SİSTEMİK SİTOTOKSİSİTELERDE MEDİKAL OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİ, SPERM KALİTESİNİN KORUNMASI VE FERTİLİTE TAKİBİNDE LOKAL VE SİSTEMİK ANALİZ İLE ENDOKRİN DURUMUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Necdet ALTINER
191550101

DOKTORA TEZİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Erinç SİTAR

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Eylül, 2024

SİSTEMİK SİTOTOKSİSİTELERDE MEDİKAL OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİ, SPERM KALİTESİNİN KORUNMASI VE FERTİLİTE TAKİBİNDE LOKAL VE SİSTEMİK ANALİZ İLE ENDOKRİN DURUMUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Necdet ALTINER
191550101
ORCID: 0000-0001-6837-068X

DOKTORA TEZİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Erinç SİTAR

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Eylül, 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

.

NECDET ALTINER'ın "Sistemik Sitotoksisitelerde Medikal Ozon Tedavisinin Etkileri, Sperm Kalitesinin Korunması ve Fertilite Takibinde Lokal ve Sistemik Analiz ile Endokrin Durumun Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 25.09.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora/Sanatta Yeterlik tezi oy birliğiyle/oy çokluğuyla, başarılı/başarısız olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı. Adı ve Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof.Dr. Mustafa Erinç SİTAR (Danışman) Maltepe Üniversitesi	.....
Üye	Doç.Dr.Yaprak DÖNMEZ ÇAKIL Maltepe Üniversitesi	.....
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Hale BAYRAM Maltepe Üniversitesi	.....
Üye	Doç.Dr.Çağrı ÖNER Kırklareli Üniversitesi	.....
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Dila ŞENER AKÇORA Marmara Üniversitesi	.....

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu doktora programına başvurmamda çok büyük katkısı olan ve her zaman her konuda bana hem abi hem hocam olan Sayın Veteriner Hekim Barış KANBUROĞLU'na, doktora programının başından beri desteğini hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olup yol gösteren yine hem abi hem hocam olan tez aşamasında da danışmanlığımı üstlenen Sayın Prof. Dr. Mustafa Erinç SİTAR'a, yine hem doktora hem de tez aşamasında yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Yaprak Dönmez ÇAKIL ve Doç. Dr. Çağrı ÖNER'e, hem sınıf arkadaşım hem çalışma arkadaşım olan her zaman yardıma koşan, tecrübelerini paylaşmaktan hiç çekinmeyen Dr. Öğr. Üyesi Hale BAYRAM'a, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, tecrübelerini ve imkânlarını paylaşmaktan hiç çekinmeyen sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Damla KAYALI'ya, yine bilgi, beceri ve tecrübelerini paylaşmaktan hiç çekinmeyen sınıf arkadaşım Duygu KÜTÜK'e, hem kardeşim hem çalışma arkadaşım olan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Mol. Bio. Oğuz Kaan TOMBUL'a, her projede her konuda hem kardeş hem de çok iyi bir öğrenci olan Tıp Fakültesi Öğrencisi Abdullah PEHLİVAN'a, çalışma boyunca yardımlarını ve imkanlarını esirgemeyen tüm MÜKKAM ekibine, tecrübelerini paylaşmaktan hiç çekinmeyen her zaman destek olan Dr. Öğr. Üyesi Nur KALUÇ'a, her zaman arkamda olduklarını bildiğim, hiçbir zaman maddi manevi desteklerini esirgemeyen, hep daha iyi olmam için teşvik eden annem Ayşe ALTINER ve babam Halil ALTINER'e teşekkürleri borç bilirim.

Bu çalışma TÜBİTAK 1002-A Hızlı Destek Modülü kapsamında Tübitak tarafından desteklenmiştir.

Necdet ALTINER

Eylül, 2024

ÖZET

SİSTEMİK SİTOTOKSİSİTELERDE MEDİKAL OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİ, SPERM KALİTESİNİN KORUNMASI VE FERTİLİTE TAKİBİNDE LOKAL VE SİSTEMİK ANALİZ İLE ENDOKRİN DURUMUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Necdet Altıner
Doktora Tezi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Erinç Sitar
Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2024

Bleomisin, etoposid, cis-platin (BEP) kombinasyon kemoterapisi sıklıkla erkeklerin üreme organ, doku ve hücrelerinde hasar oluşturmakta ve fertilite potansiyelinde gerileme ile ilişkilendirilmektedir. Bu deneysel sıçan çalışmasında, tekrarlı dozlarda kullanılan medikal ozon terapisinin, BEP tedavisinin erkeklerdeki gonadotoksik etkilerini önleyebilme potansiyeli araştırılmıştır.

Üreme çağına gelmiş erkek Sprague Dawley sıçanlar (n=32) kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon olarak rastgele 4 gruba ayrılmıştır. BEP grubuna 9 hafta boyunca, 3 haftalık 3 kür şeklinde intraperitoneal (IP) yolla bleomisin (0,083 mg/kg), etoposid (0,83 mg/kg) ve cis-platin (0,17 mg/kg) uygulanmış, BEP + Ozon grubuna ise ek olarak haftada 2 kez medikal ozon IP olarak (1 mg/kg) verilmiştir. Ozon grubuna sadece ozon, kontrol grubuna ise %0,9 NaCl uygulanmıştır.

BEP ve ozon uygulanan sıçanların ağırlık artışlarının yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha fazla olduğu, ancak testis ağırlık indekslerinin benzer olduğu bulunmuştur. BEP uygulamasının sperm sayılarını anlamlı ölçüde azalttığı ve morfolojik anomali gösteren sperm sayısını artırdığı gösterilmiştir. Öte yandan, ozon uygulaması ile sperm sayısında anlamlı bir artış ve anomali gösteren sperm sayısında ise anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Endokrinolojik olarak, benzer şekilde, BEP + ozon grubunda testosteron ve tiroid stimülan hormon (TSH) seviyeleri yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Oksidatif stres parametreleri incelendiğinde ise yalnızca BEP uygulanan grupta total oksidan kapasite (TOS) değeri kontrol ve BEP + ozon

gruplarına göre daha yüksekken, BEP + ozon grubunda ise total antioksidan kapasite (TAS) değeri BEP grubuna göre daha yüksektir. Testis dokusundaki histopatolojik değişiklikler Johnson skorlaması ve seminifer tübül epitel kalınlıkları karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve ozon uygulamasının BEP uygulamasının oluşturduğu hasarı anlamlı ölçüde azalttığı bulunmuştur.

Sonuç olarak medikal ozonun, erkek üreme sisteminde BEP uygulamasının hücre morfolojisi, hücre sayıları, redoks hemostazisi ve endokrin durum gibi birçok parametrede olumsuz etkilerini azalttığı kanaatine varılmıştır. Ozon uygulamasının uzun süreli ve tekrarlı kullanımı ve açısından da çalışmamız ilk niteliğindedir ve literatüre önemli katkıları olacağı düşünülmektedir.

ABSTRACT

EFFECTS OF MEDICAL OZONE THERAPY ON SYSTEMIC CYTOTIXICITIES, PRESERVATION OF SPERM QUALITY AND ASSESSMENT OF ENDOCRINE STATUS WITH LOCAL AND SYSTEMIC ANALYSIS IN FERTILITY MONITORING.

Necdet Altıner
PhD Thesis
Histology and Embriology Department
Histology and Embriology Doctorate Programme
Thesis Advisor: Prof. Dr. Mustafa Erinç Sitar
Maltepe University Graduate School, 2024

The combination chemotherapy of bleomycin, etoposide, and cisplatin (BEP) frequently causes damage to male reproductive organs, tissues, and cells, and is associated with a decline in fertility potential. This experimental study in rats investigates the potential of repeated doses of medical ozone therapy to mitigate the gonadotoxic effects of BEP treatment in males.

Male Sprague Dawley rats (n=32) were randomly divided into four groups: Control, BEP, BEP + Ozone, and Ozone. The BEP group received intraperitoneal (IP) injections of bleomycin (0.083 mg/kg), etoposide (0.83 mg/kg), and cisplatin (0.17 mg/kg) for 9 weeks, administered in three 3-week cycles. The BEP + Ozone group received the same BEP regimen plus medical ozone (1 mg/kg) twice a week via IP injection. The Ozone group received only ozone, and the Control group was administered 0.9% NaCl.

The study found that weight gain was significantly higher in the BEP + Ozone group compared to the BEP group, although testis weight indices were similar across these groups. BEP treatment significantly decreased sperm counts and increased the number of sperm displaying morphological anomalies. In contrast, ozone treatment was associated with a significant increase in sperm counts and a reduction in sperm with morphological anomalies. Endocrinologically, the BEP + Ozone group showed higher testosterone and thyroid-stimulating hormone (TSH) levels compared to the BEP group. Regarding oxidative stress parameters, only the BEP group had a higher total oxidative stress (TOS) value compared to the Control and BEP + Ozone groups, whereas the BEP + Ozone group

had a higher total antioxidant capacity (TAS) compared to the BEP group. Histopathological assessment of testis tissue, evaluated by Johnson scoring and seminiferous tubule epithelial thickness, indicated that ozone treatment significantly reduced the damage caused by BEP.

In conclusion, medical ozone appears to mitigate the adverse effects of BEP treatment on cell morphology, cell counts, redox homeostasis, and endocrine status in the male reproductive system. To the best of our knowledge, this study represents a pioneering investigation into the effects of long-term and repeated ozone administration.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xvi
KISALTMALAR xxi
1. GİRİŞ 1
1.1 Problem 1
1.2 Amaç 2
1.3 Önem 3
1.4 Varsayımlar 3
1.5 Sınırlılıklar 4
1.6 Tanımlar 4
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1 Erkek Üreme Sistemi 5
2.1.1 Testis embriyolojisi 5
2.1.2 Testis histolojisi 9
2.1.3 Genital boşaltım kanalları 13
2.1.4 Yardımcı bezler 15

2.1.5 Penis 17
2.2 Spermatogenezis 18
2.3 Spermiyogenez 20
2.4 Olgun Spermin Yapısı 22
2.4.1 Spermin baş yapısı 23
2.4.2 Spermin kuyruk yapısı 23
2.4.3 Sperm morfolojisi 23
2.5 Antineoplastik Tedaviler 25
2.5.1 Bleomisin 26
2.5.2 Etoposit 26
2.5.3 Cis-Platin 26
2.6 Antioksidan Tedaviler 26
2.6.1 Erkek gonadotoksisitesinde antioksidanlar 27
2.6.2 Medikal ozon 27
3. YÖNTEM 30
3.1 BEP Protokolü ve Medikal Ozon Tedavisi 30
3.1.1 Uygulanan ilaç madde dozları 30
3.2 Doku ve Örneklerin Toplanması 35
3.3 Sperm Toplama 36
3.3.1 Makler kamerası ile sperm sayımı 37
3.3.2 Sperm morfolojisi değerlendirme 38
3.3.3 Sperm ölü-canlı oranı değerlendirmesi 39
3.4 Testis Histomorfolojisi 39
3.4.1 Doku takibi 39
3.4.2 Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama 39

3.4.3 Johnson skorlama 40
3.5 Serum Örneğinden Total Testosteron Seviyesi Ölçümü 41
3.6 Serum Örneğinden TSH (Tiroid Stimülan Hormon) Ölçümü 42
3.7 Serum Örneğinden TAS (Total Antioksidan Kapasite) Ölçümü 42
3.8 Serum Örneğinden TOS (Total Oksidan Seviyesi Kapasite) Ölçümü 43
3.9 Serum Örneğinden Beta-hCG (beta-human koryo gonadotropik hormon) ve AFP (Alfa-Fetoprotein) Seviyelerinin Ölçümü 43
3.10 Mitokondriyal Transmembran Potansiyeli Ölçümü 44
3.11 Araştırma Modeli 44
3.12 Evren ve Örneklem 45
3.13 Veriler ve Toplanması 45
3.14 Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 47
4.1 Bulgular 47
4.1.1 Kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının vücut ağırlıklarının ve ağırlık artışlarının karşılaştırılması 47
4.1.2 Kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Testis Ağırlık İndekslerinin (TAİ) karşılaştırılması 50
4.1.3 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis ağırlıklarının karşılaştırılması 52
4.1.4 Sperm parametrelerinin Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarında karşılaştırılması 56
4.1.5 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm ölü-canlı oranın karşılaştırılması 72
4.1.6 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının endokrin ve redoks değerlerinin karşılaştırılması 74

4.1.7 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis histopatolojisinin değerlendirilmesi 83
4.1.8 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının mitokondriyal transmembran potansiyellerinin flow sitometri sonuçlarının değerlendirilmesi 88
4.2 Tartışma 91
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 97
KAYNAKÇA 99
EKLER 109
EK 1: Etik Kurul Onay Formu 109
EK 2: Deney hayvanları kullanım sertifikası 110
ÖZ GEÇMİŞ 111

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kruger Morfolojik Kriterleri 24

Tablo 2. BEP Tedavisi Grubu Tedavi Protokolü 32

Tablo 3. Kontrol Grubu Tedavi Protokolü 33

Tablo 4. BEP+Medikal Ozon Grubu Tedavi Protokolü 34

Tablo 5. Medikal Ozon Grubu Tedavi Protokolü 35

Tablo 6. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Protokolü 40

Tablo 7. Modifiye Johnson Skorlama 41

Tablo 8. Kontrol, BEP, BEP + Ozon, Ozon gruplarının başlangıç, bitiş vücut ağırlıkları ve ağırlık artışları (min-mak, ort ± ss). 47

Tablo 9. Kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon gruplarının vücut ağırlık artışlarının karşılaştırmaları 48

Tablo 10. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis ağırlık indeksleri (min-mak, ort ± ss). 50

Tablo 11. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) karşılaştırması 51

Tablo 12. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağ ve sol testislerin ağırlıklarının karşılaştırılması (min-mak, ort ± ss) 52

Tablo 13. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağ testis ağırlıklarının karşılaştırılması 53

Tablo 14. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması 54

Tablo 15. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm parametreleri (min-mak, ort ± ss). 57

Tablo 16. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm sayısı 58

Tablo 17. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının normal morfolojili sperm sayısı..... 60

Tablo 18. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının morfolojik anomali gösteren sperm sayısı 61

Tablo 19. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının baş anomalisi gösteren sperm sayıları 63

Tablo 20. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının boyun anomalisi gösteren sperm sayıları 66

Tablo 21. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları 68

Tablo 22. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının çoklu anomaliye sahip sperm sayıları 70

Tablo 23. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının canlı sperm sayılarının ortalamalarının karşılaştırılması..... 72

Tablo 24. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının canlı sperm sayılarının genel karşılaştırılması 73

Tablo 25. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması Testosteron, TAS, TOS ve TSH seviyelerinin karşılaştırılması (min-mak, ort ± ss). 74

Tablo 26. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testosteron seviyeleri (ng/mL)..... 75

Tablo 27. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TOS seviyeleri (µmol H2O2Eq / L) 77

Tablo 28. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TAS seviyeleri (mmol Trolox Eq / L)..... 79

Tablo 29. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TSH seviyeleri (mIU/L)..... 81

Tablo 30. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Johnson Skorlama ve Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı Karşılaştırması 84

Tablo 31. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Johnson Skorlama Verileri..... 85

Tablo 32. Seminifer Tübül Epitel Kalınlıkları (µm)..... 87

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Erkek üreme sisteminin komponentleri 5

Şekil 2. Erkek cinsiyet gelişimi ve gelişmekte olan üreme organları üzerindeki hormonal etki diyagramı 6

Şekil 3. Mezenterik Kanal ve Genital Sırt İlişkisi 7

Şekil 4. Gelişimin 3. haftasında (3 haftalık embriyo) germ hücreleri ve göç yolları 7

Şekil 5. Dış genital henüz farklanmamış evreler 4. ve 6. haftalar 8

Şekil 6. Erkek dış genital organ gelişiminin 10. haftası 9

Şekil 7. İnsan testisinin sagital kesiti 10

Şekil 8. Testisin yapısı 11

Şekil 9. Seminifer tübül genel görünüm 12

Şekil 10. Prostat bezi diyagramı 16

Şekil 11. Erkek üreme sisteminin arkadan görünüşü 17

Şekil 12. (Harin Padma-Nathan) 18

Şekil 13. Spermatogenez 20

Şekil 14. Spermiyogenezis 22

Şekil 15. Olgun İnsan Sperminin Yapısı 22

Şekil 16. Sıçan Sperm Yapısı 23

Şekil 17. İnsan sperminde morfolojik anomaliler 24

Şekil 18. Sıçan sperm anomalileri (https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopy-pictures-showing-sperm-from-cauda-epididymis-of-rats-A_fig1_287595713) 25

Şekil 19. Epididimler kıyım yöntemi ile kesilip büyük doku parçaları ortamdan uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm 36

Şekil 20. Makler Kamerası 37

Şekil 21. Makler Kamerası ile Mikroskobik Görünüm 38

Şekil 22. Kontrol, BEP, BEP + Ozon, Ozon uygulaması gruplarının vücut ağırlık artışları (g) Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 49

Şekil 23. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis ağırlık indeksleri Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 50

Şekil 24. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağ testis ağırlıklarının karşılaştırılması grafiği Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 53

Şekil 25. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması grafiği Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 55

Şekil 26. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm sayıları Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 59

Şekil 27. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının normal morfolojili sperm sayısı ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 60

Şekil 28. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının morfolojik anomali gösteren sperm sayısı ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 62

Şekil 29. Kontrol grubu düzleşmiş baş morfolojisi (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X) 63

Şekil 30. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının baş anomalisi gösteren sperm sayıları ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 64

Şekil 31. BEP Grubu kırık boyun anomalisi (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X) 65

Şekil 32. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının boyun anomalisi gösteren sperm sayıları ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 66

Şekil 33. Ozon grubu kırık kuyruk anomalisi (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X) 68

Şekil 34. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları (a)= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 69

Şekil 35. BEP + Ozon Grubu çoklu anomali (düzleşmiş baş ve kırık kuyruk) (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X) 70

Şekil 36. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının çoklu anomaliye sahip sperm sayıları (a)= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 71

Şekil 37. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının canlı sperm sayıları karşılaştırması (b)= 200 sperm sayılarak elde edilen sonuç Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 73

Şekil 38. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testosteron seviyeleri (ng/mL) Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 76

Şekil 39. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TOS seviyeleri (µmol H2O2Eq / L) Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 78

Şekil 40. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TAS seviyeleri (mmol Trolox Eq / L) Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 79

Şekil 41. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TSH seviyeleri (mIU/L) Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 81

Şekil 42. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon Uygulaması Gruplarının karşılaştırmalı testis histogramı (A: Kontrol, B:Ozon, C:BEP, D: BEP + Ozon,. n:normal tübül, Ok başı: epitelde incelme, Ok: Vakuol, Siyah *: interstisyel alanın bütünlüğünü kaybetmesi, Kırmızı *: Deskuamasyon) 83

Şekil 43. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Johnson Skorlaması Verilerinin Karşılaştırması Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 86

Şekil 44. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Seminifer Tübül Epitel Kalınlıkları (µm) karşılaştırması Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. (Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil) 87

Şekil 45. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kümelenmiş ve monomer yapıda olan hücrelerin yüzde değerleri 89

Şekil 46. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağlıklı hücrelerin yüzde (%) ortalamaları 89

Şekil 47. Sıçan spermlerinin kanca şeklinde baş kısmından kaynaklı kümelenmeleri .. 90

Şekil 48. Santrifüjleme esnasında meydana gelen kümelenmelere bağlı gerçekleşen olaylar 91

KISALTMALAR

ABP : Androjen Bağlayıcı Protein

AC : Antioksidan Kokteyli

AFP : Alfa-fetoprotein

AMH : Antimüllerian Hormon

ARE : Antioksidan Tepki Elementini

ATP : Adenosin Trifosfat

BEP : Bleomisin Etoposid Cis-platin

Beta – hCG : İnsan Koryonik Gonadotropini

CAT : Katalaz

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FDA : Gıda ve İlaç Yönetimi

FSH : Folikül Uyarıcı Hormon

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

H&E : Hematoksilen Eozin Boya

IP : İntraperitoneal

Keap1 : Kelch-Benzeri ECH Birleştirici Protein 1

MIF : Müllerian İnhibe Edici Faktörü

MO : Medikal Ozon

MÜDEHAM : Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

MÜHADYEK : Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu

NaCl : Serum Fizyolojik

NO : Nitrik Oksit

NrF2 : Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2

O_3 : Medikal Ozon

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz

ROS : Reaktif Oksijen Türevleri

Se : Selenyum

SOD : Süperoksit Dismutaz

SRY : Cinsiyet Belirleyici Bölge – Y geni

TAİ : Testis Ağırlık İndeksi

TAS : Total Antioksidan Seviyesi

TDF : Testis Belirleyici Faktörü

TOS : Total Oksidan Seviyesi

TSH : Tiroid Stimülan Hormon

Zn : Çinko

1. GİRİŞ

1.1 Problem

Testis kanseri fizyolojik, genetik ve çeşitli çevresel etkenlere bağlı olarak üreme çağına gelmiş erkeklerde sıkça gözlemlenen bir kanser türüdür (Marcon vd., 2008). Cerrahi girişimler ve radyoterapi ile birlikte kemoterapi testis kanserinde iyileşme oranını ciddi oranda arttırmaktadır (Kawai K., Akaza H., 2010). Tedavi amacıyla çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmakta olup bunların içerisinden bleomisin, etoposid ve cis-platin (BEP) kombinasyonunun, kanser hastalarında en etkili tedavi şekli olduğu gösterilmiştir (Albers P vd., 2008; Culine S vd., 2008; Feldman D.R vd., 2008; Bamias A vd., 2011; Calabro F vd.,2012). BEP kombinasyonunun kullanılmasında ilk 5 yıldaki sağkalım %90 oranında bulunmuştur (Einhorn & Foster, 2006; Kopp vd., 2006). BEP Protokolünün bu yüksek düzeyde tedavi oranı ile birlikte, kısa ve uzun dönemde üreme fonksiyonlarında ve fertilite üzerindee olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu ilaçların gonadotoksik olduğu, kısırlığa ve sekonder tümör gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir (Howell SJ, Shalet SM, 2005). Yapılan hayvan deneylerinde BEP protokolünün, oligospermi ve azospermiye neden olduğu (Howell SJ, Shalet SM, 2001; Howell SJ, Shalet SM, 2005; Jahnukainen K. vd., 2011), sperm sayısı ve motilitesinde azalmaya yol açtığı, germ hücre apoptozisinde artışa ve seminifer tübüllerde atrofiye yol açtığı gösterilmiştir (Bieber A.M vd., 2006; Marcon L. vd., 2008). Bununla birlikte sperm başındaki proteinlerde bozulmalara yol açtığı bildirilmiştir (Ateşşahin A vd., 2006; MaselliJvd.,2012).

