatin—past, present and future *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy* (pp. 359-376): Springer.
- Carter, S. ve Goldsmith, M. (1974). The Development and Clinical Testing of New Anticancer Drugs at the National Cancer Institute—Example cis-Platinum (II) Diamminedichloride (NSC 119 875) *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy* (pp. 137-144). Berlin, Heidelberg: Springer.

- Chambers, C. S., Holečková, V., Petrásková, L., Biedermann, D., Valentová, K., Buchta, M., & Křen, V. (2017). The silymarin composition... and why does it matter???. *Food Research International*, 100, 339-353.
- Cherry, S. M. ve Hunt, P. A. ve Hassold, T. J. (2004). Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination or chromosome segregation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564(2), 115-128.
- Chirino, Y. I. ve Hernández-Pando, R. ve Pedraza-Chaverrí, J. J. B. p. (2004). Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 4(1), 1-9.
- Choi, Y. H. ve Chin, Y.-W. ve Kim, Y. G. (2011). Herb-drug interactions: focus on metabolic enzymes and transporters. *Archives of pharmacal research*, 34(11), 1843-1863.
- Choudhury, R. ve Jagdale, M. J. J. o. c. (2002). Vitamin E protection from/potential of the cytogenetic toxicity of cisplatin in Swiss mice. *J Chemother*, 14(4), 397-405.
- Christensen, P. ve Stryhn, H. ve Hansen, C. (2005). Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 63(4), 992-1003.
- Chu, E. ve Sartorelli, A. J. B. ve pharmacology, c. (2004). *Cancer chemotherapy* (Vol. 9). Hong-Kong.
- Ciccarelli, R. B. ve Solomon, M. J. ve Varshavsky, A. ve Lippard, S. J. (1985). In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein crosslinking, and inhibition of replication. *Biochemistry*, 24(26), 7533-7540.
- Coşkun, N., Hatipoğlu, M. T., Özoğul, C., Korkmaz, C., Akyol, S. N., Mıçılı, S. C., ... & Erdoğan, D. (2013). The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced by cisplatin in rats. *Balkan Medical Journal*, 30(2), 235.
- Creasy, D. M. (1997). Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicologic pathology*, 25(2), 119-131.
- Culpeper, N. ve Siderits, R. (1952). *The English Physitian: Or an Astrologo-Physical Discourse of the Vulgar Herbs of This Nation: benefit of the Commonwealth of England*.
- Cvitkovic, E. (1998). Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. *Cancer Treatment Reviews*, 24(4), 265-281.

- Cvitkovic, E. ve Spaulding, J. ve Bethune, V. ve Martin, J. ve Whitmore, W. F. (1977). Improvement of Cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): Therapeutic index in an animal model. *Cancer*, 39(4), 1357-1361.
- Çakır, A. (2001). Tavşan, kobay ve sıçanda testisin şekli, konumu ve testis epididymis ilişkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 48(02), 129-132.
- Damia, G., Filiberti, L., Vikhanskaya, F., Carrassa, L., Taya, Y., Dincalci, M., & Broggin, M. (2001). Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia*, 3(1), 10-16.
- Dasari, S. ve Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- Davies, M. S. ve Berners-Price, S. J. ve Hambley, T. W. (2000). Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of mono-aquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA. *Inorganic chemistry*, 39(25), 5603-5613.
- Davies, M. S. ve Hall, M. D. ve Berners-Price, S. J. ve Hambley, T. W. (2008). [1H, 15N] Heteronuclear single quantum coherence NMR study of the mechanism of aquation of platinum (IV) ammine complexes. *Inorganic chemistry*, 47(17), 7673-7680.
- de Kretser, D. M., Buzzard, J. J., Okuma, Y., O'Connor, A. E., Hayashi, T., Lin, S. Y., ... & Hedger, M. P. (2004). The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 225(1-2), 57-64.
- Dearnaley, D. P. ve diğerleri, . (1991). Combination chemotherapy with bleomycin, etoposide and cisplatin (BEP) for metastatic testicular teratoma: long-term follow-up. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27(6), 684-691.
- Decatris, M. ve Sundar, S. ve O'byrne, K. (2004). Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treatment Reviews*, 30(1), 53-81.
- Deep, G. ve Agarwal, R. (2007). Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integrative cancer therapies*, 6(2), 130-145.
- Dey, P. (2018). *Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology*: Springer.
- Dhar, S. ve Kolishetti, N. ve Lippard, S. J. ve Farokhzad, O. C. (2011). Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 1850-1855.
- Dhara, S. (1970). A rapid method for the synthesis of cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. *Indian J Chem*, 8(1), 193-194.