Bu ilaçların oksidatif stres ile alakalı genlerin ekspresyonunu arttırdığı ve spermatogonial kök hücreleri yok ettiği, sperm kromatin bütünlüğünü değiştirdiği ve DNA metilasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Marcon L vd., 2011; Delbes G vd., 2007; Chan D vd., 2012). Bleomisin, DNA zincirine karışıp zincirleri birbirinden ayıran iki bileşenden oluşur. Bu bileşenler yakın çevrelerinde zararlı oksidanları serbest bırakan aktif bir kompleks oluşturur (Hay, Shahzeidi, & Laurent, 1991). Tedavide BEP alımının ardından gerçekleşen testiküler germ hücrelerinin ölümü ve seminifer tübüler atrofinin, oksidatif stres ve p53 e bağlı apoptozdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Narayana K vd., 2012).

BEP kemoterapisinin aynı zamanda Leydig hücrelerinde işlevsel bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (Howell SJ vd., 2002).

BEP kemoterapisinin tedavilerde etkili bir şekilde kullanılmasına karşın uygulanan ilaçların gonadotoksik etkileri büyük bir endişe yaratmaktadır (Howell SJ, Shalet SM, 2005). Bu nedenle tüm testis hücrelerini ilaçların toksisitesinden korumak için çeşitli multidisipliner çalışmalar yapılmaktadır. Bunların sonucunda kemoterapinin hedef dışı etkilerini minimuma indirgemek için onaylanmış koruyucu antioksidan tedaviler ortaya konulmuştur (Wyns C vd., 2010).

1.2 Amaç

Ana amaçlar:

- Medikal ozonun güçlü antioksidan etkisini kullanarak, kemoterapötiklerin neden olduğu gonadotoksik etkileri (sperm sayısında ve canlılığında azalma, seminifer tübüler atrofi vb.) önlemek veya azaltmak.

- Sperm hasarını önleyerek, kemopteropötiklerin gonadlarda oluşturduğu toksik etkiler sonucu kaçınılmaz olan infertilitenin önüne geçmek.

- Medikal ozon terapisinin spesifik dozda uzun süreli kullanımı açısından etkilerini ortaya koymak.

Bu amaçlar göz önüne alındığında yanıtlamaya çalıştığımız sorular aşağıdaki gibidir;

- BEP protokolü uygulanan erkeklerde, medikal ozon terapisi oluşan gonadotoksisiteyi önleyebilir mi ya da azaltabilir mi?

- Ozon tedavisi gonadotoksisiteye bağlı infertiliteyi engelleyebilir mi, germ hücrelerinde infertilite ile sonuçlanan durumları (germ hücre sayısında ve canlılığında azalma, seminifer tübüler atrofi vb.) önleyebilir mi ya da azaltabilir mi?

- Uzun süreli kullanımda medikal ozonun faydalı etkilerinin yanı sıra yan etkileri nasıldır?

- Ozon tedavisinin tümörogenesise etkisi nasıldır?

1.3 Önem

Kemoteropötik ilaçlar kanserli hücreleri tedavi ederken hedef dışı hücrelere, dokulara ve organlara da zarar vermektedir. Testis kanseri tedvisinde kullanılan BEP kombinasyonu gonadotoksik etki yaratmaktadır. Gonadlarda oluşan hasar sonucu infertilite gözlenmektedir.

İlaçların sitotoksik etkilerini azaltmak veya tamamen engellemek için çeşitli antioksidan ajanlarla tedavi protokolleri uygulanmakta olup, başarılı sonuçlar elde edildiği takdirde BEP'e bağlı infertilite bir sorun olmaktan çıkabilir veya hasar ciddi oranlarda azaltılabilir.

Daha önce yapılan hayvan deneylerinde çeşitli antioksidan ajanlar kullanılmış olup, testis hasarında azalma, oksidatif streste azalma, iyileşme oranında artma gibi çeşitli sonuçlar elde edilmiştir.

Antioksidan özelliği güçlü olan medikal ozonun tedavi amaçlı intraperitoneal ve/veya intratestiküler uygulanması, kemoterapi tedavisi gören hastalarda koruyuculuğunun belirlenmesi, literatüre katkı sağlayacaktır.

1.4 Varsayımlar

Yapılan çalışmalar sonucu kemoterapinin hedef dışı etkilerini minimuma indirgemek için onaylanmış koruyucu antioksidan tedaviler ortaya konulmuştur (Wyns C vd., 2010). Örnek bir çalışmada, Zn, Se, L-askorbik asit ve a-tokoferol'den oluşan bir antioksidan kokteyli (AC)' nin BEP in etkilerini net bir şekilde ortadan kaldırmasa da BEP'e bağlı infertilitenin iyileşmesini arttırdığı, sperm yapısını ve işlevini BEP'in olumsuz etkilerinden görece koruduğu, germ hücrelerinin hayatta kalma oranını ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Kilarkaje N vd., 2013). Medikal ozon tedavisinin, düşük doz ve ardışık kontrollü uygulamalarda oluşturduğu indüklenmiş oksidatif stres, koruyucu moleküllerin hızlı sentezlenmesinde etki ederek antioksidan sistemi güçlendirip, oksidanlara karşı bir tür güçlendirilmiş savunma sağlamaktadır (Peterson DR vd., 2004). Tusat ve ark. deneysel olarak yaptığı bir çalışmada, eksperimental testis torsiyonu modeli oluşturulmuş ve uygulanan ozon tedavisinin ardından testiste iskemi ve reperfüzyon şiddetinin azaldığı gösterilmiştir (Tusat M vd., 2017). Kemoterapötik ilaçların testisler üzerindeki sitotoksik etkilerinin sebep olduğu

hasar ya da infertilite durumlarında tedavi amaçlı medikal ozon tedavisi kullanılması ile ilgili herhangi başka bir kaynağa ulusal ve uluslararası literatürde rastlanmamış olup, medikal ozonun güçlü antioksidan etkisi ve daha önceki çalışmalarda kullanılmasının sonuçları göz önüne alındığında sitotoksisiteye bağlı hasarı azaltabileceği ya da tamamen engelleyebileceğine, doğal olarak oluşan infertiliteyi de önleyebileceği ya da şiddetini azaltabileceğine dair güçlü veriler bulunmaktadır.

1.5 Sınırlılıklar

Çalışmamızda deney grupları oluşturulurken intratestiküler medikal ozon grubu oluşturulması düşünüldü. Fakat bu grupta yapılacak uygulama hayvanların testislerine iğne batırılması esasına dayandığı için bahsi geçen grupta ekstra stres yaratabileceği ve bunun da kullanılan medikal ajanlara ek olarak serbest oksijen radikallerini daha fazla arttırabileceği düşünüldü. Uygulamanın sedasyon altında yapılması planlandı fakat bunun da uygulama zorluğu ve bahsi geçen grup için diğerlerinden daha fazla sedatif ve anestetik madde alımına yol açacağı için bu uygulamadan da vaz geçildi. Bundan dolayı hayvanlara medikal ozonun yalnızca intraperitoneal olarak verilmesinde karar kılındı.

1.6 Tanımlar

Antioksidan: Hücrelerde prooksidan-oksidan dengesinin bozulmasıyla çıkan ve hücre canlılığını tehlikeye sokan maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayan moleküllerdir.

Gonadlar: Bireylerde üreme hücreleri olarak görev alan gametleri oluşturan organlardır.

Kemoterapötik: Çeşitli mikroorganizmaların (parazit, virüs, bakteri vb. etkenlerin) canlı organizmada yol açtığı hastalıkların ya da tümöral etkenlerin tedavisinde kullanılan ilaçlardır.

Spermatogenez: Spermatogonyumlardan, sperm oluşum sürecidir.

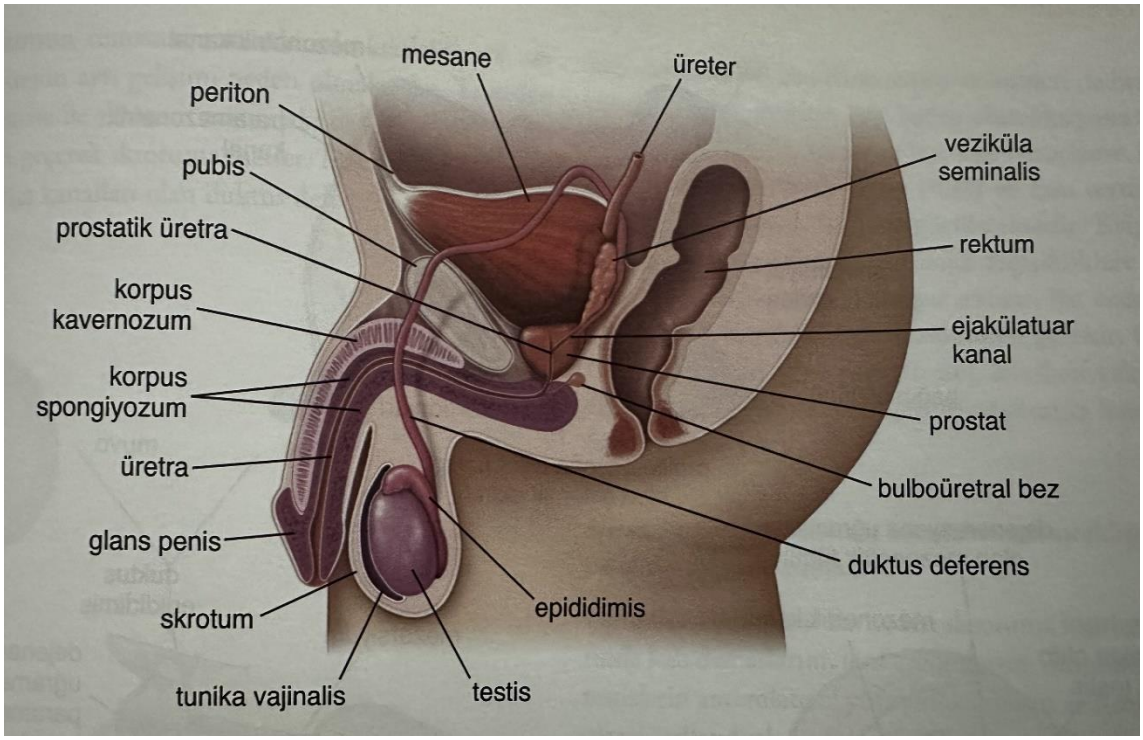
Spermatozoa: 23 kromozomlu erkek üreme hücresidir.

Spermiyogenez: Spermatidlerin spermatozoa ya dönüşüm sürecidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Erkek Üreme Sistemi

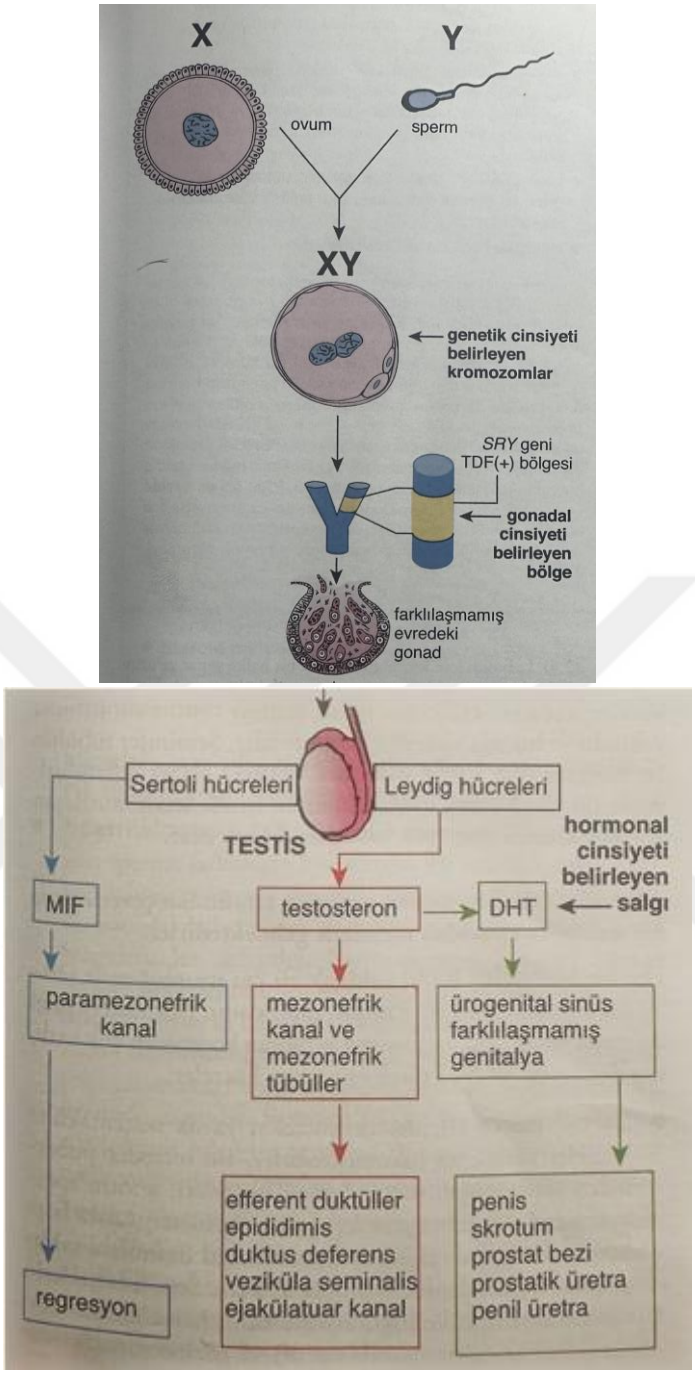
Genital boşaltım kanalları, testisler, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Erkek üreme sisteminin komponentleri (Ross ve Pawlina, 2017)

2.1.1 Testis embriyolojisi

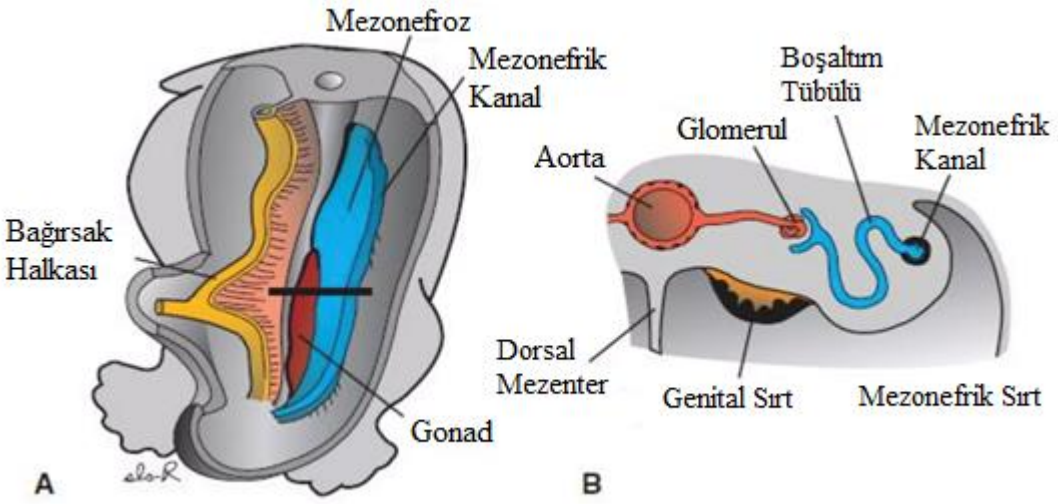
Y kromozomunun kısa kolundaki cinsiyet belirleyici bölgede bulunan SRY geni, cinsiyeti belirleyen kritik bir rol oynar. SRY geni, testis belirleyici faktörü (TDF) adı verilen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. TDF, DNA'nın belirli bölgelerine bağlanarak DNA'nın yapısını değiştirir ve böylece diğer transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını sağlar. Bu süreç, testislerin ve diğer erkek cinsiyet organlarının oluşumunu başlatan genlerin aktif hale gelmesini sağlar. Sonuç olarak, TDF geni var olduğunda erkek fenotipi, yokluğunda ise kız fenotipi gelişir (Ross ve Pawlina, 2017).



Şekil 2. Erkek cinsiyet gelişimi ve gelişmekte olan üreme organları üzerindeki hormonal etki diyagramı (Ross ve Pawlina, 2017)

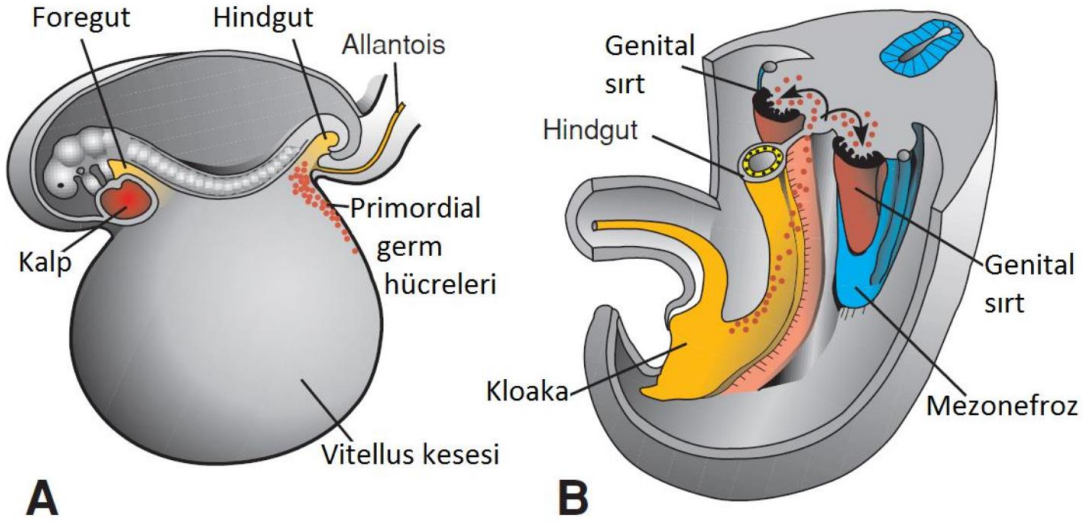
2.1.1.1 Gonadların gelişmesi

Gelişimin 7. haftasına kadar embriyonun cinsiyeti belli değildir. Gonadlar henüz uzunca bir çift genital sırt şeklinde görülür. Bu genital sırtlar epitel proliferasyonu ve mezenşimal dokunun yoğunlaşması sonucu oluşmuşlardır (Şekil 3).



Şekil 3. Mezenterik Kanal ve Genital Sırt İlişkisi (Sadler, 2020)

Gelişimin 3. haftasında primitif çizgi üzerinde göç eden epiblast kökenli germ hücreleri yolk kesesinin allantois tarafında bulunan endoderm hücreleri arasına yerleşir. Daha sonra son barsak mezenterinin sırt kısmı boyunca ilerleyerek pirimitif gonadlara gelir ve 6. haftada genital sırtlara yerleşir (Şekil 4). Germ hücrelerinin genital sırtlara yerleşmesi gonadların farklanmasını indükler (Sadler, 2020; Tapul, 2018; Cochard, 2013).



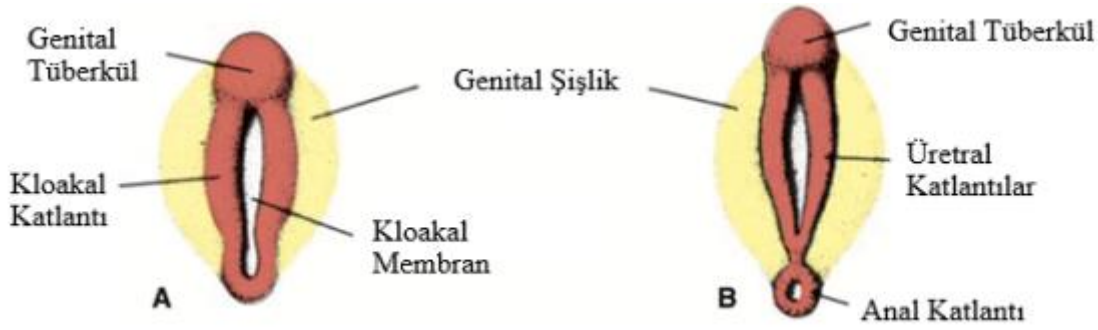
Şekil 4. Gelişimin 3. haftasında (3 haftalık embriyo) germ hücreleri ve göç yolları (Sadler, 2020)

2.1.1.2 Testislerin gelişimi

Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartılara gerçekleştirdiği göç, ürogenital kabartılarda bulunan mezodermal hücrelerin ve kölomik mezotelyum hücrelerinin, primer cinsiyet kordonlarını oluşturmasını indükler. Primer cinsiyet kordonları da daha sonra seminifer kordonlara farklılaşır ki bunlar da seminifer tübülleri, düz tübülleri ve rete testisi oluşturur. Gelişimin ilk evresinde testisler, posterior abdominal duvardaki ürogenital kabartılardan gelişir. Bu kabartılar henüz herhangi bir cinsiyete farklılaşmamış olan primordiyumlardır. Emriyonun erkek yönünde gelişimi SRY geninin özellikle pre-Sertoli hücrelerinden ekspresyonu sayesinde olur. Gelişimin erken safhasında seminifer kordonları ayıran mezenkim, interstisyel (Leydig) hücreleri oluşturur, bunlar da farklılaşmamış primordiyumun testise gelişimini stimüle edecek olan testosteronu üretir. Testosteron mezonefrik Wolff kanallarının gelişiminden ve daha sonra erkek boşaltım kanallarına farklılaşmasından sorumludur. Yine bu evrede, Müllerian inhibe edici faktörü (MIF) üretecek olan sertoli hücreleri seminifer kordonların içerisinde gelişir. MIF paramezonefrik kanallarda (Müller Kanalı) hücre bölünmesini azaltarak dişi üreme organlarının gelişimini inhibe eder (Ross ve Pawlina, 2017).