- Diez-Caballero, F., Castilla-Cortázar, I., Garcia-Fernandez, M., Puche, J. E., Diaz-Sanchez, M., Casares, A. D., & Gonzalez-Barón, S. (2006). Little effects of insulin-like growth factor-I on testicular atrophy induced by hypoxia. *BMC Urology*, 6, 1-10.
- Doğantekin, E. ve Özcan, S. (2016). Çevresel etkenler ve spermatogenez. *Androloji Bülteni*, 18(66), 183-187.
- Eastman, A. (2017). Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. *Oncotarget*, 8(5), 8854.
- El-Diasty, H. H. ve El-Sayyad, H. ve Refat, S. ve El-Ghaweet, H. A. (2021). Efficacy of Quercetin-Sensitized Cisplatin against N-Nitroso-N-Methylurea Induced Testicular Carcinogenesis in Wistar Rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(1), 75.
- El-Hameed, A. ve Mahgoub, H. A. ve Awadin, W. ve Elshaieb, A. (2021). The in vivo ameliorative effect of silymarin on cisplatin-associated ovarian and testicular histopathological and biochemical alterations. *Mansoura Veterinary Medical Journal*, 22(2), 65-71.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Enebeli, B., Nwangwa, E. K., Nwogueze, B. C., Nzenegu, A., Agbonifo-Chijiokwu, E., Omeru, O., & Ebuwa, E. I. (2022). In Vivo Attenuation of Alcohol-and Cadmium Chloride-Induced Testicular Toxicity Modulated by Silymarin in Male Wistar Rat. *Biological Trace Element Research*, 1-11.
- Farnworth, P. G., Wang, Y., Leembruggen, P., Ooi, G. T., Harrison, C., Robertson, D. M., & Findlay, J. K. (2006). Rodent adrenocortical cells display high affinity binding sites and proteins for inhibin A, and express components required for autocrine signalling by activins and bone morphogenetic proteins. *Journal of Endocrinology*, 188(3), 451-465.
- Fatehi, D., Mohammadi, M., Shekarchi, B., Shabani, A., Seify, M., & Rostamzadeh, A. (2018). Radioprotective effects of Silymarin on the sperm parameters of NMRI mice irradiated with γ -rays. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 489-495.
- Favareto, A. P. A. ve Fernandez, C. D. B. ve da Silva, D. A. F. ve Anselmo-Franci, J. A. ve Kempinas, W. D. G. (2011). Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 109(2), 85-96.

- Federico, A. ve Dallio, M. ve Loguercio, C. (2017). Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. *Molecules*, 22(2), 191.
- Fehér, J. ve Lengyel, G. (2012). Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(1), 210-217.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of Cancer*, 149(4), 778-789.
- Florea, A.-M. ve Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351-1371.
- Foley, G. L. (2001). Overview of male reproductive pathology. *Toxicologic pathology*, 29(1), 49-63.
- Fouad, A. A. ve Refaie, M. M. ve Abdelghany, M. I. (2019). Naringenin palliates cisplatin and doxorubicin gonadal toxicity in male rats. *Toxicology mechanisms and methods*, 29(1), 67-73.
- Fraschini, F. ve Demartini, G. ve Esposti, D. J. C. d. i. (2002). Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*, 22(1), 51-65.
- Fuertes, M. ve Alonso, C. ve Pérez, J. (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*, 103(3), 645-662.
- Fuertes, M. ve Castilla, J. ve Alonso, C. ve Perez, J. (2002). Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2(4), 539-551.
- Gately, D. ve Howell, S. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer*, 67(6), 1171-1176.
- Gazak, R. ve Walterova, D. ve Kren, V. (2007). Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 14(3), 315-338.
- Gharagozloo, M., Jafari, S., Esmail, N., Javid, E. N., Bagherpour, B., & Rezaei, A. (2013). Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: The impact on T cell proliferation and cytokine production. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 113(3), 209-214.
- Gholami Jourabi, F. ve Yari, S. ve Amiri, P. ve Heidarianpour, A. ve Hashemi, H. (2021). The ameliorative effects of methylene blue on testicular damage induced by cisplatin in rats. *Andrologia*, 53(1), e13850.

- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102925.
- Giaccone, G. (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 59(4), 9-17.
- Giese, L. A. (2001). Complementary healthcare practices. *Gastroenterology Nursing: The Official Journal Of The Society Of Gastroenterology Nurses And Associates*, 24(1), 38-40.
- Goli, S. ve Kadivar, M. ve Bahrami, B. ve Sabzalian, M. (2008). Physical and chemical characteristics of Silybum marianum seed oil.
- Gong, X., An, Z., Wang, Y., Guan, L., Fang, W., Strömblad, S., ... & Zhang, H. (2010). Kindlin-2 controls sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin-induced cell death. *Cancer letters*, 299(1), 54-62.
- Gövsä, F. (2003). Sistematik Anatomi. *Ėzmir: Güven Kitapevi*, 565-587.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94(6), 695-698.
- Groome, N. ve Tsigou, A. ve Cranfield, M. ve Knight, P. ve Robertson, D. (2001). Enzyme immunoassays for inhibins, activins and follistatins. *Molecular and cellular endocrinology*, 180(1-2), 73-77.
- Hadolin, M. ve Škerget, M. ve Knez, Z. e. ve Bauman, D. (2001). High pressure extraction of vitamin E-rich oil from Silybum marianum. *Food chemistry*, 74(3), 355-364.
- Hall, J. E. ve Hall, M. E. (2020). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Higby, D. J. ve Higby, D. J. ve Wallace Jr, H. J. ve Albert, D. ve Holland, J. (1974). Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer*, 33(5), 1219-1225.
- Hill, R. B. (1986). Bloom and fawcett: A textbook of histology. *JAMA*, 256(10), 1366-1367.
- Hoeschele, J. D. ve Butler, T. A. ve Roberts, J. A. ve Guyer, C. E. (1982). Analysis and Refinement of the Microscale Synthesis of the 195mPt-labeled Antitumor Drug, cis-Dichlorodiammineplatinum (II), cis-DDP. *Radiochimica Acta*, 31(1-2), 27-36.
- Ijaz, M. U., Khan, M. A., Yousaf, S., Nasir, S., Naz, H., Anwar, H., ... & Samad, A. (2020). Methanolic extract of Fraxinus xanthoxyloides attenuates cisplatin-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Pak Vet J*, 40(4), 489-493.
- Ijaz, M. U., Tahir, A., Samad, A., Ashraf, A., Ameen, M., Imran, M., ... & Sarwar, N. (2020). Casticin Alleviates Testicular and Spermatological Damage Induced by Cisplatin in Rats. *Pakistan Veterinary Journal*, 40(2).

- Ilbey, Y. O., Ozbek, E., Cekmen, M., Simsek, A., Otunctemur, A., & Somay, A. (2009). Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Human Reproduction*, 24(7), 1717-1725.
- Ilbey, Y. O., Ozbek, E., Simsek, A., Otunctemur, A., Cekmen, M., & Somay, A. (2009). Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide-and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertility and Sterility*, 92(3), 1124-1132.
- Imamura, T., Izumi, H., Nagatani, G., Ise, T., Nomoto, M., Iwamoto, Y., & Kohno, K. (2001). Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7534-7540.
- Ishida, S. ve Lee, J. ve Thiele, D. J. ve Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14298-14302.
- Ishikawa, T. ve Wright, C. D. ve Ishizuka, H. (1994). GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 29085-29093.
- Ivanov, A. I., Christodoulou, J., Parkinson, J. A., Barnham, K. J., Tucker, A., Woodrow, J., & Sadler, P. J. (1998). Cisplatin binding sites on human albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14721-14730.
- Jaggi, A. S. ve Singh, N. (2016). Silymarin and its role in chronic diseases. *Drug discovery from mother nature*, 25-44.
- Jahan, S., Munawar, A., Razak, S., Anam, S., Ain, Q. U., Ullah, H., ... & Almajwal, A. (2018). Ameliorative effects of rutin against cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats. *BMC Urology*, 18, 1-11.
- Jahnukainen, K. ve Ehmcke, J. ve Hou, M. ve Schlatt, S. (2011). Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(2), 287-302.
- Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., ... & Zambetti, G. P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and-independent apoptotic pathways. *Cancer cell*, 4(4), 321-328.
- Johnstone, T. C. ve Suntharalingam, K. ve Lippard, S. J. (2016). The next generation of platinum drugs: targeted Pt (II) agents, nanoparticle delivery, and Pt (IV) prodrugs. *Chemical reviews*, 116(5), 3436-3486.

- Jordan, P. ve Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(8), 1229-1235.
- Junqueira ve Carneiro, J. ve Aytakin, Y. ve Solakoğlu, S. (2009). *Temel histoloji: text & atlas: Nobel Tıp Kitabevleri*.
- Junqueira ve Carneiro, J. ve Kelley, R. O. ve Aytakin, Y. ve Solakoğlu, S. (1993). *Temel histoloji: Barış Kitabevi*.
- Kandemir, F. M., Kucukler, S., Caglayan, C., Gur, C., Batil, A. A., & Gülçin, İ. (2017). Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *Journal of Food Biochemistry*, 41(5), e12398.
- Karimi, G. ve Vahabzadeh, M. ve Lari, P. ve Rashedinia, M. ve Moshiri, M. (2011). "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(4), 308.
- Kartalou, M. ve Essigmann, J. M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1-2), 23-43.
- Kass, E. J. ve Freitas, J. E. ve Salisz, J. A. ve Steinert, B. W. (1993). Pituitary gonadal dysfunction in adolescents with varicocele. *Urology*, 42(2), 179-181.
- Katiyar, S. K. ve Roy, A. M. ve Baliga, M. S. (2005). Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Molecular cancer therapeutics*, 4(2), 207-216.
- Katzung, B. G. ve Masters, S. B. ve Trevor, A. J. (2004). *Basic & Clinical Pharmacology*.
- Kauffman, G. B. ve Cowan, D. O. ve Slusarczuk, G. ve Kirschner, S. (1963). cis-and trans-Dichlorodiammineplatinum (II). *Inorganic Syntheses*, 7, 239-245.
- Kelland, L. R. (2000). Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 59(4), 1-8.
- Khan, A. B., D'souza, B. J., Wharam, M. D., Champion, L. A., Sinks, L. F., Woo, S. Y., ... & Leventhal, B. G. (1982). Cisplatin therapy in recurrent childhood brain tumors. *Cancer treatment reports*, 66(12), 2013-2020.
- Khan, I. ve Khattak, H. U. ve Ullah, I. ve Bangash, F. K. (2007). Study of the Physicochemical Properties of Silybum marianum Saeed Oil. *JOURNAL-CHEMICAL SOCIETY OF PAKISTAN*, 29(6), 545.
- Khorsandi, L. ve Saki, G. ve Bavarsad, N. ve Mombeini, M. (2017). Silymarin induces a multi-targeted cell death process in the human colon cancer cell line HT-29. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 890-897.