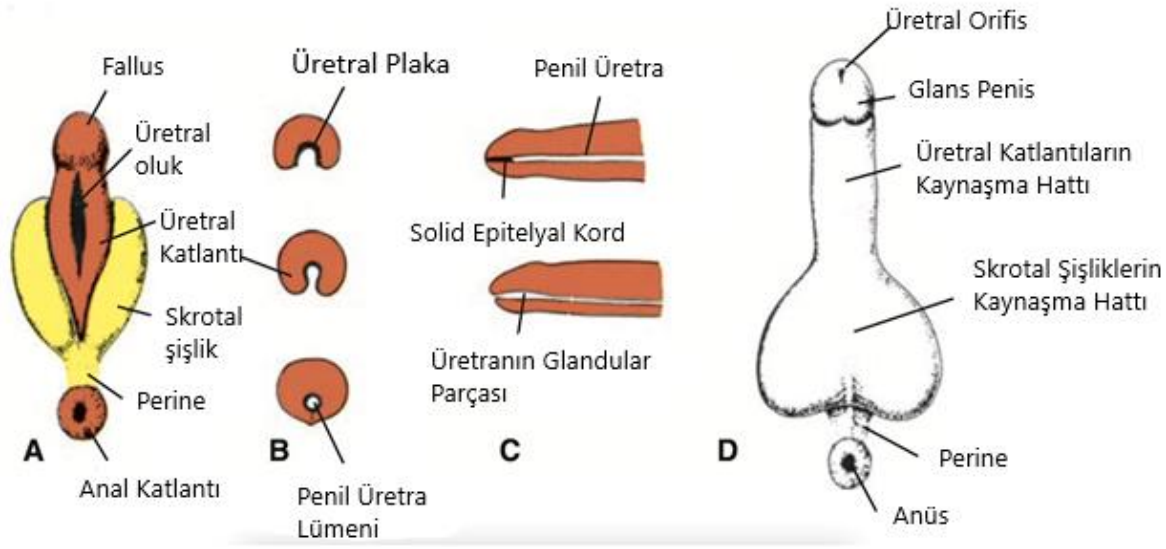
2.1.1.3 Dış genital organların gelişimi

Primitif çizgi kökenli mezenşim hücreleri 3. haftada kloakal katlantıyı meydana getirir. Kloakal katlantı da kloakal membranın kranialinde genital tüberkülü, kaudalinde ön tarafta üretral katlantıyı, arka tarafta ise anal katlantıyı oluşturur (Şekil 5). Üretral katlantıların yanlarında daha sonra erkeklerde skrotumu dişilerde ise labia majorları oluşturacak olan bir çift yükselti yer alır (Cochard, 2013; Tapul, 2018).



Şekil 5. Dış genital henüz farklanmamış evreler 4. ve 6. haftalar (Sadler, 2020)

Fetal testislerden salgılanan androjenler daha sonra fallus adını alacak olan genital tüberkülü hızla uzatır. Uzamayla beraber üretral katlantılar da öne doğru çekilir ve üretral oluğun duvarını oluşturur. Üretral oluk fallusun kaudaline kadar gelir fakat glans kısmına ulaşamaz. Oluğun içini endoderm tabakasından köken alan epitel döşer ve bu üretral plağı oluşturur (Şekil 6). Üretral plak üzerine kapanan üretral kıvrımlar sayesinde 3. ayın sonunda penil üretra oluşur (Cochard, 2013; Sadler, 2020).



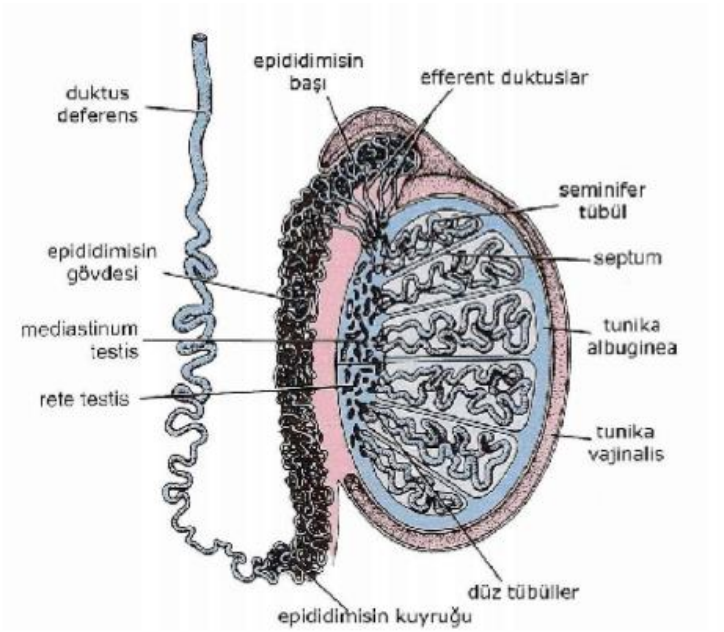
Şekil 6. Erkek dış genital organ gelişiminin 10. haftası (Sadler; 2020)

2.1.2 Testis histolojisi

Testisler, yetişkin erkek bireylerde skrotum adı verilen testis torbası içerisinde yerleşik, çevresinde tunika albuginea adı verilen tıkız bağ dokudan oluşan bir kapsül bulunan bir çift organdır. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testis adı verilen bir yapı oluşturur ve buradan bezin içine giren uzantılar (septumları) bezi lobüllere bölerek yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile birlikte interstisyel hücreler (Leydig hücreleri, testosteron salgılayan hücreler) ve 1 ila 4 adet çok kıvrımlı seminifer tübül (sperm üretiminin gerçekleştiği tübüller) bulunur (Mescher, 2019).

Testisler, embriyonik gelişim sırasında karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetusun gelişimiyle birlikte göç ederek, skrotum içerisinde spermatik

kordonların ucunda asılı olarak yerleşirler (Şekil 7). Bu göç esnasında her testis tunika vaginalis adı verilen ve peritondan köken alan seröz bir kese taşır. Tunika vaginalis dışta skrotumu döşeyen pariyetal tabaka ile tunika albuginea'yı testisin ön ve yan taraflarından saran içte viseral tabakadan oluşur (Mescher, 2019).



Şekil 7. İnsan testisinin sagital kesiti (Ross ve Pawlina, 2017)

Sperm oluşumu için gerekli moleküler işlemler 37 ˚C de gerçekleşmez. Bu işlemlerin gerçekleşmesi için gereken 34 ˚C lik sıcaklığın korunması için skrotumda çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Testiküler arterler testislerden gelen serin kanı içeren panpiniform venöz pleksus ile sarılmıştır. Bu sayede zıt yönlü akış ısı değişim sistemi ile venöz pleksus, arteriyel kandan ısı çekerek testisin sıcaklığını kontrol altından tutar (Mescher, 2019).

2.1.2.1 İnterstisyel doku

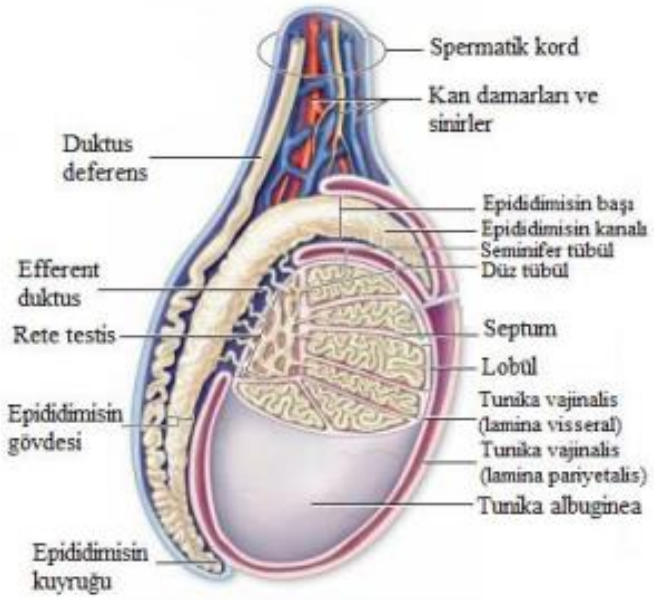
Seminifer tübüller arasında fibroblast, lenf damarları ve pencereli kapillerlerin bulunduğu kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. İnterstisyel hücreler (Leydig hücreleri) merkezi yerleşik çekirdekli, lipit damlacıkları içeren eozinofilik çekirdekli ve poligonal hücrelerdir. Steroid bir hormon olan testosteron üretiminden sorumlu hücrelerdir. İnterstisyel hücreler erken fetal yaşamda farklılaşarak testosteron salgılar.

Testosteron salgılanması embriyonik gelişimde gonadların normal gelişimi için, pubertede cinsel olgunluk ve yetişkinlikte de üreme fonksiyonlarının gelişimi için gereklidir (Ross ve Pawlina, 2017).

2.1.2.2 Seminifer tübüller

Genç yetişkin bireylerde her gün ortalama $2x10^8$ sperm üretilir. Her testiste yaklaşık olarak 250 ila 1000 adet seminifer tübül bulunur. Bu tübüllerin çapı yaklaşık 150-250 µm ve uzunluğu ise 30-70 cm arasındadır. Bir testisteki toplam seminifer tübül uzunluğu yaklaşık 250 metredir.

Seminifer tübüller kıvrımlı olup, nispeten daha kısa ve dar olan düz tübüller aracılığı ile rete testise bağlanır. Rete testis, mediastinum testisin içine gömülü halde bulunan, epitel ile döşenmiş kanallardan meydana gelmiş bir labirenttir. Rete testisin kanalları epididimisin baş kısmına, yaklaşık olarak 10-20 adet duktuli efferentes ile bağlanır (Şekil 8) (Mescher, 2019).

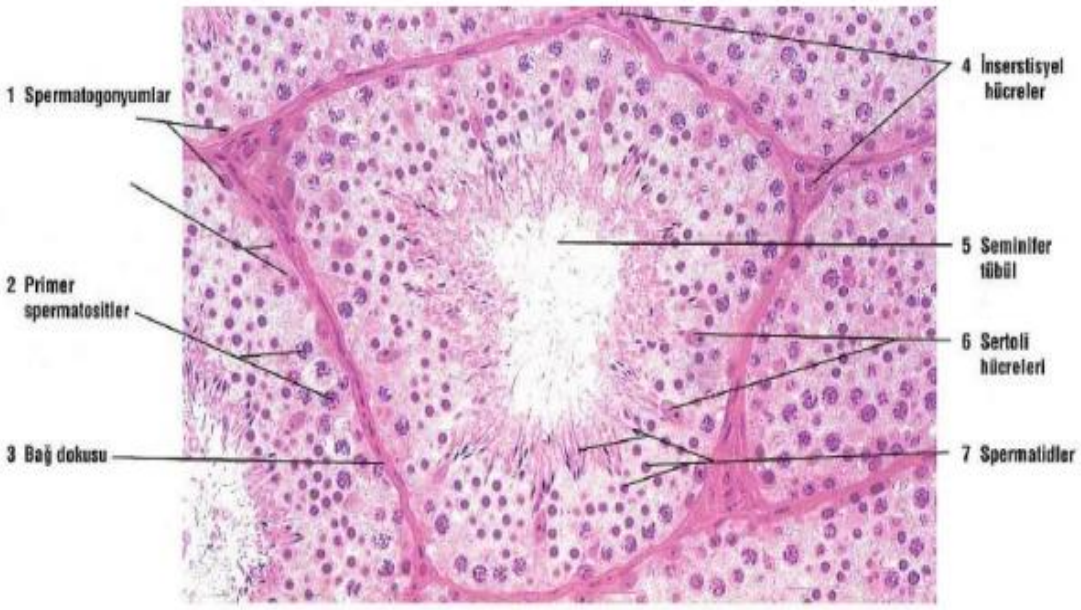


Şekil 8. Testisin yapısı (Mescher, 2019)

Her seminifer tübül, Germinal ya da Spermatogenik epitel olarak adlandırılan özelleşmiş çok katlı yassı epitel ile sarılmıştır.

Germinal epitel iki farklı hücre tipinden meydana gelir;

- Bölünemeyen büyük Sertoli hücreleri
- Bölünebilen spermatogenik seri hücreler (Mescher, 2019)



Şekil 9. Seminifer tübül genel görünüm (Eroschenko ve Di Fiore, 2013)

2.1.2.3 Sertoli hücreleri

Uzun prizmatik ya da piramidal epitel hücreleridir. Sertoli hücreleri seminifer epitelin gerçek epitelini oluşturmaktadırlar. Spermatogenik seri hücrelerinin hepsi sertoli hücrelerinin yüzeyi ile temas halindedirler ve onlardan metabolik ve fiziksel destek sağlarlar. Her bir Sertoli hücresi yaklaşık olarak 30 – 50 adet germ hücrelerini destekler. Mikroskobik olarak incelendiğinde çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum (ER), az sayıda granüllü ER, iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve lizozom içerdiği görülmektedir (Ross ve Pawlina, 2017, Mescher, 2019).

Sertoli hücrelerinin bir diğer önemli görevi de bazolateral hücre zarları arasında sıkı bağlantılar ile seminifer epitelde kan-testis bariyerini oluşturmaktır. Bu fiziksel bariyer memelilerdeki kan-doku bariyerlerinden en sıkı olanıdır ve seminifer epiteli bazal ve adluminal bölme olmak üzere iki bölmeye ayırır. Spermatogonyumlar bazal bölmede bariyerin hemen altında yer alır ve bu sayede bağışıklık sistemi olgunlaştıktan ve vücudun

kendi hücrelerine karşı toleransı geliştikten sonra oluşan özgün spermatogenik hücreler, vücudun otoimmun saldırılarından korunur. (Mescher, 2019).

Sertoli hücrelerinin kan-testis bariyerini oluşturmasıyla ilgili 3 işlevi bulunur;

1) Gelişim aşamasında olan spermatosit, spermatid ve spermler besin ve plazma proteinlerinden kan-testis bariyeri sebebi ile izole oldukları için besin ve artık maddelerin uzaklaştırılmasında Sertoli hücrelerine bağımlı haldedirler. Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri bağışıklık sistemine karşı korurken farklılaşma sürecinde gerekli plazma proteinlerini de sağlarlar. Bu sayede gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesini, korunmasını ve beslenmesini düzenlerler.

2) Ekzokrin ve endokrin salgılama. Sertoli hücreleri testisten yeni üretilen spermleri taşıyan bir sıvıyı sürekli olarak seminifer tübüllere salgılar. Testosteronun spermiyogenez için gerekli konsantrasyona ulaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP) ve besinlerin üretimi, folikül uyarıcı hormon (FSH) tarafından desteklenir. Endokrin hücreler olarak sertoli hücreleri ön hipofiz bezinden FSH sentezini ve salıverilmesini geri bildirim ile önleyen 39-kDa inhibin glikoproteinini salgılar. Fetüste ise Sertoli hücreleri antimüllerian hormon (AMH) glikoproteinini üretir. AMH embriyonik gelişme sırasında Müller (Paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlar ve yokluğunda bu kanallar da dişi üreme sisteminin bir parçası olur.

3) Fagositoz. Spermiyogenez sırasında fazla sitoplazma ve artık cisimlerin sindirimi, Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından gerçekleştirilir (Mescher, 2019).

2.1.3 Genital boşaltım kanalları

Embriyonik gelişim esnasında mezonefrik kanaldan gelişen genital boşaltım kanalları, ejakulasyon sırasında spermi skrotumdan penise doğru taşıyan kanallardır. İçten dışa doğru sırasıyla duktus epididimis, vas (duktus) deferens ve üretradan oluşur (Bayram vd, 2023; Mescher, 2019).

2.1.3.1 Epididimis

Testisin üst ve arka yüzeyleri boyunca uzanan, skrotum içinde yer alan, bağ doku ile çevrelenmiş, yaklaşık 4-5 metre uzunluğunda, baş, gövde ve kuyruk kısımlarından oluşan

kıvrımlı bir kanaldır. Baş kısmından ductuli efferentes giriş yapar ve kuyruk kısmı ise duktus deferense açılır.

Spermin epididimden geçişi yaklaşık 2-4 haftada gerçekleşir. Bu esnada sperm olgunlaşır ve fertilizasyon yeteneği kazanır. Bu süreçte sperm, bağımsız olarak ileri yönlü hareket etme yeteneği kazanır, akrozomun olgunlaşması gerçekleşir ve hücre zarında bir takım biyokimyasal ve düzenlenimsel değişimler geçirir (Mescher, 2019).

Epididim içinde bulunan sıvı glikolipid dekapasitasyon faktörleri içerir ve bunlar spermin hücre zarına bağlanarak akrozomal reaksiyonları durdurur. Bu sayede spermin fertilize etme kabiliyeti, geri dönüşümlü olarak (dişi üreme yolunda gerçekleşecek olan kapasitasyon işlemi ile bu faktörler uzaklaştırılana kadar) önlenmiş olur. Dişi üreme yolunda sperm, kapasitasyon gerçekleştikten sonra zona pellusida üzerinde bulunan reseptörlerine (sperm reseptörleri) bağlanır ve akrozomal reaksiyon tetiklenir (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).

Epididimi yalancı çok katlı prizmatik epitel döşer. Bu epitel uzun stereosilyalı prizmatik esas hücrelerden ve kök hücrelerden (yuvarlak, küçük) oluşur. Esas hücreler glikolipid ve glikoprotein salgılar ve bununla birlikte sertoli hücreleri tarafından uzaklaştırılamayan sitoplazmik ve diğer artıkların uzaklaştırılmasında ve suyun emiliminde görev alır. Kanal epiteli birkaç düz kas hücre tabakası ile sarılı haldedir ve içte ve dışta uzunlamasına tabakalar halinde düzenlenmiştir. Epididimin kuyruk kısmında dairesel bir tabaka da bulunur. Bu sayede peristaltik kasılmalar, kanal boyunca spermin hareket etmesini ve ejakulasyon sırasında gövdenin ve kuyruğun boşalmasını sağlar (Mescher, 2019).

2.1.3.2 Duktus (Vas) deferens

Epididimisin kuyruk bölümünden başlayarak, kalın muskuler duvarlı, lümeni dar, düz ve uzun bir şekilde devam ederek prostatik üretraya açılan bir kanaldır. Boşaltım kanalı sisteminin en uzun bölümüdür.

Duktus deferens spermatik kordonun bir parçasını oluşturur, bu kordon testiküler arter, panpiniform pleksus ve sinirleri de içerir. Spermatik kordondan ayrıldıktan sonra, duktus deferens pelviste mesane seviyesine kadar iner. Burada distal ucu genişleyerek duktus deferensin ampullasını oluşturur. Ampulla da veziküla seminealisin kanalı ile birleşir ve

ejakülatuar kanalı (duktus ejakulatoryus) olarak prostat bezinin içinde üretraya doğru devam eder (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).

2.1.4 Yardımcı bezler

Üreme işlevinin sürdülebilmesi ve semen üretmek için ejakulasyon sırasında sperm ile karışan salgıları oluşturan bezlerdir.

2.1.4.1 Seminal veziküller

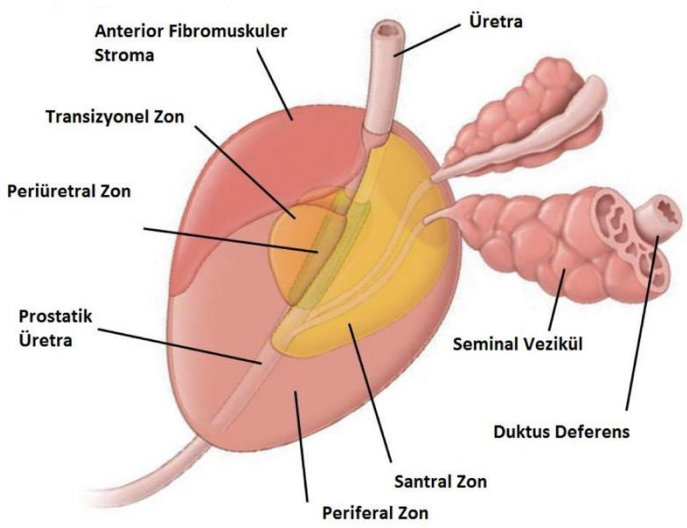
Mesanenin arka (posterior) duvarında duktus deferensin ampullasına paralel olarak yerleşmiş her biri 15 cm uzunluğunda, bol kıvrımlı kanallardan oluşan bir çift tübüler bezlerdir. Kanalın mukazası, lümeni büyük oranda dolduran, çok sayıda ve ince karmaşık katlanmalar gösterir. Katlanmalar, salgılayıcı granüllerden zengin tek katlı veya yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşenmiştir. Duvarı mukoza ince bir düz kas tabakası ve fibröz bir kılıf içerir. Kas tabakası iç kısımda dairesel şekilde dış kısımda ise boyuna bir yerleşim göstererek bezin salgısını boşaltmasını sağlar. Her veziküla seminalisin kısa boşaltım kanalı duktus deferensin ampullası ile birleşerek ejakülatör kanalı oluşturur (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).