- Kim, N.-C. ve Graf, T. N. ve Sparacino, C. M. ve Wani, M. C. ve Wall, M. E. (2003). Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Organic & biomolecular chemistry*, 1(10), 1684-1689.
- Kızılay, F. ve Altay, B. (2019). Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları.
- Knight, K. R. G. ve Kraemer, D. F. ve Neuwelt, E. A. (2005). Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 8588-8596.
- Kohsaka, T., Minagawa, I., Morimoto, M., Yoshida, T., Sasanami, T., Yoneda, Y., ... & Sasada, H. (2020). Efficacy of relaxin for cisplatin-induced testicular dysfunction and epididymal spermatotoxicity. *Basic and Clinical Andrology*, 30(1), 1-13.
- Koizumi, W., Narahara, H., Hara, T., Takagane, A., Akiya, T., Takagi, M., ... & Takeuchi, M. (2008). S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *The Lancet Oncology*, 9(3), 215-221.
- Koster, R. ve Van Vugt, M. ve Timmer-Bosscha, H. ve Gietema, J. ve De Jong, S. (2013). Unravelling mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular cancer. *Expert Reviews In Molecular Medicine*, 15.
- Křen, V. ve Walterová, D. J. B. p. (2005). Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed Paper*, 149(1), 29-41.
- Kroemer, G. ve Zamzami, N. ve Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18(1), 44-51.
- Kurt, N. ve Türkeri, Ö. N. ve Suleyman, B. ve Bakan, N. (2021). The effect of taxifolin on high-dose-cisplatin-induced oxidative liver injury in rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 30(10), 1025-1030.
- Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.
- Lebwohl, D. ve Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European journal of cancer*, 34(10), 1522-1534.
- Lempers, E. L. ve Reedijk, J. (1991). Interactions of platinum amine compounds with sulfur-containing biomolecules and DNA fragments. *Advances in inorganic chemistry*, 37, 175-217.
- Levin, H. S. (1979). Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Human Pathology*, 10(5), 569-584.

- Lin, X. ve Okuda, T. ve Holzer, A. ve Howell, S. B. (2002). The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular pharmacology*, 62(5), 1154-1159.
- Lin, Y. ve Ma, W. ve Benchimol, S. (2000). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature genetics*, 26(1), 122-127.
- Lind, M. (2008). Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*, 36(1), 19-23.
- Links, M. ve Lewis, C. (1999). Chemoprotectants. *Drugs*, 57(3), 293-308.
- Lirdi, L. C. ve Stumpp, T. ve Sasso-Cerri, E. ve Miraglia, S. M. (2008). Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(7), 797-808.
- Ludewig, T. ve Gutte, G. ve Zimmermann, H. J. A., histologia, embryologia. (1995). Histomorphometric and histological investigations of the morphometric effects of furazolidone on spermatogenesis in mature rats. *Anatomia, histologia, embryologia*, 24(1), 7-12.
- Makin, G. W., Corfe, B. M., Griffiths, G. J., Thistlethwaite, A., Hickman, J. A., & Dive, C. (2001). Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *The EMBO journal*, 20(22), 6306-6315.
- Malekinejad, H. ve Janbaz-Acyabar, H. ve Razi, M. ve Varasteh, S. (2012). Preventive and protective effects of silymarin on doxorubicin-induced testicular damages correlate with changes in c-myc gene expression. *Phytomedicine*, 19(12), 1077-1084.
- Manohar, S. ve Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of nephrology*, 31(1), 15-25.
- Mansour, H. H. ve Hafez, H. F. ve Fahmy, N. M. (2006). Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *BMB Reports*, 39(6), 656-661.
- Marzban, M., Anjamshoa, M., Jafari, P., Masoumi, H., Ahadi, R., & Fatehi, D. (2017). Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: radioprotective role of silymarin. *Electronic physician*, 9(6), 4524.
- Mastron, J. K. ve Siveen, K. S. ve Sethi, G. ve Bishayee, A. (2015). Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. *Anti-Cancer Drugs*, 26(5), 475-486.

- Maximow, A. A. ve Bloom, W. (1952). A textbook of histology. *A textbook of histology*. (6th Edit).
- Maynard, R. L. ve Downes, N. (2019). *Anatomy and Histology of the Laboratory rat in Toxicology and Biomedical Research*: Academic Press.
- McKeage, M. J. (1995). Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug safety*, 13(4), 228-244.
- Mesbahzadeh, B. ve Hassanzadeh-Taheri, M. ve Aliparast, M.-s. ve Baniasadi, P. ve Hosseini, M. (2021). The protective effect of crocin on cisplatin-induced testicular impairment in rats. *BMC Urology*, 21(1), 1-9.
- Mescher, A. L. (2013). *Junqueira's basic histology: text and atlas* (Vol. 12): McGraw-Hill Medical 13th ed. New York.
- Miguel A. Fuertes, C. A., José. M. Pérez. (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical reviews*, 103(3), 645-662.
- Milić, N. ve Milošević, N. ve Suvajdžić, L. ve Žarkov, M. ve Abenavoli, L. (2013). New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Natural product communications*, 8(12), 1934578X1300801236.
- Moggs, J. G. ve Szymkowski, D. E. ve Yamada, M. ve Karran, P. ve Wood, R. D. (1997). Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic acids research*, 25(3), 480-490.
- Morazzoni, P. ve Bombardelli, E. (1995). *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia (Milano)*, 66(1), 3-42.
- Moshtaghion, S.-M. ve Malekinejad, H. ve Razi, M. ve Shafie-Irannejad, V. (2013). Silymarin protects from varicocele-induced damages in testis and improves sperm quality: evidence for E2f1 involvement. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59(5), 270-280.
- Motzer, R. J. (1993). Optimal treatment for advanced seminoma? : Wiley Online Library.
- Muggia, F. M. ve Los, G. (1993). Platinum resistance: laboratory findings and clinical implications. *Stem Cells*, 11(3), 182-193.
- Mutlu, E. (2013). *Erişkin erkek sıçanlarda doksorubisin ile oluşturulan testis hasarı üzerine L-karnitinin etkisi*. ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Nagai, N. ve Okuda, R. ve Kinoshita, M. ve Ogata, H. (1996). Decomposition kinetics of cisplatin in human biological fluids. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 48(9), 918-924.

- Nakayama, K. ve Miyazaki, K. ve Kanzaki, A. ve Fukumoto, M. ve Takebayashi, Y. (2001). Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. *Oncology reports*, 8(6), 1285-1287.
- Nosseir, N. S. ve Ali, M. H. M. ve Ebaid, H. M. (2012). A histological and morphometric study of monosodium glutamate toxic effect on testicular structure and potentiality of recovery in adult albino rats. *Res j biol*, 2(2), 66-78.
- Ok, E. ve Özyurt, D. ve Gülekli, B. (2008). Asthenozoospermia olgularında sperm morfolojisi değerlendirmede Spermac ve Diff-quick boya yöntemlerinin karşılaştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi*, 50(1), 23-26.
- Oufi, H. G. ve Al-Shawi, N. N. (2014). The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *European journal of pharmacology*, 730, 36-40.
- Oun, R. ve Moussa, Y. E. ve Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton transactions*, 47(19), 6645-6653.
- Ozden, C. ve diğerleri, . (2008). Effect of varicocelectomy on serum inhibin B levels in infertile patients with varicocele. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 42(5), 441-443.
- Öber, A. ve İzzetoğlu, G. T. (2006). *Histoloji: Nobel Yayın Dağıtım*.
- Pabla, N. ve Huang, S. ve Mi, Q.-S. ve Daniel, R. ve Dong, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6572-6583.
- Pearson, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical society*, 85(22), 3533-3539.
- Petrović, M. ve Todorović, D. (2016a). Biochemical And Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Cells. *Facta Universitatis, Series: Medicine & Biology*, 18(1).
- Petrović, M. ve Todorović, D. (2016b). Biochemical And Molecular Mechanisms Of Action Of Cisplatin in Cancer Cells. *Facta Universitatis, Series: Medicine & Biology*, 18(1).
- Peyrone, M. (1844). Ueber die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorür. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 51(1), 1-29.
- Platt, D. ve Schnorr, B. J. A. (1971). Biochemische und elektronenoptische untersuchungen zur frage der beeinflussbarkeit der aethanolschadigung der rattenleber durch silymarin. *Arzneimittelforschung*, 21, 1206-1208.