Seminal veziküller ekzokrin bezlerdir ve yapışkan, sarımtırak salgılarının üretimi testosterona bağlıdır. Seminal veziküllerden gelen sıvı ejakülatın %70 kadarını oluşturur. Bu sıvı başta fruktoz olmak üzere, inositol ve sitrat gibi sperme enerji verici maddeler, kadın üreme yollarında spermin etkinliğini uyaran prostaglandin ve ejakulasyon sonrasında semenin koagülasyonunu sağlayan fibrinojen içerir (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).

2.1.4.2 Prostat bezi

Erkek üreme sisteminin en büyük aksesuar cinsiyet bezidir ve temel fonksiyonu seminal sıvının oluşumuna katkı sağlayan şeffaf, hafif alkali (pH=7.29) bir sıvı salgılamaktır. Mesanenin altında yer alır ve üretrayı çevreler. Yaklaşık 20 g civarında tıkız bir organdır. Yoğun fibromuskuler stroma içine gömülü halde 30 -50 adet tübüloasiner bezden oluşur. Her bir bezden çıkan kanallar doğrudan prostatik üretraya açılır. Prostatik üretra prostatın merkezinden geçer. Bezler üç konsantrik tabakadan oluşur, içte bezin %5' ini kapsayan ve mukozal tabaka adı verilen geçiş bölgesi, ortada bezin %25' ini oluşturan submukozal

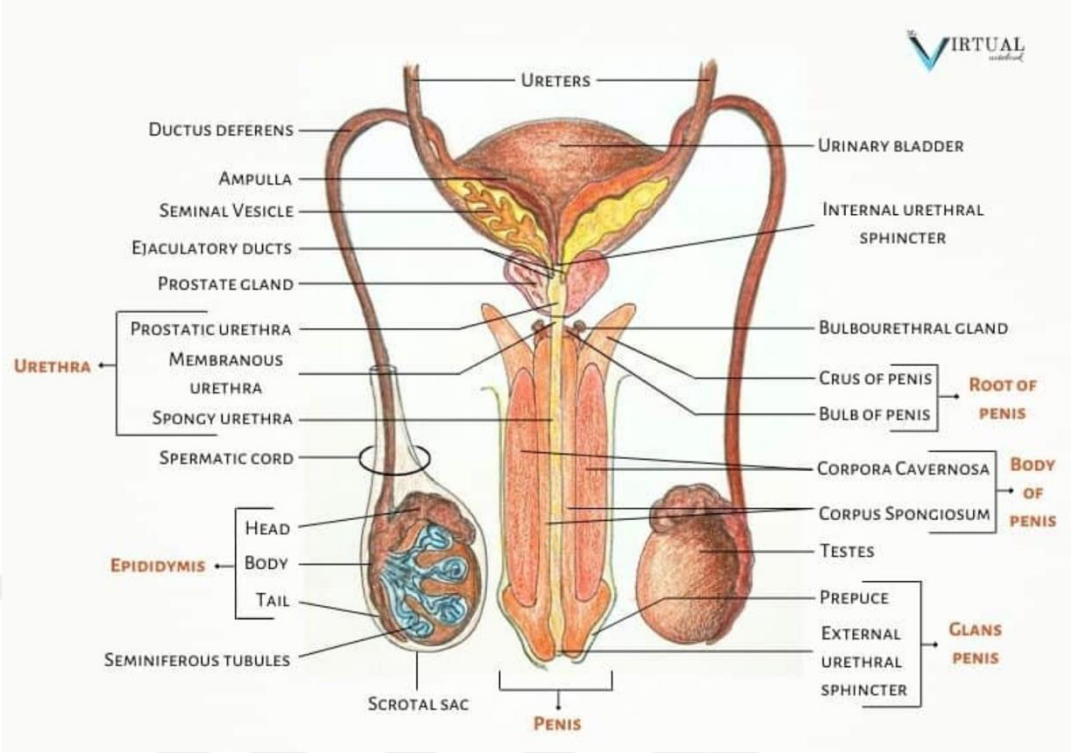
tabaka adı verilen merkezi bölge ve dışta da organın %70' ini kapsayan esas prostatik bezleri içeren periferik tabaka (Şekil 10). Mukozal tabakanın bezleri direkt olarak üretraya salgılama yapar (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).



Şekil 10. Prostat bezi diyagramı (Ross ve Pawlina, 2017)

2.1.4.3 Bulboüretral bezler (Cowper bezleri)

Ürogenital diyaframda 3-5 mm çapında bezelye büyüklüğünde, yuvarlak şekilli ve bir çift halinde bulunurlar (Şekil 11). Salgılarını penil üretranın proksimal kısmına boşaltırlar. Bu bezler tek katlı prizmatik epitel ile örtülmüş ve düz kas hücreleri ile çevrelenmiş olan testosteron bağımlı mukus salgılayan, tübüloasiner salgılama birimlerini içeren birçok lobüler yapıdan oluşur. Ereksiyon boyunca, bulboüretral bezler ve penil üretradaki üretral bezler mukus benzeri salgıları ile üretranın kayganlaşmasını sağlayarak spermin geçişini kolaylaştırır. Bulboüretral bezler preseminal sıvıyı salgılamaktadırlar (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).

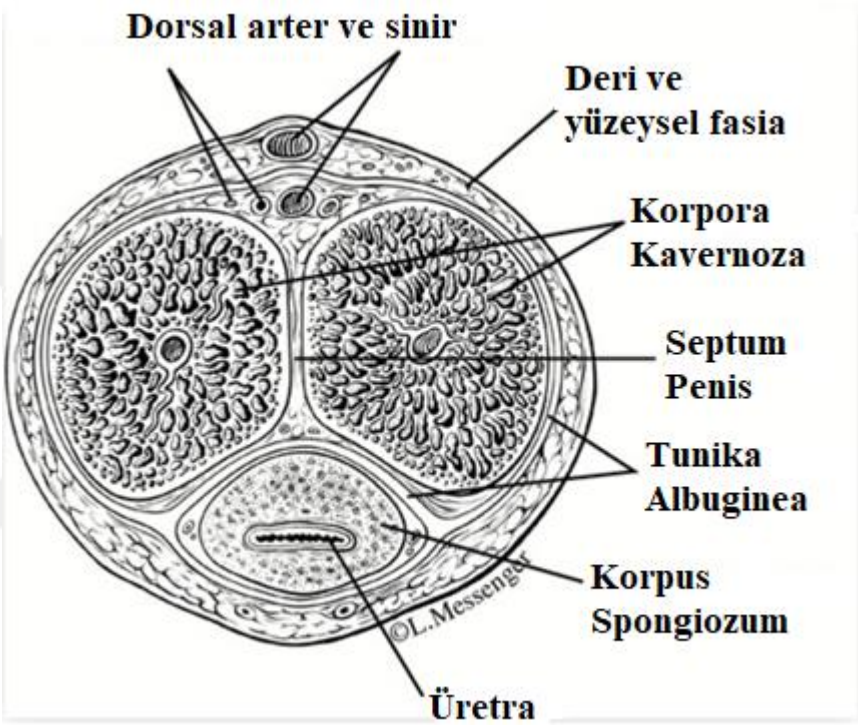


Şekil 11. Erkek üreme sisteminin arkadan görünüşü (https://www.thevirtualnotebook.com/male-reproductive-system-main-parts-and-their-functions/)

2.1.5 Penis

İki adet dorsal erektil doku kütlesi olan korpus kavernozumlar ve bir adet ventral erektil doku kütlesi olan korpus spogiozumdan oluşmaktadır. Bu yapının sonunda korpus spongiozum genişleyerek glans penis olarak bilinen baş kısmı oluşturur (Şekil 11). Bu üç parçayı sıkı bir fibroelastik tabaka olan tunika albuginea birbirine bağlar ve her birinin etrafında kapsül oluşturur (Şekil 12). Penil üretranın büyük bir kısmını yalancı çok katlı prizmatik epitel döşer, glans peniste ise bu, çok katlı yassı epitele dönüşür. Mukus salgılayan küçük üretral bezler penil üretra boyunca bulunur. Erektil dokuların üçü de endotel hücreleri ile döşeli ve bağ dokusu lifleri ve düz kas hücrelerinden oluşan trabeküllerle ayrılmış çok sayıda venöz kavernöz boşluktan oluşur. Korpora kavernozum içinde bulunan merkezi arterler, küçük sarmal yapılı helisin arterlerini oluşturmak üzere dallanırlar. Böylelikle erektil dokunun kavernöz boşluklarına kadar uzanırlar. Merkez arterler ile dorsal venler arasında arteriyovenöz bağlanmalar bulunur. Merkezi sinir

sistemine gelen uyarılar ile tetiklenen ereksiyon bu vasküler duvarlardaki otonom sinir sistemleri tarafından kontrol edilir. Parasempatik uyarılarla trabeküler düz kaslar gevşeyerek helisin arterlerini genişletir ve kan akışı hızlanarak kavernöz boşluklar dolar. Korpus kavernozumlar genişler bu da sıkı tunika albugineaya karşı dorsal venlerin sıkıştırılmasına sebep olur. Böylelikle venöz çıkış engellenerek erektil dokuda şişkinlik ve sertlik oluşur (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).



Şekil 12. (Harin Padma-Nathan, 1999)

2.2 Spermatogenezis

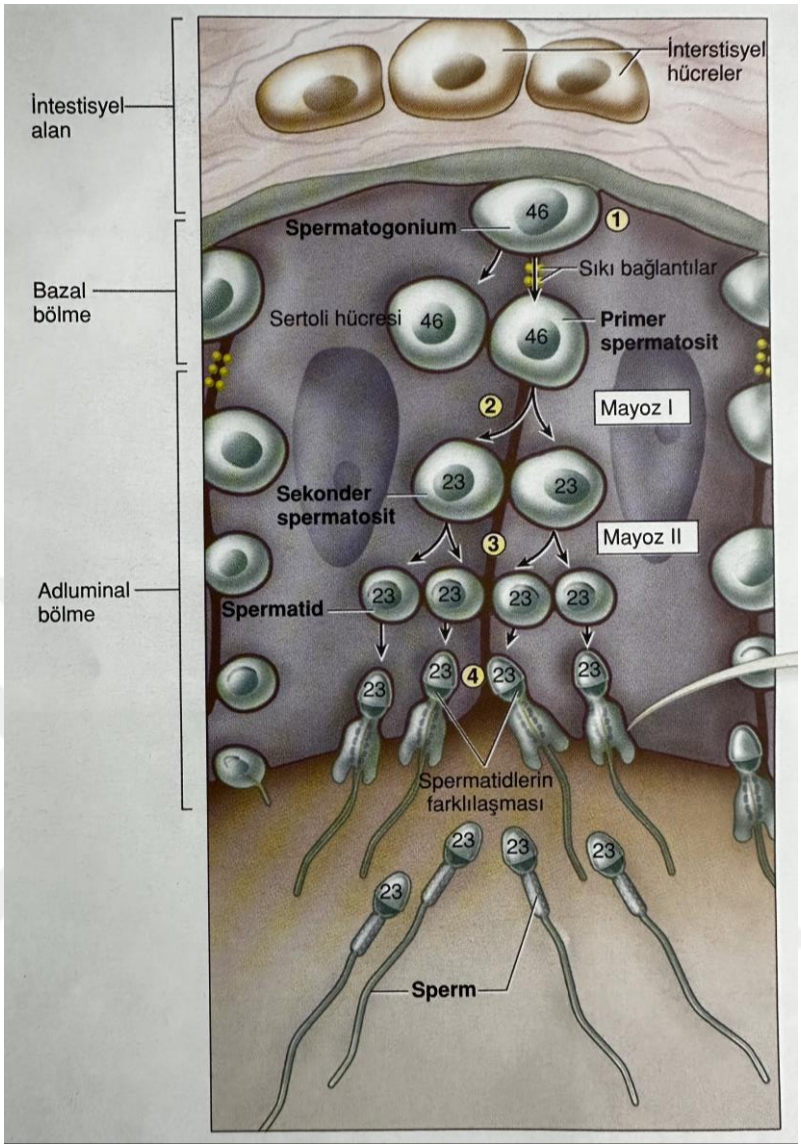
Bir dizi mitoz ve mayoz bölünmeler sonucunda progenitör hücreler olan spermatogonyumlardan, sperm oluşum sürecidir. Bu süreç testiste seminifer tübüllerde gerçekleşir. Ancak tam dölleme yeteneklerini dişi üreme sisteminde elde ederler (Mescher, 2019; Eşrefoğlu, 2017).

Spermatogenik hücreler üst üste sıralanmış gelişimlerinin farklı aşamalarındaki hücrelerdir. Spermatogonyumlar, bazal membranın hemen üstündedirler ve sertoli hücrelerinin yüzeyleri ile yakın ilişki içerisindedirler, lümene yakın olanlar daha olgun

spermatidler, lümende ise spermiyumlar bulunur (Şekil 13) (Eşrefoğlu, 2017; Mescher, 2019).

Sertoli hücreleri spermatogenezde yardımcı hücreler olarak görev alır. Kan testis bariyerini oluşturma görevlerin dışında, germ hücrelerine destek verir, mayoz için gerekli bileşenleri sentezler ve hipofizi kontrol etmekte görevli hormonal sinyalleri (inhibin) üretir (İrez ve ark., 2007).

Spermatogonial kök hücrelerden bir dizi seri mitoz bölünme sonucu Tip A spermatogonyumlar, bunların da kısıtlı sayıda geçirdiği mitoz bölünme sonucunda Tip B spermatogonyumlar oluşur. Tip A spermatogonyum oluşumu spermatogenezin başladığının göstergersidir. Tip B spermatogonyumun mitoz bölünmesi ile primer spermatosit oluşur. Her yeni primer spermatosit geçici olarak kan testis bariyerinin sıkı bağlantılarını ayırarak tübülün bazal bölmesinden adlüminal bölmesine doğru hareket eder. Mayoz bölünme primer spermatositlerde başlar. 1. Mayoz bölünme sonucunda diploid kromozolu (46 kromozom) primer spermatositler, haploid kromozomlu (23 kromozom) sekonder spermatositlere dönüşür ancak kromozomlarında 2 kromatid bulunduğu için DNA miktarı hala somatik hücrelerdeki gibidir. 2. Mayoz bölünme sonucunda haploid yapıda spermatidler oluşur (Şekil 7). Bunlar somatik hücrelerin yarısı kadar DNA içerirler. Spermatidler lümene yakın fakat hala sertoli hücrelerine gömülü halde iken farklılaşırlar ve fertilizasyon ve hareket yeteneği kazanabilmek için gerekli olan morfolojik değişimleri geçirirler (Eşrefoğlu, 2017; Mescher, 2019).



Şekil 13. Spermatogenez (Mescher, 2019)

2.3 Spermiyogenez

Spermiyogenez, mayoz bölünmenin tamamlanması ile oluşan spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için yüksek derecede özelleşmiş hücreler olan spermatozoaya dönüşmesi sürecidir. Bu süreç spermatozoon üretiminin son aşamasını oluşturur ve sıcaklığa duyarlıdır. Bu bölümde hücre bölünmesi gerçekleşmez. Farklılaşan hücreler sertoli hücreleri ile ilişkilidirler. Spermiyogenez akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişimini ve sitoplazmanın çoğunluğunun

kaybolmasını içeren bir süreçtir. Sonucunda olgun spermatozoon sertoli hücrelerinin yüzeyinden tübül lümenine bırakılır (Şekil 14) (Mescher, 2019).

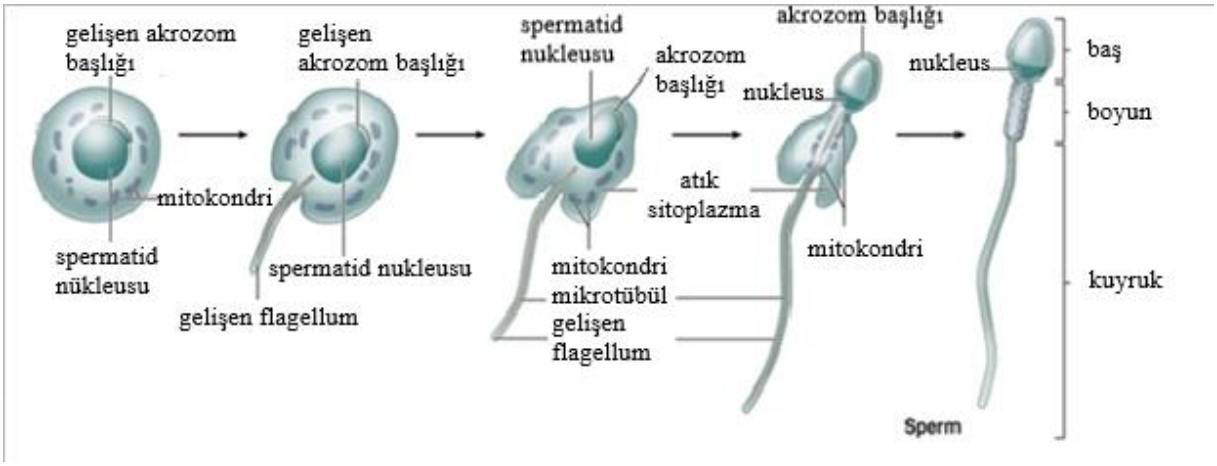
Spermiyogenez 4 evreye ayrılır;

1. **Golgi Fazı:** Spermatidlerin çok sayıdaki golgi kompleksinde birikip kümelenen periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granüllerinin bulunması ile karakterizedir. Glikoprotein bakımından zengin olan bu proakrozomal granüller, nukleus zarına yakın bir bölgede akrozomal vezikülü oluşturmak için bir araya gelirler. Akrozomal vezikül bu fazda genişleyerek içeriğini arttırır. Akrozomal vezikülün pozisyonu gelişen spermin ön kutbunu belirler. Aynı zamanda sentrioller akrozomal vezikülden en uzak noktaya göç ederek flagella aksonemini oluşturmaya başlar.

2. **Kep Fazı:** Akrozomal vezikül yayılarak yoğunlaşan çekirdeğin yarısını kaplar ve akrozomal kep meydana gelir. Akrozomal kepin altında nüklear zarf parçası bulunur ve bu nüklear zarf parçası porlarını kaybederek kalınlaşır. Nuklear içerik yoğunlaşır.

3. **Akrozom Fazı:** Spermiyumların baş kısmı Sertoli hücresi içerisinde gömülü kalır, gelişen aksonem tübülün lümenine doğru uzanır. Yoğunlaşmış olan nukleus yassılaşır, akrozom apikal bölgeye iyice yaklaşır. Sentirollerden kaynaklı mikrotübüller spermin boyun ve orta parça kısmını oluşturmaya başlar.

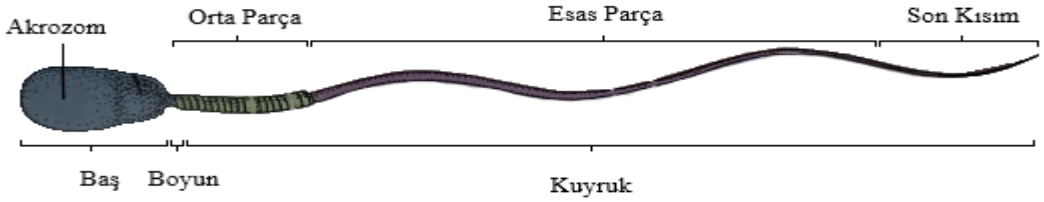
4. **Olunlaşma Fazı:** Spermatozoon dan geriye kalan sitoplazma, artık cisim olarak atılır ve hücreler arası köprüler kaybolur. İşlevsel ya da hareketli olmayan olgun sperm tübül lümenine bırakılır (Ross ve Pawlina, 2017; Mescher, 2019).



Şekil 14. Spermiyogenezis (Mescher, 2019)

2.4 Olgun Spermin Yapısı

Olgun bir sperm baş kısmı, boyun kısmı ve kuyruk kısmı olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır (Şekil 15).



Şekil 15. Olgun İnsan Sperminin Yapısı (Ross ve Pawlina, 2017)



Şekil 16. Sıçan Sperm Yapısı (Spermac Boyama, 40X)

2.4.1 Spermin baş yapısı

Yaklaşık 60 µm uzunluğunda yassı ve sivri şekildedir (Şekil 15). Akrozomal kep nukleusun anterior 2/3 sini sarar ve ovumun zona pellusiadısının delinmesi için gereken hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteaz enzimlerini içerir (Ross ve Pawlina, 2017).

2.4.2 Spermin kuyruk yapısı

Boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 bölümden oluşur. Boyun kısmı kısa ve sentrioller ile kaba fiberlerin başlangıçlarının bulunduğu kısımdır. Orta kısımda, kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal tarzda sarılı mitokondriyonlar bulunur. Bunlar kuyuruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlayarak kuyruğun hareketinden sorumludurlar. Esas parça yaklaşık 40 µm uzunluğunda olup kalın fiberleri ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içerir. Son kısım ise yalnızca aksonemal kompleksi içermektedir (Şekil 15) (Ross ve Pawlina, 2017).