- Polyak, S. J., Oberlies, N. H., Pécheur, E. I., Dahari, H., Ferenci, P., & Pawlotsky, J. M. (2013). Silymarin for HCV infection. *Antiviral Therapy*, *18*(2), 141-147.
- Porwal, O., Ameen, M. S. M., Anwer, E. T., Uthirapathy, S., Ahamad, J., & Tahsin, A. (2019). Silybum marianum (Milk Thistle): Review on Its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *9*(5), 199-206.
- Pourheydar, B. ve Azarm, F. ve Farjah, G. ve Karimipour, M. ve Pourheydar, M. (2021). Effect of silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, *19*(12), 1091.
- Previati, M., Lanzoni, I., Corbacella, E., Magosso, S., Guaran, V., Martini, A., & Capitani, S. (2006). Cisplatin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *International Journal of Molecular Medicine*, *18*(3), 511-516.
- Qin, N., Hu, X., Li, S., Wang, J., Li, Z., Li, D., ... & Hua, H. (2017). Hypoglycemic effect of silychristin A from Silybum marianum fruit via protecting pancreatic islet β cells from oxidative damage and inhibiting α -glucosidase activity in vitro and in rats with type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods*, *38*, 168-179.
- Rafiee, F. ve Nejati, V. ve Heidari, R. ve Ashraf, H. (2016). Protective effect of methanolic extract of *Berberis integerrima* Bunge. root on carbon tetrachloride-induced testicular injury in Wistar rats. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, *14*(2), 133.
- Rainone, F. (2005). Milk thistle. *American family physician*, *72*(7), 1285-1288.
- Ramasamy, K. ve Agarwal, R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer letters*, *269*(2), 352-362.
- Rastegarpanah, M., Malekzadeh, R., Vahedi, H., Mohammadi, M., Elahi, E., Chaharmahali, M., & Abdollahi, M. (2015). A randomized, double blinded, placebo-controlled clinical trial of silymarin in ulcerative colitis. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, *21*, 902-906.
- Reardon, J. T. ve Vaisman, A. ve Chaney, S. G. ve Sancar, A. (1999). Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum (IV)(JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer research*, *59*(16), 3968-3971.
- Rebillard, A. ve Lagadic-Gossman, D. ve Dimanche-Boitrel, M.-T. (2008). Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Current medicinal chemistry*, *15*(26), 2656-2663.

- Reddy, K. P. ve Madhu, P. ve Reddy, P. S. (2016). Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 65-72.
- Reed, J. C. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nature reviews Drug discovery*, 1(2), 111-121.
- Retana-Márquez, S., Juárez-Rojas, L., Hernández, A., Romero, C., López, G., Miranda, L., ... & Delgadillo, J. A. (2016). Comparison of the effects of mesquite pod and Leucaena extracts with phytoestrogens on the reproductive physiology and sexual behavior in the male rat. *Physiology & behavior*, 164, 1-10.
- Riddell, I. A. ve Lippard, S. J. (2018). 1. Cisplatin and oxaliplatin: our current understanding of their actions. *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents*, 1-42.
- Rigi Manesh, M., Arab, M. R., Sargolzaei Aval, F., Mashhadi, M. A., Sargolzaei, N., Mir, M., & Shahraki Salar, M. (2018). Cisplatin induce changes of cell surface glycoconjugates in germinal epithelium of seminiferous tubules. *Anatomical Sciences Journal*, 15(1), 31-36.
- Rocha, C. R. R. ve Silva, M. M. ve Quinet, A. ve Cabral-Neto, J. B. ve Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73.
- Rosenberg, B. (1980). Cisplatin: Its history and possible mechanisms of action *Cisplatin* (pp. 9-20): Elsevier.
- Ross, M. H. ve Pawlina, W. (2006). *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rossi, A. (2016). Relapsed small-cell lung cancer: platinum re-challenge or not. *Journal of thoracic disease*, 8(9), 2360.
- Rozenzweig, M. ve VON HOFF, D. D. ve SLAVIK, M. ve MUGGIA, F. M. (1977). Cis-diamminedichloroplatinum (II) a new anticancer drug. *Annals of Internal Medicine*, 86(6), 803-812.
- Růžičková, G. ve Fojtová, J. ve Součková, M. (2011). The yield and quality of milk thistle [*Silybum marianum* (L). Gaertn.] seed oil from the perspective of environment and genotype-a pilot study. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 14(1), 9-12.
- Rybak, L. P. ve Mukherjea, D. ve Ramkumar, V. (2019). *Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention*. Paper presented at the Seminars in hearing.
- Saad, S. Y. ve Najjar, T. A. ve Alashari, M. (2004). Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 31(12), 862-867.
- Sadler, T. W. (2014). *Langman's Medical Embryology* Thomas W. Sadler: USA: Lippincott Williams & Wilkins.

- Saller, R. ve Brignoli, R. ve Melzer, J. ve Meier, R. (2008). An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Complementary Medicine Research*, 15(1), 9-20.
- Saller, R. ve Meier, R. ve Brignoli, R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 61(14), 2035-2063.
- Sánchez-Sampedro, M. A. ve Fernández-Tárrago, J. ve Corchete, P. (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of biotechnology*, 119(1), 60-69.
- Scambia, G., De Vincenzo, R., Ranelletti, P. O., Panici, P. B., Ferrandina, G., D'Agostino, G., ... & Mancuso, S. (1996). Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin. *European Journal of Cancer*, 32(5), 877-882.
- Schandalik, R. ve Gatti, G. ve Perucca, E. (1992). Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silymarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung*, 42(7), 964-968.
- Schmoll, H. J., Harstrick, A., Bokemeyer, C., Dieckmann, K. P., Clemm, C., Berdel, W. E., ... & Poliwoda, H. (1993). Single-agent carboplatinum for advanced seminoma a phase II study. *Cancer*, 72(1), 237-243.
- Schuppan, D. ve Jia, J. D. ve Brinkhaus, B. ve Hahn, E. G. (1999). Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology*, 30(4), 1099-1104.
- Schünke, M. ve Schulte, E. ve Schumacher, U. ve Voll, M. ve Wesker, K. (2007). Prometheus Anatomi Atlası, Cilt 2 (Yıldırım, M., Marur, T., Çev.). *İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri*.
- Scott Luper, N. (1998). A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. *Alternative medicine review*, 3(6), 410-421.
- Sedletska, Y. ve Giraud-Panis, M.-J. ve Malinge, J.-M. (2005). Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(3), 251-265.
- Shah, N. ve Dizon, D. S. (2009). New-generation platinum agents for solid tumors.
- Shati, A. A. (2019). Resveratrol improves sperm parameter and testicular apoptosis in cisplatin-treated rats: Effects on ERK1/2, JNK, and Akt pathways. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(3), 236-249.