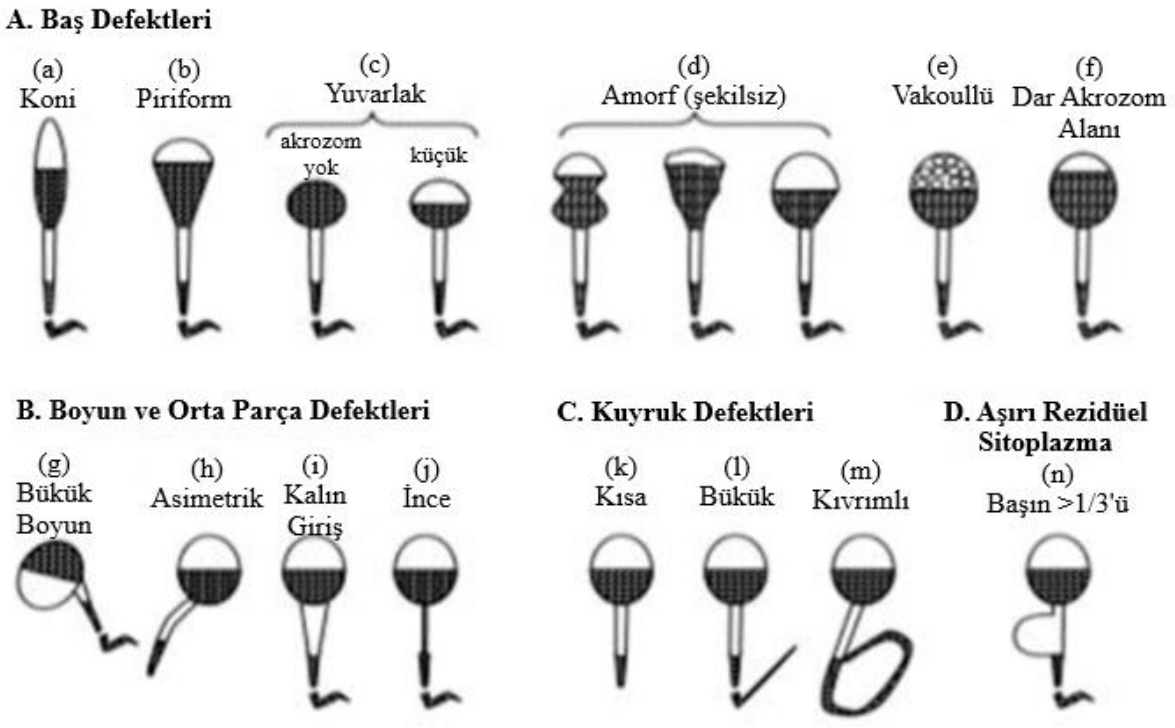
2.4.3 Sperm morfolojisi

İnsan sperminin morfolojik olarak değerlendirilebilmesi için Kruger Kriterleri olarak bilinen ‘‘kesin morfolojik kriterler’’ kullanılmaktadır (Kruger vd. 1986). Kruger

Kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm hücresinin özellikleri Tablo 1' de gösterilmiştir. Kruger Kesin Morfolojik Kriterleri dışında kalan spermler anomalili olarak kabul edilmektedir (Şekil 17).

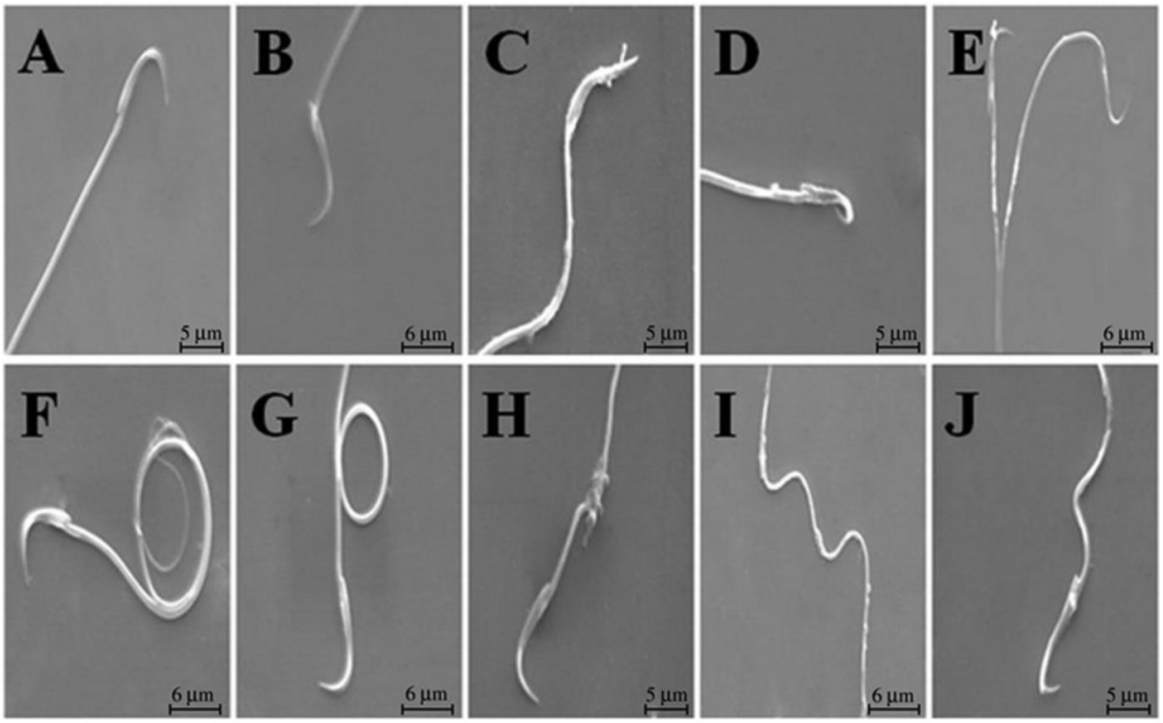
Tablo 1. Kruger Morfolojik Kriterleri

Baş	Sınırları düzgün Oval şekilli Baş bölgesinde bulunan vakuoller alan boyamasının %20' sinden büyük olmamalı
Akrozom	Başın (nukleusun) %40-70 ini oluşturmalı
Orta Parça	Uzunluğu başın uzunluğunun 1,5 katı civarında olmalı Genişlik 1 mikron Baş ve orta parça ekseni aynı hizada olmalı
Kuyruk	Yaklaşık 50-55 µm uzunluğunda Kalınlığı, uzunluğu boyunca aynı olmalı Orta parçadan daha ince olmalı Kırık ya da kıvrılma içermemeli



Şekil 17. İnsan sperminde morfolojik anomaliler (Björndahl vd., 2021).

İnsan spermi ile sıçan spermi benzerlik göstermektedir. Sıçan sperminde özellikle baş kısmında morfolojik değişiklikler olduğu bilinmektedir (Şekil 18) (Rat Sperm Morphological Assessment, 2000).



Şekil 18. Sıçan sperm anomalileri (https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopy-pictures-showing-sperm-from-cauda-epididymis-of-rats-A_fig1_287595713)

(A) Normal Sperm; (B) Bükük Boyun; (C) Şekilsiz Baş; (D) Kavisli Baş; (E) Çift Başlı; (F) Sarmal Kuyruk; (G) İlmekli Kuyuk; (H) Düzensiz Kuyruk; (I-J) Kavisli Kuyruk

2.5 Antineoplastik Tedaviler

Tedavi amacıyla çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Bunların kemoterapötik ajanların içerisinden BEP kombinasyonunun, kanser hastalarında en etkili tedavi şekli olduğu gösterilmiştir (Albers P vd., 2008; Culine S vs., 2008; Feldman D.R vd., 2008; Bamias A vd., 2011; Calabro F vd.,2012). BEP kombinasyonu kullanımında ilk 5 yıldaki sağ kalım %90 oranında bulunmuştur (Einhorn & Foster, 2006; Kopp vd., 2006). Kemoterapötik ajanların birçoğu hücrelerin nükleotit sentezini baskılar ve böylece tümör hücrelerinin çoğalmalarını engeller ancak bu baskılama tümör hücrelerinin yanı sıra kemik iliği, gonadlar, deri gibi dokuları da etkiler (Weijl, Cleton ve Osanto, 1997).

2.5.1 Bleomisin

Bleomisin, *Streptomyces vertillic* bakterisi tarafından üretilen, güçlü tümör öldürme yeteneğine sahip olan antineoplastik bir bileşiktir. Antibiyotik ve antitümöral etkilere sahiptir. Tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını, DNA-RNA sentezini baskılayarak engeller. Kemik iliği baskılanmasına oldukça az sebep olsa da akciğerlerde önemli bir toksik etkiye neden olur. 1975 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından skuamoz (yassı) hücreli karsinomlara, testis kanserlerine ve malign lenfomalara karşı kullanılmak üzere onaylanmıştır (Hay, Shahzeidi ve Laurent, 1991; Bennet ve Reich, 1979; Hecht, 2000).

2.5.2 Etoposit

Bir podofillotoksin türevi olan etoposid, lenfomalar, germinal tümörler ve akciğer kanseri (özellikle küçük hücreli) gibi birçok insan malignitesinde antitümör etkinlik göstermektedir. Etoposid'in antineoplastik aktivitesi, DNA ve DNA çözücü enzim topoizomeraz II'yi içeren bir kompleksin oluşumundan kaynaklanan DNA iplikçik kırılması yoluyla elde edilir. Etopozid, güçlü bir topoizomeraz II zehiridir ve onarılmazlarsa hücre ölümüne yol açan çift sarmallı DNA kırılmalarına neden olur. Aynı zamanda otolog kök hücre nakli ve diğer antikanser protokolleri için de çeşitli kemotarapik ajanlarla birlikte kullanılmaktadır. Etoposit, antitümöral etkisinin yanı sıra bir sitokin fırtına sendromuna bağlı bağışıklık aracılı enflamatuar hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Hande, 1992; Bailly, 2023).

2.5.3 Cis-Platin

Cis-Platin kemoterapötik ajanlar içerisinde en çok tercih edilen antitümör ajanlardandır. Türevi olan karboplatin ile birlikte akciğer kanserleri ve yumurtalık kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinde yaygın kullanıma sahiptir. Bu ajanlar DNA ya zarar veren antitümör ajanlardır (Kelland, 2007; St. Germain vd., 2010).

2.6 Antioksidan Tedaviler

Hücrelerdeki prooksidan-antioksidan dengesizliği oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Bu dengenin bozulmasıyla hücrelerde reaktif oksijen türevleri (ROS) seviyeleri artarak, proteinlerin denatürasyonuna, DNA hidroksilasyonuna, lipid

peroksidasyonuna ve apoptoz ile sonuçlanan hücre canlılığının devamlılığı için tehlikeli durumlara yol açmaktadır (Schieber ve Chandel, 2014; Wang vd., 2017). Antioksidan mekanizmanın ana görevi ROS oluşumunu ve bu maddelerin hücrelerde oluşturduğu hasarı engellemektir (Halliwell, 2009).

Yapılan çalışmalar sonucu kemotrapinin hedef dışı etkilerini minimuma indirgemek için onaylanmış koruyucu antioksidan tedaviler ortaya konulmuştur (Wyns C vd., 2010).

2.6.1 Erkek gonadotoksisitesinde antioksidanlar

BEP tedavisinin testislerde meydana getirdiği olumsuz etkileri tamamen engellemese de bunları azaltmak için kullanılan onaylanmış antioksidan tedavi protokolleri bulunmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, Zn, Se, L-askorbik asit ve a-tokoferol' den oluşan bir antioksidan kokteyli (AC)' nin BEP in olumsuz etkilerini tamamen engellemese de BEP'e bağlı infertilitenin iyileşmesini arttırdığı, sperm yapısını ve işlevini BEP'in olumsuz etkilerinden koruduğu, germ hücrelerinin hayatta kalma olasılığını ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Kilarkaje N vd., 2013). Melatonin, arı sütü, Zn, E vitamini, kurkumin vb. antioksidan etkileri bilinen maddelerin hayvan çalışmalarında kemoterapötiklerin testislerde meydana getirdiği toksisiteyi önlemeye destek olduğu gösterilmiştir (Amirshahi vd., 2014; Khadivi vd., 2020; Moradi vd., 2021; Sahoo vd., 2008). Yapılan çalışmalarda antioksidanların, DNA üzerinde ve metabolizmada olumsuz etikleri olan serbest oksijen radikallerini de etkisiz hale getirdiği gösterilmiştir (Sen vd., 2010).

2.6.2 Medikal ozon

Oksitleyici bir madde olan Ozon (O3) hücre içi antioksidan enzimleri yukarı yönlü regüle etmektedir (Bocci V, 1996). Ozonun oksidatif etkisi organizmada antioksidan enzim sistemlerinin aktivasyonunu sağlar. O3 vücuda alımı takiben çok hızlı bir şekilde kanda çözünür ve çeşitli antioksidanlarla (ürik asit, albümin, çoklu doymamış yağ asitleri ve askorbik asit gibi) hızla reaksiyona girerek tamamıyla nötralize olur ve bunun sonucunda reaktif oksijen radikalleri (ROS), lipit oksidasyon ürünlerini (LOP) ve hidrojen peroksit meydana getirir. Oluşan tüm serbest radikallere karşın vücudun savunma mekanizmasında etkili olan antioksidan enzimlerin (Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi aktif hale gelmesini hızlandırır. (Bocci V

2006a; Bocci V 2006b; Bocci V 2007). Güçlü bir şekilde oksidasyan oluşturabilme kapasitesine sahip olan ozon bu sayede antibakteriyel, antifungal ve antivirütik etki de gösterebilmektedir (Kim ve vd. 2009). Ozon tedavisinin, düşük doz ve ardışık kontrollü uygulamalarda oluşturduğu oksidatif stres, koruyucu moleküllerin indüksiyonunda rol alarak antioksidan savunma sistemini güçlendirip, oksidanlara karşı bir tür savunma sağlar (Peterson DR vd., 2004). Orta seviyede bir oksidatif stres Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NrF2)' yi aktive ederek antioksidan enzimlerinin oluşumunu tetikler. Nrf2 oksidanlara karşı hücresel direncin ortaya çıkan bir düzenleyicisidir. Nrf2, oksidan maruziyetinin fizyolojik ve patofizyolojik sonuçlarını düzenlemek için bir dizi antioksidan yanıt elemanına bağlı genin bazal ve uyarılmış ifadesini kontrol eder. Bununla birlikte yalnızca hücreleri oksidasyon ve inflamasyona karşı korumakla kalmaz aynı zamanda kronik oksidatif stresin geri dönüşmesinde de rol alır (Ma Q, 2013). Yapılan bir çalışmada ozonlanmış salinin, Keap1-Nrf2-ARE (antioksidan tepki elementi) sinyal yolunu ve bunun aşağı akış gen ekspresyonunu aktive ederek radikal oksijen türlerinin (ROS) ve zararlı maddelerin oksidatif hasarını azalttığı belirtilmiştir (Qu DD vd., 2011).

Nrf2, spesifik bir gen (antioksidan mekanizmayı regüle eden genlerin ekspresyonunu düzenleyen) tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. Keap1 (Kelch-benzeri ECH birleştirici protein 1) bünyesinde çok mitarda sistein aminoasit bulundurur ve ortamda oksidatif stres oluşmasına bağlı olarak çalışabilen bir alarm gibi görev yapmaktadır. Hücre koruyucu proteinleri kodlayan genlerin çoğu, Keap1-Nrf2-ARE sinyal yolu boyunca ortak transkripsiyonel düzenlemeyi sağlar. Artan strese göre, Keap1 Nrf2'yi aktive eder ve ARE' yi uyarmaktadır (Karakçı D., 2021). Nrf2, antioksidan ekspresyonunda görev alan genler ile birlikte, enerji regülasyonu ve mitokondri biyogenezinde rol alan genlere de etkir. Mitofajiyi, mitokondriyal antioksidan enzim seviyelerini ve redoksla düzenlenen mitokondriyal geçirgenliğe karşı direnci de arttır (Holmstrom KM vd., 2016). O3, adenosin trifosfat (ATP) üretimini uyararak mitokondrideki Krebs döngüsünü de uyarır (Güven A vd., 2008). Medikal ozon tedavisinin antioksidan, antiinflamatuar ve antimikrobiyal etkileri, ozonun tedavi amacıyla çok geniş bir yelpazede kullanımına olanak sağlar. Farmakolojik ajanlara kıyasla ozon tedavisi, klasik ilaç-reseptör ilişkisinden ziyade oluşturduğu alarm reaksiyonu ile vücudun antioksidan ve antiinflamatuar yolaklarını harekete geçirerek

hastalıklara karşı savunma sağlar (Bocci V. 2006a; Bocci V. vd., 2011). Son yıllarda medikal ozonun tedavi amaçlı çeşitli hastalıklarda kullanılmaya başlanmasının ardından çeşitli sebeplere bağlı olarak oluşan testis hasarına karşı ozon tedavsinin koruyuculuğu araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan bir çalışmada intraperitoneal (İP) ozon tedavisinin bir sıçan modelinde apoptoz ve oksidatif stres düzeylerini azalttığı, iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu testis hasarına karşı koruyucu bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Aydos TR. vd., 2014). Yine bir başka hayvan deneyi çalışmasında uygulanan medikal ozon tedavisinin, oksidatif stres ve nitrik oksit (NO) düzeylerini azalttığı, adriyamisin kaynaklı testis toksisitesine karşı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Salem EA vd., 2017). Deney hayvanları kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise deneysel bir testis torsiyonu modeli oluşturulmuş ve uygulanan ozon tedavisinin ardından testiste iskemi ve reperfüzyon şiddetinin azaldığı gösterilmiştir (Tusat M vd., 2017). Medikal ozon uygulamasının glutatyon seviyesini yükselttiği, ksantin oksidaz üretimini azalttığı, endotelyal düz kas tonusunu arttırdığı ve kalsiyum seviyelerini etkileyerek vazodilatasyona ve eritrosit glikoz seviyesinde artışa yol açtığı gösterilmiş olup ayrıca ozonun iskemik dokuda oksijen seviyesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Bocci V, 2008). Yakın zamanda yapılan bir çalışma intratestiküler ozon uygulamasının intraperitoneal ozon uygulamasına kıyasla daha etkili olduğunu ve testis torsiyonu için alternatif bir tedavi yöntemi olabileceğini ortaya koymuştur (Mete F vd., 2017).

3. YÖNTEM

3.1 BEP Protokolü ve Medikal Ozon Tedavisi

Çalışmamızda üreme çağında olgun 12-14 haftalık 200-250 gr ağırlığında Sprague Dawley ırkı 32 (+4 Ön Çalışma) erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her kafeste 4' er sıçan olacak şekilde barındırılıp, 18-24 ˚C sıcaklıkta, % 45-55 nem oranında, 12 saat – 12 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyod uygulanarak, yem ve suları ad libitum olacak şekilde muhafaza edilmişlerdir. Hayvanlar Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi' nde (MÜDEHAM) üretilmiş olup, deneysel protokol Maltepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MÜHADYEK) tarafından verilen 2022.09.01 protokol numaralı etik kurul onayı doğrultusunda uygulanmıştır.

Erkek sıçanlar her grupta rastgele 8 sıçan olacak şekilde randomize olarak seçilmiş, 1- Kontrol Grubu, 2- BEP Protokol Grubu, 3- BEP protokol + Medikal Ozon Tedavisi Grubu ve 4- Medikal Ozon Grubu olarak, 4 gruba ayrılmış ve 9 hafta boyunca deney prosedürüne tabi tutulmuşlardır.

3.1.1 Uygulanan ilaç madde dozları

Literatürdeki çalışmalar incelenip insanlar için tasarlanmış Bleomisin, Etoposid ve Cis-platin dozları hayvanlara entegre edildiğinde, bleomisin 1,5 mg/kg, etoposid 15 mg/kg ve cis-platin 3 mg/kg şeklinde bulunmuştur. 2013 yılında yapılan bir çalışmada bu dozların % 100 mortaliteye sebep olduğu gösterilmiştir, bundan dolayı literatürde bulunan ve bu dozların yarısı kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak bu dozların yarısı tercih edilmiştir (Kilarkaje vd., 2013; Ravazi vd., 2019; Marcon vd., 2008). 2023 yılında Bayram ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da aynı dozlar kullanılarak sonuç alındığı gözlenmiştir (Bayram vd., 2023).

Tablo 2'de gösterildiği gibi, BEP tedavisi grubundaki sıçanlara 21 günlük 3 siklus şeklinde tedavi protokolü düzenlenmiştir. Her siklusun 1. ve 5. günlerinde 0,83 mg/kg etoposid ve 0,17 mg/kg cis platin ayrıca 2., 9. ve 16. günlerde de 0,083 mg/kg bleomisin,

IP enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Aynı günde uygulanan enjeksiyonlar arasında en az 30 dk olacak şekilde düzenlenmiştir.

Tablo 3'de gösterildiği gibi, Kontrol grubuna, BEP protokolündeki hayvanlara ilaç madde uygulanan zamanlarda, %0,9 luk salin solüsyonu hayvanların ağırlığına göre (IP) uygulanmıştır.

Tablo 4'de gösterildiği gibi, BEP + Medikal Ozon Tedavisi grubuna BEP grubundaki gibi 21 günlük 3 siklus şeklinde toplamda 9 hafta BEP protokolü uygulanmış olup, Medikal Ozon, 3 tedavi siklusu boyunca kür şeklinde haftada 2 kere, 50 µg/ml konsantrasyonunda 1 mg/kg dozda her sıçanın vücut ağırlığına göre belirlenerek uygulanmıştır (Mete F vd., 2017).

Tablo 5'de gösterildiği gibi, Medikal Ozon grubundaki sıçanlara ise yine kür şeklinde haftada 2 kere, 50 µg/ml konsantrasyonunda 1 mg/kg dozda her sıçanın vücut ağırlığına göre belirlenerek uygulanmıştır (Mete F vd., 2017).

Kullanılan tüm kemoterapötik ajanlar, Class II Biyogüvenlik Kabininde (Bilser® Biosafety Cabinet) özel giysi ve yardımcı ekipmanlar kullanılarak hazırlanmış olup, sulandırıcı olarak %0.9 NaCl kullanılmıştır.

Tablo 2. BEP Tedavisi Grubu Tedavi Protokolü

SİKLUS	HAFTA	BEP GRUBU (IP Enj)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	1	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0.17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 0,083 mg/kg bleomisin	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid % 0,9 NaCl	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid		
	2		0,083 mg/kg bleomisin		% 0,9 NaCl			
	3		0,083 mg/kg bleomisin		% 0,9 NaCl			
2	1	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0.17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 0,083 mg/kg bleomisin	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid % 0,9 NaCl	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid		
	2		0,083 mg/kg bleomisin		% 0,9 NaCl			
	3		0,083 mg/kg bleomisin		% 0,9 NaCl			
3	1	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0.17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 0,083 mg/kg bleomisin	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid % 0,9 NaCl	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid		
	2		0,083 mg/kg bleomisin		% 0,9 NaCl			
	3		0,083 mg/kg bleomisin		% 0,9 NaCl			

NaCl: Sodyum Klorür, IP Enj: İntraperitoneal (periton içi) Enjeksiyon

Tablo 3. Kontrol Grubu Tedavi Protokolü

SİKLUS	HAFTA	KONTROL GRUBU (IP Enj.)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	1	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		
	2	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		% 0,9 NaCl			
	3	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		% 0,9 NaCl			
2	1	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		
	2	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		% 0,9 NaCl			
	3	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		% 0,9 NaCl			
3	1	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		
	2	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		% 0,9 NaCl			
	3	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl		% 0,9 NaCl			

NaCl: Sodyum Klorür, IP Enj: İntraperitoneal (periton içi) Enjeksiyon

Tablo 4. BEP+Medikal Ozon Grubu Tedavi Protokolü

SİKLUS	HAFTA	BEP + MEDİKAL OZON TEDAVİSİ GRUBU (IP Enj.)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	1	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 1 mg/kg med. ozon	0.17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 0,083 mg/kg bleomisin	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 1 mg/kg med. ozon	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid		
	2	1 mg/kg med. ozon	0,083 mg/kg bleomisin		1 mg/kg med. ozon			
	3	1 mg/kg med. ozon	0,083 mg/kg bleomisin		1 mg/kg med. ozon			
2	1	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 1 mg/kg med. ozon	0.17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 0,083 mg/kg bleomisin	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 1 mg/kg med. ozon	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid		
	2	1 mg/kg med. ozon	0,083 mg/kg bleomisin		1 mg/kg med. ozon			
	3	1 mg/kg med. ozon	0,083 mg/kg bleomisin		1 mg/kg med. ozon			
3	1	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 1 mg/kg med. ozon	0.17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 0,083 mg/kg bleomisin	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid 1 mg/kg med. ozon	0,17 mg/kg cis-platin 0,83 mg/kg etoposid		
	2	1 mg/kg med. ozon	0,083 mg/kg bleomisin		1 mg/kg med. ozon			
	3	1 mg/kg med. ozon	0,083 mg/kg bleomisin		1 mg/kg med. ozon			

med. ozon = Medikal Ozon, IP Enj: İntraperitoneal (periton içi) Enjeksiyon

Tablo 5. Medikal Ozon Grubu Tedavi Protokolü

SİKLUS	HAFTA	MEDİKAL OZON TEDAVİSİ GRUBU (IP Enj.)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	1	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		
	2	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		1 mg/kg med. ozon			
	3	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		1 mg/kg med. ozon			
2	1	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		
	2	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		1 mg/kg med. ozon			
	3	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		1 mg/kg med. ozon			
3	1	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl	% 0,9 NaCl	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		
	2	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		1 mg/kg med. ozon			
	3	1 mg/kg med. ozon	% 0,9 NaCl		1 mg/kg med. ozon			

med. ozon = Medikal Ozon, NaCl: Sodyum Klorür, IP Enj: İntraperitoneal (periton içi) Enjeksiyon

3.2 Doku ve Örneklerin Toplanması

Deney prosedürünün sonunda tüm sıçanların vücut ağırlıkları kaydedilmiş daha sonra ağırlıklarına göre 8-10 mg/kg ksilazin, 80-100 mg/kg ketamin kombinasyonu intraperitoneal (İP) uygulanarak anesteziye alınmış, ardından intrakardiyak 5-8 mL kan almak sureti ile sakrifiye edilmişlerdir. Alınan kan santrifüjlenerek serum kısmı ayrılmış önceden her bir örnek için etiketleri hazırlanmış olan ependorflara, her bir ependorfta 200 mikrolitre olacak şekilde porsiyonlanarak -80 ˚C ‘de saklanmıştır.

Sıçanların sağ ve sol testisleri eksize edilerek ayrı ayrı tartılıp not edilmiştir. Hayvanların ağırlık farkından dolayı oluşan testis ağırlıkları arasındaki farklılığı standardize edebilmek için her bir hayvanın Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) hesaplanmıştır (Sahinturk, Guclu ve Baycu, 2007). TAİ aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

TAİ: [(sağ testis + sol testis ağırlıkları) / Vücut ağırlığı] * 100

3.3 Sperm Toplama

Tüm sıçanların testislerinden epididim eksize edilerek, kuyruk kısmı ayrıldıktan sonra, buz üzerinde hazırlanıp etiketlenmiş bir petri kabına konularak 1 mL Global Medium (LifeGlobal®Media) içinde kıyım yöntemi ile küçük parçalar halinde kesilmiştir.



Şekil 19. Epididimler kıyım yöntemi ile kesilip büyük doku parçaları ortamdan uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm

15 dk boyunca 37 ˚C de inkübasyona bırakılıp spermlerin medyum ile iyice karışması sağlanmıştır. İnkubasyonun ardından sıvı kısım pasteur pipeti yardımı ile çekilip ependorflara aktarılmıştır.

5 µL örneğe 45 µL Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) konularak (1/10 oranında sulandırılıp) içerisinden 10 µL alınarak Makler Kamerasında sayım yapıldı.

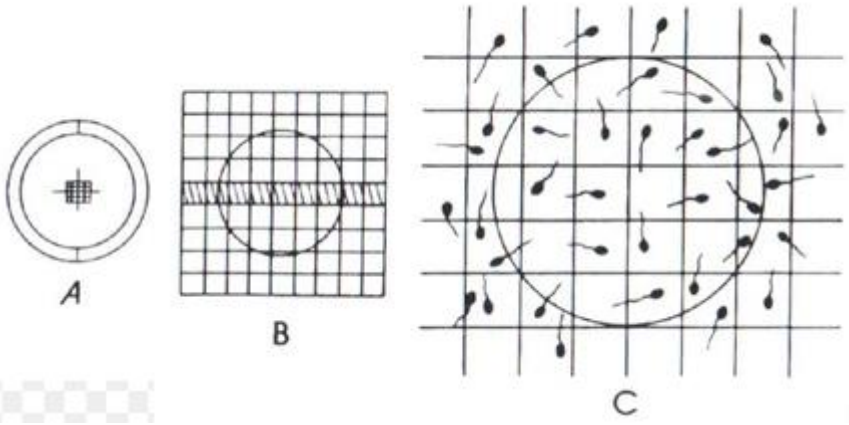
3.3.1 Makler kamerası ile sperm sayımı

Yaptığı uzun araştırmalar sonucu Prof. Dr. Amnon Makler tarafından insan spermini saymak için geliştirilen (Ertaş, Eroğlu ve Yüksel, 2018) Makler Kamerası, ışık mikroskopunda 20X büyütmede sperm sayımı yapılmasına olanak sağlar. İki optik camdan oluşmakta olup, üst cam 0,1x0,1 mm' lik toplamda 100 kareden oluşmaktadır.



Şekil 20. Makler Kamerası

Alınan sperm örnekleri 1/10 oranında PBS ile sulandırılarak, süspansiyondan 10 µL Makler Kamerası lamı üzerine konulup, Carl Zeiss ışık mikroskobu kullanılarak rastgele yatay ve dikey 10 ar karedeki spermler sayılıp ortalaması alınmıştır. Sperm başları sayılan kareler içerisinde olan tüm spermler sayıma dahil edilmiştir. Elde edilen sonuç önce 10 ile (1/10 sulandırıldığı için) daha sonra 10^6 ile çarpılarak mililitredeki sperm sayısı bulunmuştur. Her örnek sayımı sonrası kamera yıkanıp temizlenerek bir sonraki örneğe hazır hale getirilmiştir.



Şekil 21. Makler Kamerası ile Mikroskobik Görünüm
(https://us.ivfstore.com/products/makler-sperm-counting-chamber)

3.3.2 Sperm morfolojisi değerlendirme

Morfolojik değerlendirme yapılırken Spermac Stain Boyama yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sperm örneklerinden denekler için ayrı ayrı lamlar üzerine yayma yapılarak 15-20 dk 25 ˚C de kurutmaya bırakılmıştır. Örnekler kuruduktan sonra Spermac Fiksatif Solüsyonu içerisinde 5 dk boyunca fikse edilmiş daha sonra 10 defa distile suya daldırılıp çıkarılmak sureti ile yıkanmış ve kurutma kağıdı ile fazlalık suyu alınmıştır. Ardından Spermac A Boyasında 60 sn bekletilmiş ve sonrasında 10 defa distile suya batırılıp çıkartılarak boya uzaklaştırılmış ve kurutma kağıdı ile fazlalık su alınmıştır. Daha sonra Spermac B Boyasında 45 sn bekletilmiş ve akabinde 10 defa distile suya batırılıp çıkartılarak boya uzaklaştırılmış ve kurutma kağıdı ile fazlalık su alınmıştır. Son olarak Spermac C Boyasında 45 sn bekletilmiş ve akabinde 10 defa distile suya batırılıp çıkartılarak boya uzaklaştırılmış ve kurutma kağıdı ile fazlalık su alınmıştır. Preparatlar daha sonra oda ısısında 15 dk kurumaya bırakılmıştır. Ardından Zeiss Işık Mikroskopunda 40X büyütmede değerlendirilmiştir.

Her bir denek için 500 sperm sayılmış ve Industrial Reproductive Toxicology Discussion Group (IRDG) Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) tarafından hazırlanan Sıçan Sperm Morfolojik Değerlendirmesi (Rat Sperm Morphological Assessment, 2000) kılavuzu kullanılarak baş, boyun, kuyruk anomalisi açısından değerlendirilmiştir.

3.3.3 Sperm ölü-canlı oranı değerlendirmesi

Sperm ölü-canlı oranı değerlendirilirken Eozin-Nigrosin boyama tekniği kullanılmıştır. Tek basamaklı Eosin-Nigrosin boyama tekniği memelilerde sperm canlılığının tespitinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisidir (Björndahl, L. vd, 2003). Ölü hücrelerin membran geçirgenliği bozulduğu için boyayı absorbe eder ve kırmızı-pembe renkte gözlemlenir, canlı hücreler ise boyayı absorbe edemez ve beyaz-şeffaf renkte gözlemlenir. Eozin membran geçirgenliği bozulmuş ölü ya da hasarlı hücrelere girerek boya almasını sağlar, nigrosin ise arka planı boyayarak hücrelerin daha rahat seçilmesini sağlar (Björndahl, L. vd, 2003). İnkübasyon sonrası ependorflara aktarılan spermlerden 50 µL alınarak birebir ölçüde eosin-nigrosin boyası ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 saniye süreyle inkübe edildikten sonra karışımın içerisinden 12 µL alınarak lam üzerine aktarılmıştır. Bir lamel yardımı ile froti hazırlanıp yaymalar oda sıcaklığında kurutulup Carl Zeiss ışık mikroskobunda doğrudan incelenmiştir. Her bir örnek için 200 sperm sayılmış, beyaz renkte olup boya almayan spermler canlı olarak, kırmızı - pembe boya alan spermler ise ölü olarak değerlendirilmiştir (Mortimer, 1994; Björndahl, L. vd, 2003).

3.4 Testis Histomorfolojisi

3.4.1 Doku takibi

Tüm deneklerden elde edilen her iki testis de tartım işlemi sonrasında %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edilmiştir. Daha sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidre edilmiş, 2x30 dakika ksilende tutularak şeffaflaştırılmış, 60°C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklanmıştır.

3.4.2 Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama

Parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında alınan kesitler alınarak, morfolojik değerlendirme ve histopatolojik semikantitatif analiz yapabilmek için tablo 6'daki Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyama protokolü ile boyanmıştır.

Tablo 6. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Protokolü

1.	Etüv (60°C)	1 Saat
2.	Ksilol (Şeffaflandırma)	2 x 5 Dk
3.	Absolu Alkol-I	3 dk
4.	Absolu Alkol-II	3 dk
5.	%96, %90, %70, %50 Etil Alkol Serisinden Geçirme	3 ‘er dk
6.	Akar Suda Yıkama	5 dk
7.	Mayer’s Hematoksilen	7-8 dk
8.	Akar Suda Yıkama	5 dk
9.	Eozin Y	4-5 dk
10.	%50, %70, %90, %96 Alkol	3 ‘er dk
11.	Absolu Alkol-I	3 dk
12.	Absolu Alkol-II	3 dk
13.	Ksilol	2 x 5 dk
14.	Kapatma	

3.4.3 Johnson skorlama

Hematoksilen-Eozin boyama yapılan kesitler Zeiss Işık Mikroskobu altında incelenmiştir. Her kesitte en az 30 seminifer tübül x200 büyütmede mikroskobik olarak değerlendirilmiştir. İlk seminifer tübüller rastgele seçilmiş, diğerleri saat yönünde kaydırılarak analiz edilmiştir. Histopatolojik skorlama, tablo 7 de gösterilen Modifiye Johnson Skorlama metodu ile gerçekleştirilmiştir (Arıcan vd., 2020).

Tablo 7. Modifiye Johnson Skorlama

Skor	Histolojik Bulgular
1	Seminifer epitelyum yok.
2	Yalnız Sertoli hücresi var. Germinal hücre yok.
3	Yalnız spermatogonia var.
4	Spermatid veya spermatozoa yok, birkaç spermatosit var.
5	Spermatid veya spermatozoa yok, çok sayıda spermatosit var.
6	Spermatozoa, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid var.
7	Spermatozoa ve geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid var.
8	Her tübülde 5 spermatozoadan daha az, birkaç geç spermatid var.
9	Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel.
10	Tam spermatogonezis

3.5 Serum Örneğinden Total Testosteron Seviyesi Ölçümü

Elde edilen serum örneklerinden ELİSA yöntemi kullanılarak total testosterone seviyeleri, üreticinin [Elabscience® T (Testosterone) ELISA Kit, USA] tarif ettiği şekilde ölçülmüştür.

Örnekler -80°C den çıkartılıp oda ısısına gelmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kitte kullanılacak kuyucuklar belirlenmiştir. Her kuyucuğa 50 µL standart solüsyonu eklenmiştir. Üstüne her kuyucuğa 50 µL ‘’Biotinylated Detection Ab Working’’ solüsyonu eklenmiştir. Plakanın yüzeyi kapatılarak 37 °C de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucukların içerisindeki sıvı boşaltıldı ve ardından 3 kez 350 µL ‘’Wash Buffer’’ ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa 100 µL ‘’HRP Conjugate Working’’ Solution eklendi ve plakanın yüzeyi kapatılarak 37 °C de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyucukların içerisindeki sıvı tekrar boşaltılmış ve 5 kez 350 µL ‘’Wash Buffer’’ ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa 90 µL ‘’Substrate Reagent’’ eklenmiş, plakanın

yüzeyi kapatılarak 37 °C de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL ‘’Stop Solution’’ eklenerek mikroplaka okuyucuda 450 nm de analiz edilmiştir.

3.6 Serum Örneğinden TSH (Tiroid Stimülan Hormon) Ölçümü

Elde edilen serum örneklerinden ELİSA yöntemi kullanılarak TSH seviyelerine, üreticinin [Elabscience® Rat TSH (Thyroid Stimulating Hormone) ELISA Kit, USA] tarif ettiği şekilde ölçülmüştür.

Örnekler -80°C den çıkartılıp oda ısısına gelmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kitte kullanılacak kuyucuklar belirlenmiştir. Her kuyucuğa 100 µL standart solüsyonu eklenmiştir. Plakanın yüzeyi kapatılarak 37 °C de 90 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucukların içerisindeki sıvı boşaltıldı yıkama işlemi yapılmadan, her kuyucuğa 100 µL ‘’Biotinylated Detection Ab Working Solution’’ eklenmiş ve plakanın yüzeyi kapatılarak 37 °C de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyucukların içerisindeki sıvı boşaltılmış ve 3 kez 350 µL ‘’Wash Buffer’’ ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa 100 ‘’HRP Conjugate Working Solution’’ eklenmiş, plakanın yüzeyi kapatılarak 37 °C de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyucukların içerisindeki sıvı boşaltılmış ve tekrardan 5 kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Ardından her kuyucuğa 90 µL ‘’Substrate Reagent’’ eklenmiş ve plakanın yüzeyi kapatılarak 37 °C de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL ‘’Stop Solution’’ eklenerek mikroplaka okuyucuda 450 nm de analiz edilmiştir.

3.7 Serum Örneğinden TAS (Total Antioksidan Kapasite) Ölçümü

Elde edilen serum örneklerinden ELİSA yöntemi kullanılarak TAS seviyeleri, üreticinin [SunRed® Rat Total Antioxidant Status (TAS) ELISA Kit, Shangai] tarif ettiği şekilde ölçülmüştür.

Örnekler -80°C den çıkartılıp oda ısısına gelmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kitte kullanılacak kuyucuklar belirlenmiştir. Kör kuyucuklara elimizdeki örnekten ve TAS Ab eklenmeden yalnızca 50 µL ‘’Streptavidin-HRP’’, 50 µL ‘’Chromogen Solution A ve B’’ ve 50 µL ‘’Stop Solution’’, standart kuyucuklara; 50 µL ‘’Standard Solution’’, 50 µl ‘’Streptavidin HRP’’ ve test kuyucuklarına da 40 µL elimizdeki

örnekten, 10 µL ‘’Biotin TAS Ab’’ ve 50 µL ‘’Streptavidin-HRP’’ eklenerek 37 °C de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ‘’Wash Solution’’ ile yıkama işlemine tabii tutulmuş, ardından her kuyucuğa önce 50 µL ‘’Chromogen Solution A’’ daha sonra 50 µL ‘’Chromogen Solution B’’ eklenmiş ve 37 °C de 10 dk ışıktan korunarak inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL ‘’Stop Solution’’ eklenerek mikroplaka okuyucuda 450 nm de analiz edilmiştir.

3.8 Serum Örneğinden TOS (Total Oksidan Seviyesi Kapasite) Ölçümü

Elde edilen serum örneklerinden ELİSA yöntemi kullanılarak TOS seviyeleri, üreticinin [SunRed® Rat Total Oxidant Status (TOS) ELISA Kit, Shangai] tarif ettiği şekilde ölçülmüştür.

Örnekler -80°C den çıkartılıp oda ısısına gelmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kitte kullanılacak kuyucuklar belirlenmiştir. Kör kuyucuklara elimizdeki örnekten ve TAS Ab eklenmeden yalnızca 50 µL ‘’Streptavidin-HRP’’, 50 µL ‘’Chromogen Solution A ve B’’ ve 50 µL ‘’Stop Solution’’, standart kuyucuklara; 50 µL ‘’Standard Solution’’, 50 µL ‘’Streptavidin HRP’’ ve test kuyucuklarına da 40 µL elimizdeki örnekten, 10 µL ‘’Biotin TAS Ab’’ ve 50 µL ‘’Streptavidin-HRP’’ eklenerek 37 °C de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ‘’Wash Solution’’ ile yıkama işlemine tabii tutulmuş, ardından her kuyucuğa önce 50 µL ‘’Chromogen Solution A’’ daha sonra 50 µL ‘’Chromogen Solution B’’ eklenmiş ve 37 °C de 10 dk ışıktan korunarak inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL ‘’Stop Solution’’ eklenerek mikroplaka okuyucuda 450 nm de analiz edilmiştir.

3.9 Serum Örneğinden Beta-hCG (beta-human koryo gonadotropik hormon) ve AFP (Alfa-Fetoprotein) Seviyelerinin Ölçümü

Elde edilen serum örneklerinden her grup için birer ependorf (hep bir örnek için ortalama 400 µl serum) Beta-Hcg ve AFP seviyelerinin ölçümü için soğuk zincir altında VETLAB Veteriner Laboratuvar Hizmetleri Ltd. Şti.’ ne gönderilmiştir. Firmanın önerdiği protokol izlenerek Electro-Chemiluminescence Immunı Assay yöntemi ile (Roche Cobas® E 601) ölçümler yapılmıştır.

3.10 Mitokondriyal Transmembran Potansiyeli Ölçümü

Elde edilen sperm örneklerinin mitokondriyal transmembran potansiyelleri, üretici firmanın [Elabscience® Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (with JC-1), USA] tarif ettiği şekilde, flow sitometri cihazında (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, USA), Acury C6 Plus yazılımı ile incelenmiş ve gruplar, mitokondriyal transmembran potansiyellerine göre karşılaştırılmıştır.