- Shearer, J. L. ve Salmons, N. ve Murphy, D. J. ve Gama, R. (2017). Postmenopausal hyperandrogenism: the under-recognized value of inhibins. *Annals of Clinical Biochemistry*, 54(1), 174-177.
- Sherif, I. O. ve Abdel-Aziz, A. ve Sarhan, O. M. (2014). Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28(11), 515-521.
- Sherif, I. O. ve Abdel-Aziz, A. ve Sarhan, O. M. J. J. o. b. ve toxicology, m. (2014). Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28(11), 515-521.
- Sheth, S. ve Mukherjea, D. ve Rybak, L. P. ve Ramkumar, V. (2017). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and otoprotection. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 338.
- Shewach, D. S. ve Kuchta, R. D. (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chemical reviews*, 109(7), 2859-2861.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279.
- Siegel, R. L. ve Miller, K. D. ve Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7-30.
- Skowron, M. A., Melnikova, M., Van Roermund, J. G., Romano, A., Albers, P., Thomale, J., ... & Hoffmann, M. J. (2018). Multifaceted mechanisms of cisplatin resistance in long-term treated urothelial carcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 590.
- Spencer, S. J. ve Rabinovici, J. ve Mesiano, S. ve Goldsmith, P. C. ve Jaffe, R. B. (1992). Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. *The Journal of clinical investigation*, 90(1), 142-149.
- Stevens, R. (2006). *Gray's Anatomy for Students: The Royal College of Surgeons of England*.
- Stolf, A. M. ve Cardoso, C. C. ve Acco, A. (2017). Effects of silymarin on diabetes mellitus complications: a review. *Phytotherapy research*, 31(3), 366-374.
- Stordal, B. ve Davey, M. (2007). Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB life*, 59(11), 696-699.
- Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204-247.
- Şentürk, Ş. (2020). Sisplatin Uygulanan Sıçanların Testislerinde Meydana Gelen Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Kurkuminin Etkisi.

- Tamayo, C. ve Diamond, S. (2007). Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.). *Integrative cancer therapies*, 6(2), 146-157.
- Tharmalingam, M. D., Matilionyte, G., Wallace, W. H., Stukenborg, J. B., Jahnukainen, K., Oliver, E., ... & Mitchell, R. T. (2020). Cisplatin and carboplatin result in similar gonadotoxicity in immature human testis with implications for fertility preservation in childhood cancer. *BMC Medicine*, 18(1), 1-16.
- Tian, M., Liu, F., Liu, H., Zhang, Q., Li, L., Hou, X., ... & Sun, Y. (2018). Grape seed procyanidins extract attenuates Cisplatin-induced oxidative stress and testosterone synthase inhibition in rat testes. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(4), 246-259.
- Tilbrook, A. ve De Kretser, D. ve Clarke, I. (1993). Human recombinant inhibin A and testosterone act directly at the pituitary to suppress plasma concentrations of FSH in castrated rams. *Journal of endocrinology*, 138(2), 181-189.
- Trichopoulos, D. ve Li, F. P. ve Hunter, D. J. J. S. A. (1996). What causes cancer? *Scientific American*, 275(3), 80-87.
- Tsang, R. Y. ve Al-Fayea, T. ve Au, H.-J. (2009). Cisplatin overdose. *Drug safety*, 32(12), 1109-1122.
- Tsimberidou, A.-M. ve Braitheh, F. ve Stewart, D. J. ve Kurzrock, R. (2009). Ultimate fate of oncology drugs approved by the us food and drug administration without a randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(36), 6243-6250.
- Türk, G. ve Ateşşahin, A. ve Sönmez, M. ve Çeribaşı, A. O. ve Yüce, A. (2008). Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertility and sterility*, 89(5), 1474-1481.
- Türk, G., Ateşşahin, A., Sönmez, M., Çeribaşı, A. O., & Yüce, A. (2008). Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertility and Sterility*, 89(5), 1474-1481.
- Tyagi, A., Raina, K., Singh, R. P., Gu, M., Agarwal, C., Harrison, G., ... & Agarwal, R. (2007). Chemopreventive effects of silymarin and silibinin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Molecular cancer therapeutics*, 6(12), 3248-3255.