5 µL örneğe 45 µL Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) konularak (1/10) oranında sulandırılan sperm örneği 300 g de 5 dk santrifüj edilmiş ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. 1 mL PBS eklendikten sonra sayım yapılmış ve içerisinden $1x10^5$ hücre alınarak yeni ependorfa aktarılmıştır. Üzerine 1 mL PBS eklendikten sonra 300 g de 5 dk santrifüj edilmiş ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. İçerisine 500 µL JC-1 ‘’Staining Buffer’’ (boya maddesi) eklenmiş ve ardından 37 °C de, 15-20 dk, %5 CO_2 de inkübe edilmiştir. Ardından tekrar 300 g de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Üzerine 500 µL soğutulmuş ‘’JC-1 Assay Buffer’’ (yıkama solüsyonu) eklenmek sureti ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 500 µL soğutulmuş ‘’JC-1 Assay Buffer’’ eklenerek hücrelerin süspanse olması sağlanmış ve flow sitometri cihazında (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, USA), Accuri C6 Plus yazılımı ile incelenmiştir.

3.11 Araştırma Modeli

Çalışmamız Maltepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından, Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (MÜDEHAM) gerçekleştirilmiş ve deneysel protokol Maltepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MÜHADYEK) tarafından verilen etik kurul onayı (protokol no: 2022.09.01) doğrultusunda uygulanmıştır. Hayvanların bakımı, ilaç madde uygulamaları, deneyin sonlandırılması, doku ve kan örneklerinin alınması ve örneklerin analiz için hazır hale getirilmesi MÜDEHAM’da gerçekleştirilmiştir. Analizlerin bir kısmı Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi’nin alt yapısı kullanılarak bir kısmı ise özel bir veteriner teşhis ve analiz laboratuvarı olan VETLAB’dan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.12 Evren ve Örneklem

Çalışmamızda üreme çağında olgun 12-14 haftalık 200-250 gr ağırlığında Sprague Dawley ırkı 32 (+4 ön çalışma) erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar her kafeste 4' er sıçan olacak şekilde barındırılmış, 18-24˚C sıcaklıkta% 45-55 nem oranında, 12 saat – 12 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyod uygulanmış, yem ve suları ad libitum olacak şekilde muhafaza edilmişlerdir.

Erkek sıçanlar rastgele her grupta 8 sıçan olacak şekilde randomize olarak seçilmiş; 1- Kontrol Grubu, 2- BEP Protokol Grubu, 3- BEP Protokol + Medikal Ozon Tedavisi Grubu ve 4- Medikal Ozon Grubu olarak, 4 gruba ayrılmış ve 9 hafta boyunca kontrol grubuna yalnızca %0,9 NaCl, BEP Protokol ve BEP Protokol + Medikal Ozon Tedavisi Gruplarına 3 kür şeklinde testis kanseri kemoterapi ilaç protokolü, Medikal Ozon Tedavisi Grubuna ise medikal ozon terapisi uygulanmıştır.

3.13 Veriler ve Toplanması

Deney protokolü sonunda tüm denekler anestezi altında uygun şekilde sakrifiye edilerek gerekli tüm doku ve örnekler alınmıştır. Alınan doku ve örnekler çalışılana kadar uygun şartlarda muhafaza edilmiştir. Çalışma esnasında tüm örneklerin gözlemsel, niceliksel, biyokimyasal ve histolojik incelemeleri 4 grubu karşılaştırabilecek şekilde kayıt altına alınmıştır.

3.14 Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

Projemizde verilerin analizi sırasında, verilerin genel özelliklerini özetlemek amacıyla ortalama, standart sapma, medyan, frekans, yüzde, minimum ve maksimum gibi tanımlayıcı istatistiksel yöntemler kullanılmıştır.

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow Simirnov ve Shaphiro Wilk testleri ile değerlendirilmiştir. Her iki test içinde p (istatistiksel anlamlılık) değerinin 0,05'ten büyük çıkması durumunda verilerin normal dağılıma sahip olduğu söylenmiştir. Normal dağılım sergileyen nicel değişkenlerin grup karşılaştırmaları için ANOVA testi tercih edilirken, normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arası fark anlamlı olduğu durumda, post-hoc çoklu karşılaştırma testleri kullanılmış böylece hangi grupların kendi aralarında farklılık

gösterdiği anlaşılmıştır. Çoklu karşılaştırma testlerinden varyansların homojen dağılımına göre Tukey post-hoc testi veya Games-Howell testi seçilmiştir. İkili sonuçların kendi aralarındaki değerlendirmeleri için ise normal dağılıma sahip olanlarda Pearson Korelasyonu, normal dağılıma sahip olmayanlarda Spearman Rank korelasyon testleri tercih edilmiştir.

Tüm bu istatistiksel analizler için paket program IBM SPSS Statistics 26 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılmıştır (Kul S., 2014).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

BEP ile ozonun birlikte kullanıldığı gruptaki 3 ve 6 numaralı sıçanlar birinci kürün 3 haftasında öldüğü için aşağıda yer alan bulgulara dâhil edilmemiştir. BEP + Ozon grubunun tüm analiz sonuçları kalan 6 sıçandan elde edilen veriler kullanılarak hesaplanmıştır.

4.1.1 Kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının vücut ağırlıklarının ve ağırlık artışlarının karşılaştırılması

Tablo 8'de tüm grupların başlangıç vücut ağırlıkları, bitiş vücut ağırlıkları ve ağırlık artışları karşılaştırılmıştır. Shapiro-Wilk Testi ile tüm grupların normal dağılım gösterdiği belirlenmiş ve gruplarda anlamlı farklılığın belirlenmesi için parametrik bir test olan "Tek Yönlü Anova" analizi uygulanmıştır.

Tablo 8. Kontrol, BEP, BEP + Ozon, Ozon gruplarının başlangıç, bitiş vücut ağırlıkları ve ağırlık artışları (min-mak, ort ± ss).

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
Başlangıç Ağırlıkları (g)	Min - Mak	241 - 349	251 - 384	272 - 352	257 - 375	0,414
	Ort.	297,63	323,88	320,38	323,25	
	± Ss	34,67	51,23	29,31	34,89	
Bitiş Ağırlıkları (g)	Min - Mak	334 - 440	310 - 441	347 - 435	343 - 452	0,29
	Ort.	387	384,25	395,13	404,38	
	± Ss	34,02	49,84	28,29	32,83	
Ağırlık Artışları (g)	Min - Mak	85 - 93	54 - 67	66 - 83	73 - 89	**< 0,0001******
	Ort.	89,38	60,38	73,33	81,13	
	± Ss	3,58	4,27	5,82	5,44	

One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Sıçanların başlangıç ağırlıkları kontrol grubunda 297,63 ± 34,67 g, BEP grubunda 323,88 ± 51,23 g, BEP + Ozon grubunda 320,38 ± 29,31 g ve ozon grubunda ise 323,25 ± 34,89 g olarak ölçülmüştür. Deney sonunda yapılan ölçümlerde ise ağırlıklar kontrol grubunda 387 ± 34,02 g, BEP grubunda 384,25 ± 49,84 g, BEP + Ozon grubunda 395,13 ± 28,93 g ve ozon grubunda ise 404,38 ± 32,83 g olarak saptanmıştır.

Tüm gruplarda başlangıç ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,414;p>0,05). Aynı şekilde tüm grupların deney sonundaki ağırlıkları karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,29; p>0,05).

Tüm gruplardaki sıçanların deney başlangıcı ve bitişi arasındaki ağırlık artışları Kontrol grubunda 89,38 ± 3,58 g, BEP grubunda 60,38 ± 4,27 g, BEP + Ozon grubunda 73,33 ± 5,82 g, Ozon grubunda 81,13 ± 5,44 g olarak saptanmıştır. Tablo 8'de gösterildiği gibi gruplar arasında yapılan karşılaştırmada ağırlık artışlarında tüm gruplarda anlamlı farklılıklar saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

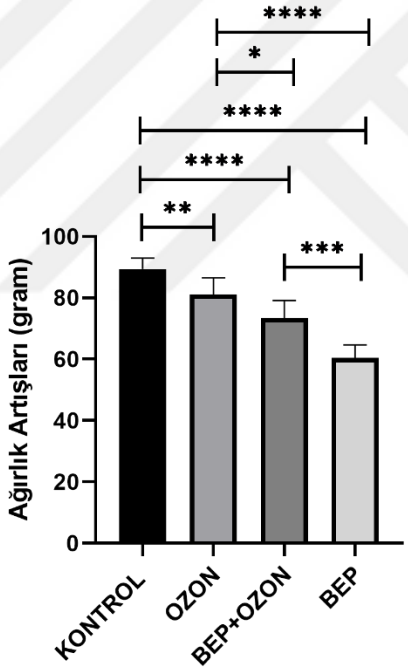
Tablo 9. Kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon gruplarının vücut ağırlık artışlarının karşılaştırmaları

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	29	10,68	22,44	35,56	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	16,04	10,68	8,96	23,12	**< 0,0001******
	Ozon	8,25	10,68	1,694	14,81	**0,0097****
BEP	BEP + Ozon	-12,96	10,68	-20,04	-5,877	**0,0002*****
	Ozon	-20,75	10,68	-27,31	-14,19	**< 0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	-7,792	10,68	-14,87	-0,7104	**0,0271***

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Gruplar arası anlamlılığın belirlenmesi için tüm grupların vücut ağırlık artışları, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanılarak Tablo 9 ve Şekil 22' te gösterildiği gibi karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubunun vücut ağırlık artışı, BEP uygulanan gruba ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0001 ve p=0,0001; p<0,05). Kontrol grubunun vücut ağırlık artışı yalnızca ozon uygulanan gruba göre yine yüksek olmakla beraber, bu yükseklik diğer gruplara nazaran daha düşük olsa da yine anlamlı derecede bir fark saptanmıştır (p=0,0097; p<0,05). Şekil 22'te gösterildiği gibi ozon uygulanan grubun ağırlık artışı sadece BEP uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur (p=0,0001; p<0,05). Aynı şekilde ozon ve BEP' in beraber uygulandığı grubun ağırlık artışı da yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur (p=0,0002; p<0,05). Benzer şekilde yalnızca ozon uygulanan grubun ağırlık artışı ise ozon ve BEP' in birlikte uygulandığı gruba göre yine yüksek bulunmuştur (p=0,0271; p<0,05).



Şekil 22. Kontrol, BEP, BEP + Ozon, Ozon uygulaması gruplarının vücut ağırlık artışları (g)
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

4.1.2 Kontrol, BEP, BEP + Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Testis Ağırlık İndekslerinin (TAİ) karşılaştırılması

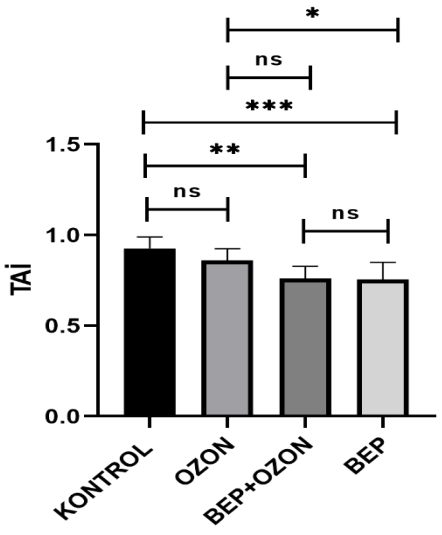
Gruplar arası testis ağırlık indeksleri ‘’Tek Yönlü ANOVA’’, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanılarak tablo 10’da görüldüğü gibi karşılaştırılmıştır.

Tablo 10. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis ağırlık indeksleri (min-mak, ort ± ss).

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
TAİ	Min - Mak	0,889 - 1,047	0,651 - 0,891	0,717 - 0,896	0,772 - 0,973	**0,0002*** **
	Ort.	0,927	0,736	0,759	0,86	
	± Ss	0,058	0,081	0,067	0,063	

One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Tablo 10’da gösterildiği gibi dört grup arasında yapılan karşılaştırmada testis ağırlık indeksleri (TAİ) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0002; p<0,001).



Şekil 23. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis ağırlık indeksleri
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 11. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) karşılaştırması

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	0,1716	0,089	0,07101	0,2722	**0,0004*** **
	BEP + Ozon	0,1679	0,089	0,05924	0,2766	**0,0013** **
	Ozon	0,067	0,089	0,03361	0,1676	0,284
BEP	BEP + Ozon	-0,003708	0,089	-0,1124	0,105	0,999
	Ozon	-0,1046	0,089	-0,2052	-0,004011	**0,0393***
BEP + Ozon	Ozon	-0,1009	0,089	-0,2096	0,007758	0,0757

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Şekil 23 ve Tablo 11' de görüldüğü gibi kontrol grubunun testis ağırlık indeksi BEP uygulanan gruba ve BEP ile Ozonun birlikte uygulandığı gruba göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0004 ve p=0,0013; p<0,001 ve p<0,01). Kontrol grubu ile ozon grubu arasında ise testis ağırlık indeksleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,284; p>0,05).

BEP uygulanan grup ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grup arasında da testis ağırlık indeksleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,999; p>0,05). Benzer şekilde BEP ve ozonun birlikte uygulandığı grup ile ozon uygulanan grup arasında da testis ağırlık indeksleri bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,0757; p>0,05).

Yalnızca BEP uygulanan grubun testis ağırlık indeksi de ozon uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturacak şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,0393; p<0,05).

4.1.3 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis ağırlıklarının karşılaştırılması

Tablo 12. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağ ve sol testislerin ağırlıklarının karşılaştırılması (min-mak, ort ± ss).

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
Sağ Testis Ağırlıkları (g)	Min - Mak	1,56 - 1,89	1,35 - 1,52	1,44 - 1,67	1,62 - 1,87	**0,0001******
	Ort.	1,78	1,44	1,53	1,71	
	± Ss	0,1	0,06	0,06	0,08	
Sol Testis Ağırlıkları (g)	Min - Mak	1,61 - 1,92	1,34 - 1,5	1,43 - 1,62	1,64 - 1,84	**0,0001******
	Ort.	1,8	1,43	1,51	1,75	
	± Ss	0,09	0,05	0,07	0,07	

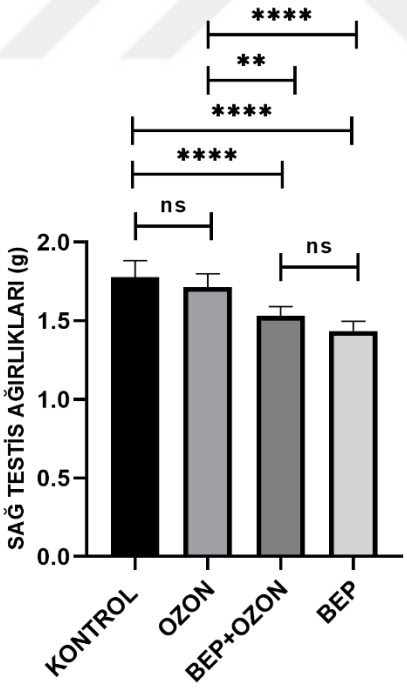
One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Tablo 12'de gösterildiği gibi sağ testis ağırlıkları kontrol grubunda 1,78 ± 0,1 g, BEP grubunda 1,44 ± 0,06 g, BEP + Ozon grubunda 1,53 ± 0,06 g ve ozon grubunda da 1,71 ± 0,08 g şeklinde bulunmuştur. Sol testis ağırlıkları ise kontrol grubunda 1,8 ± 0,09 g, BEP grubunda 1,43 ± 0,05 g, BEP + Ozon grubunda 1,51 ± 0,07 g ve ozon grubunda da 1,75 ± 0,07 g şeklinde bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada sağ testis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,000; p<0,05).

Tablo 13. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağ testis ağırlıklarının karşılaştırılması

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	0,3413	0,019149	0,2306	0,4519	< **0,0001******
	BEP + Ozon	0,2442	0,019149	0,1247	0,3636	< **0,0001******
	Ozon	0,06375	0,019149	-0,04686	0,1744	0,4064
BEP	BEP + Ozon	-0,09708	0,019149	-0,2166	0,02238	0,1418
	Ozon	-0,2775	0,019149	-0,3881	-0,1669	< **0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	-0,1804	0,019149	-0,2999	-0,06095	**0,0017****

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 24. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağ testis ağırlıklarının karşılaştırılması grafiği
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

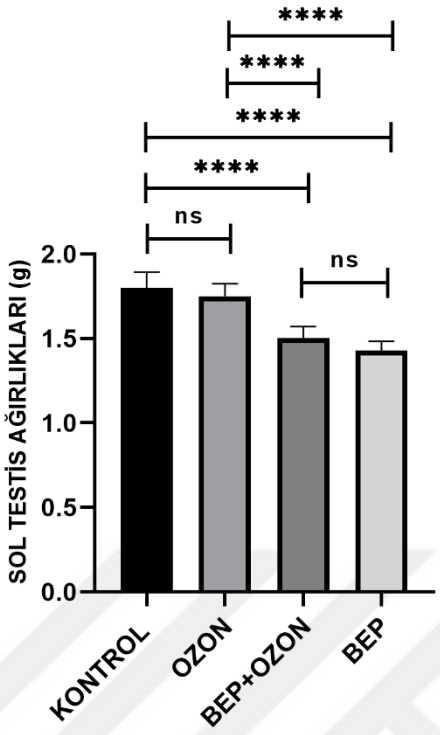
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 13 ve Şekil 24' da gösterildiği gibi sağ testis ağırlıkları yönünden gruplar arasında yapılan karşılaştırmada kontrol grubunun sağ testis ağırlıkları, BEP uygulanan gruba ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığa gruba göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0001; p=0,0001; p<0,05). Kontrol grubu ile ozon uygulanan grup arasında sağ testis ağırlıkları yönünden karşılaştırma yapıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,4064; p>0,05). Benzer şekilde BEP uygulanan grup ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grup arasında da sağ testis ağırlıkları yönünden karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,1418; p>0,05). Ozon uygulanan grubun sağ testis ağırlıkları BEP uygulanan gruba ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0001 ve p=0,0017; p<0,05).

Tablo 14. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması

Deney Grubu	**Deney Grubu**	**Ortalama Fark**	**Std. Hata**	**%95' lik güvenilirlik aralığı**		**p değeri**
				Alt Sınır	**Üst Sınır**	
Kontrol	BEP	0,3688	0,01633	0,2674	0,4701	< **0,0001******
	BEP + Ozon	0,2938	0,01633	0,1843	0,4032	< **0,0001******
	Ozon	0,0475	0,01633	-0,05384	0,1488	0,5798
BEP	BEP + Ozon	-0,075	0,01633	-0,1845	0,03446	0,2611
	Ozon	-0,3213	0,01633	-0,4226	-0,2199	< **0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	-0,2463	0,01633	-0,3557	-0,1368	< **0,0001******

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 25. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması grafiği
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 14 ve Şekil 25' de gösterildiği gibi sol testis ağırlıkları yönünden gruplar arasında yapılan karşılaştırmada kontrol grubunun sol testis ağırlıkları, BEP uygulanan gruba ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0001 ve p=0,0001; p<0,05). Kontrol grubu ile ozon grubu arasında ise sol testis ağırlıkları yönünden karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,5798; p>0,05). Benzer şekilde BEP uygulanan grup ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grup arasında da sol testis ağırlıkları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,2611; p>0,05). Ozon uygulanan grubun sol testis ağırlıkları BEP uygulanan gruba ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000; p<0,05).

4.1.4 Sperm parametrelerinin Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarında karşılaştırılması

Tablo 15. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm parametreleri (min-mak, ort ± ss).