- Tyler, V. (1994). Phytomedicines in Western Europe: their potential impact on herbal medicine in the United States. *Herbalgram*, 30, 24-30.
- Usanova, S., Piée-Staffa, A., Sied, U., Thomale, J., Schneider, A., Kaina, B., & Köberle, B. (2010). Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Molecular cancer*, 9, 1-11.
- Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T. A., Risinger, J. I., Barrett, J. C., ... & Chaney, S. G. (1998). The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer research*, 58(16), 3579-3585.
- Van De Graaff, D. A. M., John L. Crawley. (2011). *photographic atlas for the anatomy and physiology laboratory* (Vol. 7.th edition). 925 W. Kenyon, Unit 12 Englewood, Colorado 80110: Morton Pub. Co.
- Van der Horst, G. ve Skosana, B. ve Legendre, A. ve Oyeyipo, P. ve Du Plessis, S. (2018). Cut-off values for normal sperm morphology and toxicology for automated analysis of rat sperm morphology and morphometry. *Biotechnic & Histochemistry*, 93(1), 49-58.
- Varzi, H. N., Esmailzadeh, S., Morovvati, H., Avizeh, R., Shahriari, A., & Givi, M. E. (2007). Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics*, 30(5), 477-481.
- Vendramini, V. ve Sasso-Cerri, E. ve Miraglia, S. M. (2010). Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. *Reproductive Biology And Endocrinology*, 8(1), 1-13.
- Voinovich, D. ve Perissutti, B. ve Grassi, M. ve Passerini, N. ve Bigotto, A. (2009). Solid state mechanochemical activation of Silybum marianum dry extract with betacyclodextrins: Characterization and bioavailability of the coground systems. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 98(11), 4119-4129.
- Wagner, J. M. ve Karnitz, L. M. (2009). Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Molecular Pharmacology*, 76(1), 208-214.
- Wallace, H. ve Higby, D. (1974). Phase I evaluation of cis-platinum (II) diamminedichloride (PDD) and a combination of PDD plus adriamycin *Platinum Coordination Complexes In Cancer Chemotherapy* (pp. 167-177): Springer.
- Wang ve Dong. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews Drug Discovery*, 4(4), 307-320.

- Wang, K. ve Lu, J. ve Li, R. (1996). The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews*, 151, 53-88.
- Wang, W. ve Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacological reviews*, 50(3), 335-356.
- WHO, W. H. O. (2019a). Sexual and Reproductive Health, Global Prevalence of Infertility, Infecundity and Childlessness Retrieved from <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/burden/en/>
- WHO, W. H. O. (2019b). Sexual and Reproductive Health, Infertility Definitions and Terminology Retrieved from <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>.
- Widmaier, E. P. ve Raff, H. ve Strang, K. T. (2006). *Vander's human physiology* (Vol. 5): McGraw-Hill New York, NY.
- Wilson, J. J. ve Lippard, S. J. (2014). Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. *Chemical Reviews*, 114(8), 4470-4495.
- Wiltshaw, E. (1979). Cisplatin in the treatment of cancer. *Platinum Metals Review*, 23(3), 90-98.
- Won, D. H., Kim, L. H., Jang, B., Yang, I. H., Kwon, H. J., Jin, B., ... & Cho, S. D. (2018). In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumor Biology*, 40(5), 1010428318776170.
- Yaman, O. ve Topcu-Tarladacalisir, Y. (2018). L-carnitine counteracts prepubertal exposure to cisplatin induced impaired sperm in adult rats by preventing germ cell apoptosis. *Biotechnic & Histochemistry*, 93(3), 157-167.
- Yang, S.-H. ve Lin, J.-K. ve Chen, W.-S. ve Chiu, J.-H. J. J. o. S. R. (2003). Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *Journal of Surgical Research*, 113(1), 133-138.
- Yeh, J. ve Kim, B. S. ve Liang, Y. J. ve Peresie, J. (2008). Baseline and stimulated serum inhibin levels as biomarkers of cisplatin-induced ovarian damage in female rats. *American journal of obstetrics and gynecology*, 198(1), 82. e81-82. e86.
- Yucel, C., Arslan, F. D., Ekmekci, S., Ulker, V., Kisa, E., Yucel, E. E., ... & Kozacioglu, Z. (2019). Protective effect of all-trans retinoic acid in cisplatin-induced testicular damage in rats. *The World Journal of Men's Health*, 37(2), 249.
- Zamble, D. B. ve Mikata, Y. ve Eng, C. H. ve Sandman, K. E. ve Lippard, S. J. (2002). Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *Journal of inorganic biochemistry*, 91(3), 451-462.

- Zarif-Yeganeh, M. ve Rastegarpanah, M. (2019). Clinical role of silymarin in oxidative stress and infertility: A short review for pharmacy practitioners. *Journal of research in pharmacy practice*, 8(4), 181.
- Zhang, H. ve Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 9(10), 1773.
- Zhang, J., Wang, L., Xing, Z., Liu, D., Sun, J., Li, X., & Zhang, Y. (2010). Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 10(4), 272-282.