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
Sperm Sayıları (10^6)	Min - Mak	280 - 370	200 - 290	360 – 480	270 - 440	**0,0001******
	Ort.	322,5	252,5	408,333	368,75	
	± Ss	32,403	30,589	40,207	57,18	
Normal Morfolojili Sperm Sayısı (ª)	Min - Mak	422 - 440	298 - 333	359 – 373	395 - 411	**0,0001******
	Ort.	430,5	319,25	369	401,625	
	± Ss	6,21	12,555	5,899	6,368	
Morfolojik Anomalili Sperm Sayısı (ª)	Min - Mak	60 - 75	167 - 202	124 – 141	89 - 105	**0,0001******
	Ort.	69,5	180,75	131	98,375	
	± Ss	6,21	12,555	5,899	6,368	
Baş Anomalili Sperm Sayısı (ª)	Min - Mak	7 - 14	21 - 34	16 - 21	12 - 17	**0,0001******
	Ort.	10,375	27,875	18,5	14,5	
	± Ss	2,559	4,486	1,87	1,603	
Boyun Anomalili Sperm Sayısı (ª)	Min - Mak	9 - 17	27 - 46	21 - 25	16 - 21	**0,0001******
	Ort.	13,25	38,625	23,166	18,5	
	± Ss	2,964	7,269	1,471	1,603	
Kuyruk Anomalili Sperm Sayısı (ª)	Min - Mak	39 - 52	100 - 123	81 - 93	55 - 71	**0,0001******
	Ort.	44,75	109,875	86,5	63,5	
	± Ss	4,399	9,062	4,183	5,126	
Çoklu Anomalili Sperm Sayısı (ª)	Min - Mak	0 - 3	2 - 7	2 - 4	1 - 3	**0,0001******
	Ort.	1,125	4,375	2,833	1,875	
	± Ss	1,125	1,685	0,752	0,834	

One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 (ª)=500 sperm sayılarak elde edilen sonuç

4.1.4.1 Sperm sayılarının Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması karşılaştırılması

Tablo 15' te gösterildiği gibi sperm sayıları kontrol grubunda 322,5 ± 32,4x10^6, BEP grubunda 252,5 ± 30,5x10^6, BEP + Ozon grubunda 408,333 ± 40,2x10^6, Ozon grubunda 368,7 ± 57,1x10^6 olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

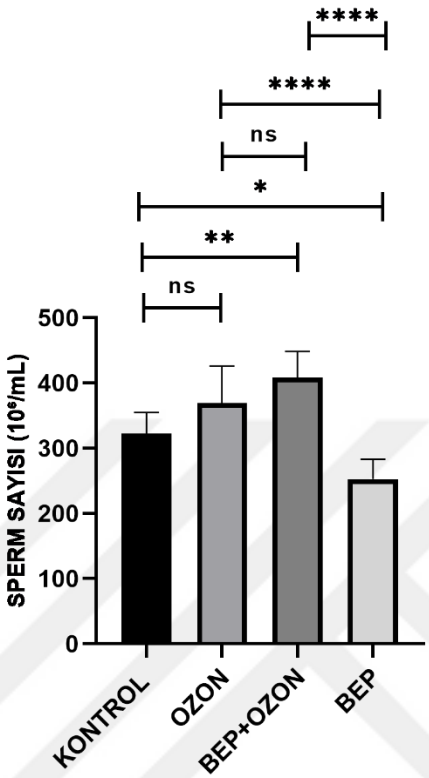
Tablo 16. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm sayısı

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	70	12,13	13,02	127	**0,0118***
	BEP + Ozon	-85,83	12,13	-147,4	-24,29	**0,0039****
	Ozon	-46,25	12,13	-103,2	10,73	0,1426
BEP	BEP + Ozon	-155,8	12,13	-217,4	-94,29	**< 0,0001****
	Ozon	-116,3	12,13	-173,2	-59,27	**< 0,0001****
BEP + Ozon	Ozon	39,58	12,13	-21,96	101,1	0,3127

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Tablo 16 ve Şekil 26 de gösterildiği gibi kontrol grubundaki hayvanların sperm sayıları BEP uygulanan gruptakilere göre daha yüksek bulunmuştur (p=0,0118; p<0,05). BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruptaki hayvanların sperm sayıları sadece BEP uygulanan gruptakilere ve kontrol grubundakilere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0001 ve p=0,0039; p<0,05). Benzer şekilde yalnızca ozon uygulanan gruptaki sperm sayısı da yalnızca BEP uygulanan gruptakilere göre yüksek bulunmuştur (p=0,0001; p<0,05). Yalnızca ozon uygulanan gruptaki sperm sayısı kontrol grubuna göre daha yüksek olsa da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,1426; p>0,05). Aynı şekilde BEP ve ozonun birlikte uygulandığı grubun sperm sayısı da

yalnızca ozon uygulanan gruba göre daha yüksek çıksa da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,3127; p>0,05).



Şekil 26. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm sayıları
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

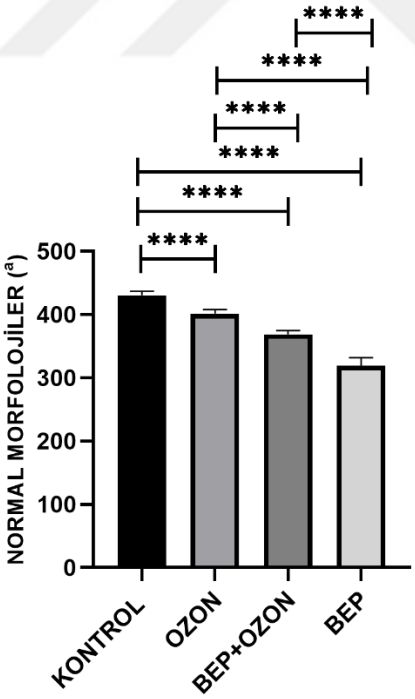
4.1.4.2 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının normal morfolojili sperm sayılarının karşılaştırılması

Tablo 15'e gösterildiği gibi normal morfolojili sperm sayıları kontrol grubunda 430,5 ± 6,21x10⁶, BEP grubunda 319,25 ± 12,555x10⁶, BEP + Ozon grubunda 369 ± 5,899x10⁶, Ozon grubunda 401,625 ± 6,368x10⁶ olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada normal morfolojili sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).Tablo 17 ve şekil 27'da gösterildiği gibi normal morfolojili sperm sayıları açısından dört grup da birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (tüm gruplar için p=0,0001; p<0,05).

Tablo 17. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının normal morfolojili sperm sayısı

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	111,3	3,203	99,74	122,8	< **0,0001****
	BEP + Ozon	61,5	3,203	49,07	73,93	< **0,0001****
	Ozon	28,88	3,203	17,36	40,39	< **0,0001****
BEP	BEP + Ozon	-49,75	3,203	-62,18	-37,32	< **0,0001****
	Ozon	-82,38	3,203	-93,89	-70,86	< **0,0001****
BEP + Ozon	Ozon	-32,63	3,203	-45,06	-20,19	< **0,0001****

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 27. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının normal morfolojili sperm sayısı ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

4.1.4.3 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının morfolojik anomali gösteren sperm sayılarının karşılaştırılması

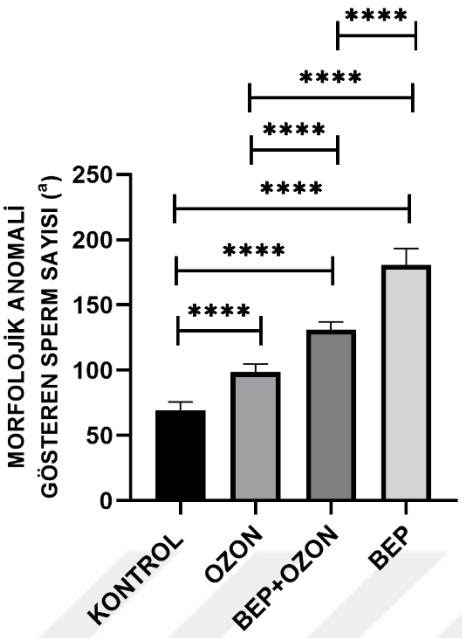
Tablo 15' te gösterildiği gibi morfolojik anomali gösteren sperm sayıları kontrol grubunda 69,5 ± 6,21x10⁶, BEP grubunda 180,75 ± 12,555x10⁶, BEP + Ozon grubunda 131 ± 5,899x10⁶, Ozon grubunda 98,375 ± 6,368x10⁶ olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada normal morfolojili sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

Tablo 18. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının morfolojik anomali gösteren sperm sayısı

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	-111,3	3,203	-122,8	-99,74	< **0,0001****
	BEP + Ozon	-61,5	3,203	-73,93	-49,07	< **0,0001****
	Ozon	-28,88	3,203	-40,39	-17,36	< **0,0001****
BEP	BEP + Ozon	49,75	3,203	37,32	62,18	< **0,0001****
	Ozon	82,38	3,203	70,86	93,89	< **0,0001****
BEP + Ozon	Ozon	32,63	3,203	20,19	45,06	< **0,0001****

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Tablo 18 ve Şekil 28'de gösterildiği gibi morfolojik anomali gösteren sperm sayıları açısından dört grup da birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (tüm gruplar için p=0,000; p<0,05).



Şekil 28. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının morfolojik anomali gösteren sperm sayısı ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

4.1.4.4 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının baş anomalisi gösteren sperm sayılarının karşılaştırılması

Tablo 15' de gösterildiği gibi baş anomalisine sahip sperm sayıları kontrol grubunda 10,375 ± 2,559x10⁶, BEP grubunda 27,875 ± 4,486x10⁶, BEP + Ozon grubunda 18,5 ± 1,87x10⁶, Ozon grubunda 14,5 ± 1,603x10⁶ olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada baş anomalisine sahip sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

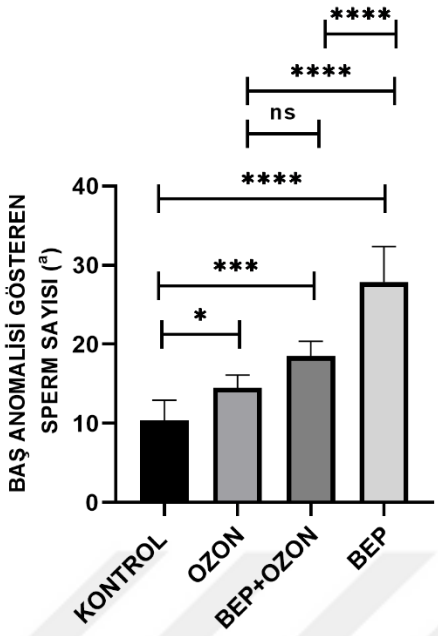


Şekil 29. Kontrol grubu düzleşmiş baş morfolojisi (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X)

Tablo 19. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının baş anomalisi gösteren sperm sayıları

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	-17,5	1,301	-21,51	-13,49	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	-8,125	1,301	-12,46	-3,793	**0,0001*****
	Ozon	-4,125	1,301	-8,135	-0,114	**0,0421***
BEP	BEP + Ozon	9,375	1,301	5,043	13,71	**< 0,0001******
	Ozon	13,88	1,301	9,365	17,39	**< 0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	4	1,301	-0,331	8,332	0,078

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 30. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının baş anomalisi gösteren sperm sayıları ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 19 ve şekil 30' de gösterildiği gibi baş anomalisi gösteren sperm sayıları bakımından gruplar karşılaştırıldığında yalnızca BEP uygulanan grubun baş anomalili sperm sayısının, kontrol grubundan, BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruptan ve yalnızca ozon uygulanan gruptan daha yüksek olduğu bulunmuştur (3 grup için de p=0,0001; p<0,0001).

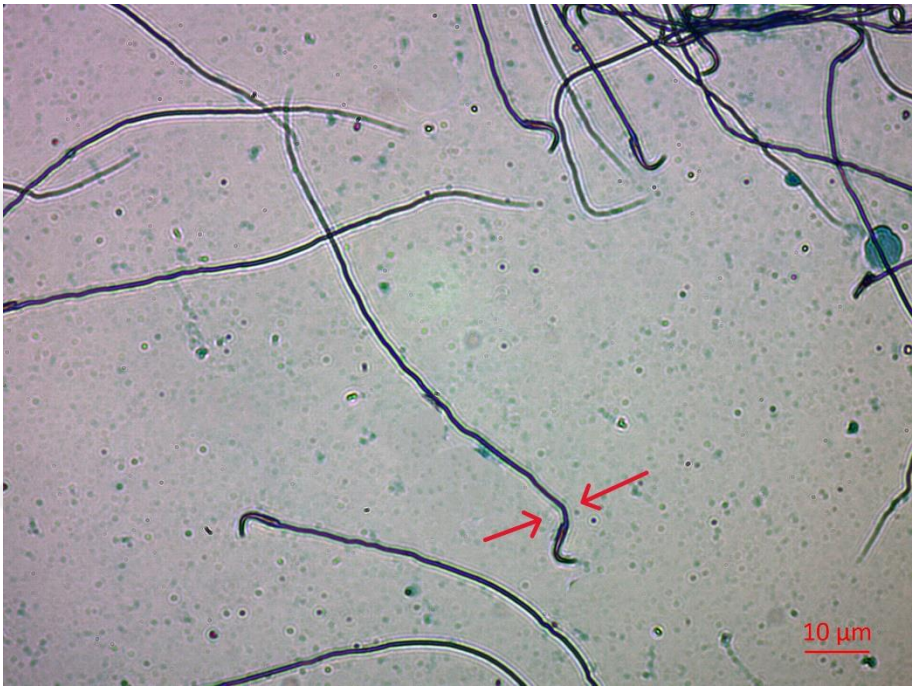
BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun baş anomalisi gösteren sperm sayısı, kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur (p=0,0001; p<0,05).

Benzer şekilde yalnızca ozon uygulanan grubun baş anomalisi gösteren sperm sayısının da kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,0421; p<0,05).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun baş anomalisi gösteren sperm sayısı ise yalnızca ozon uygulanan gruba göre yüksek olsa da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,078; p>0,05).

4.1.4.5 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının boyun anomalisi gösteren sperm sayılarının karşılaştırılması

Tablo 15' de gösterildiği gibi boyun anomalisi gösteren sperm sayıları kontrol grubunda 13,25 ± 2,964x10^6, BEP grubunda 38,625 ± 7,269x10^6, BEP + Ozon grubunda 23,166 ± 1,471x10^6, Ozon grubunda 18,5 ± 1,603x10^6 olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada boyun anomalisi gösteren sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

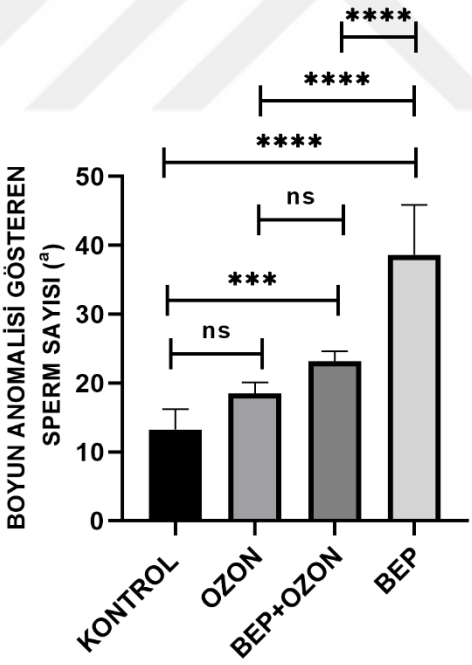


Şekil 31. BEP Grubu kırık boyun anomalisi (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X)

Tablo 20. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının boyun anomalisi gösteren sperm sayıları

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	-25,38	2,713	-31,15	-19,6	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	-9,917	2,713	-16,15	-3,683	**0,001*****
	Ozon	-5,25	2,713	-11,02	0,52	0,084
BEP	BEP + Ozon	15,46	2,713	9,225	21,69	**< 0,0001******
	Ozon	20,13	2,713	14,35	25,9	**< 0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	4,667	2,713	-1,567	10,9	0,1949

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 32. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının boyun anomalisi gösteren sperm sayıları ([a])= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 20 ve Şekil 32’ de gösterildiği gibi boyun anomalisi gösteren sperm sayıları bakımından gruplar karşılaştırıldığında yalnızca BEP uygulanan grubun boyun anomalisi gösteren sperm sayısının, kontrol grubundan, BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruptan ve yalnızca ozon uygulanan gruptan daha yüksek olduğu bulunmuştur (3 grup için de p=0,0001; p<0,0001).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun boyun anomalisi gösteren sperm sayısı, kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur (p=0,001; p<0,05).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun boyun anomalisi gösteren sperm sayısı yalnızca ozon uygulanan gruba göre yüksek olsa da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,1949; p>0,05). Benzer şekilde yalnızca ozon uygulanan grubun boyun anomalisi gösteren sperm sayısı da kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,084; p>0,05).

4.1.4.6 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kuyruk anomalisi gösteren sperm sayılarının karşılaştırılması

Tablo 15’ de gösterildiği gibi kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları kontrol grubunda 44,75 ± 4,399x10^6, BEP grubunda 109,875 ± 9,062x10^6, BEP + Ozon grubunda 86,5 ± 4,183x10^6, Ozon grubunda 63,5 ± 5,126x10^6 olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,000; p<0,05).



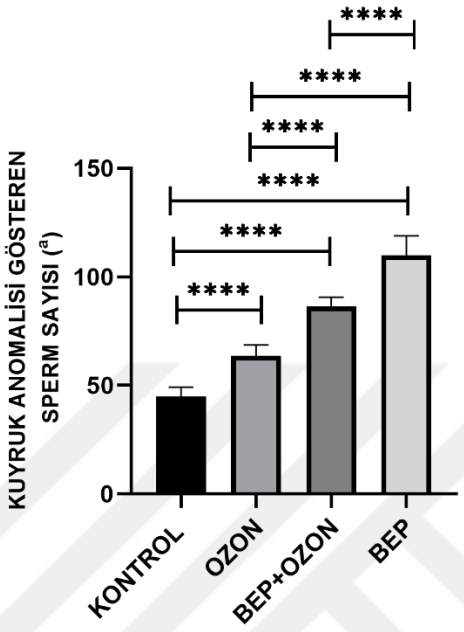
Şekil 33. Ozon grubu kırık kuyruk anomalisi (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X)

Tablo 21. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	-65,13	2,282	-73,55	-56,7	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	-41,75	2,282	-50,85	-32,65	**< 0,0001******
	Ozon	-18,75	2,282	-27,18	-10,32	**< 0,0001******
BEP	BEP + Ozon	23,38	2,282	14,27	32,48	**< 0,0001******
	Ozon	46,38	2,282	37,95	54,8	**< 0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	23	2,282	13,9	32,1	**< 0,0001******

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

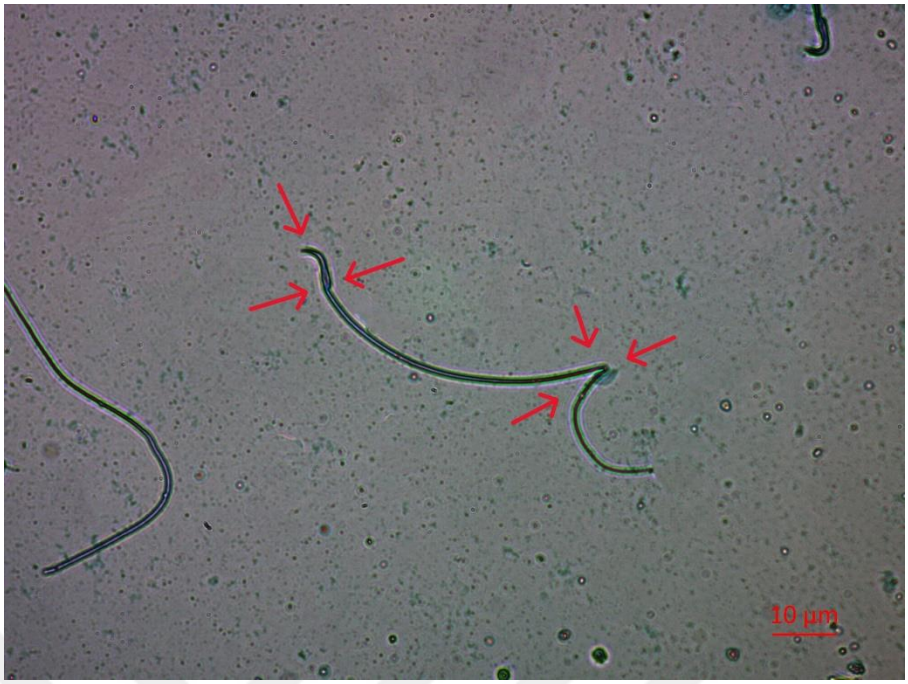
Tablo 21 ve Şekil 34’ de gösterildiği gibi kuyruk anomalili sperm sayısı açısından dört grup da birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (tüm gruplar için p=0,0001; p<0,05).



Şekil 34. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları (a)= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

4.1.4.7 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının çoklu anomaliye sahip sperm sayılarının karşılaştırılması

Tablo 15’ de gösterildiği gibi çoklu anomaliye sahip sperm sayıları kontrol grubunda 1,125 ± 1,125x10^6, BEP grubunda 4,375 ± 1,685x10^6, BEP + Ozon grubunda 2,833 ± 0,752x10^6, Ozon grubunda 1,875 ± 0,834x10^6 olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada çoklu anomaliye sahip sperm sayıları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

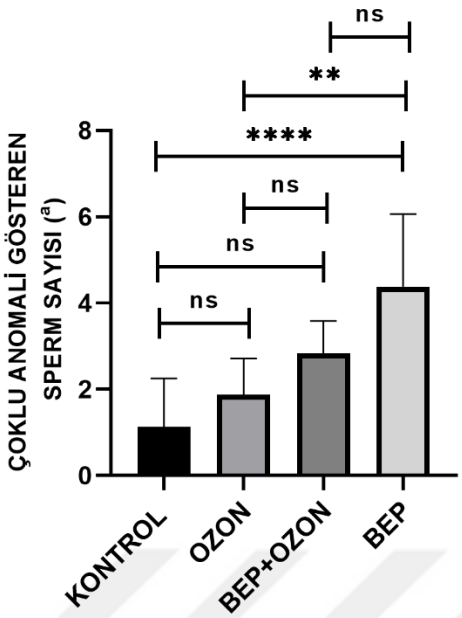


Şekil 35. BEP + Ozon Grubu çoklu anomali (düzleşmiş baş ve kırık kuyruk) (Kırmızı oklar) (Spermac Boyama, 40X)

Tablo 22. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının çoklu anomaliye sahip sperm sayıları

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	-3,25	0,422	-4,874	-1,626	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	-1,708	0,422	-3,463	0,046	0,058
	Ozon	-0,75	0,422	-2,374	0,874	0,591
BEP	BEP + Ozon	1,542	0,422	-0,212	3,296	0,099
	Ozon	2,5	0,422	0,875	4,124	**0,0014****
BEP + Ozon	Ozon	0,958	0,422	-0,796	2,713	0,452

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 36. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının çoklu anomaliye sahip sperm sayıları (a)= 500 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 22 ve Şekil 36' da gösterildiği gibi çoklu anomaliye sahip sperm sayıları yönünden gruplar karşılaştırıldığında yanlızca BEP uygulanan grubun çok anomaliye sahip sperm sayısı, kontrol grubuna ve yalnızca ozon uygulanan gruba göre daha yüksek çıkmıştır (sırasıyla p=0,0001 ve p=0,0014; p<0,05).

Yalnızca BEP uygulanan grubun çoklu anomaliye sahip sperm sayısı BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,099; p>0,05).

Benzer şekilde BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun çoklu anomaliye sahip sperm sayısı da kontrol grubundan ve yalnızca ozon uygulaması yapılan gruptan yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0,058 ve p=0,452; p>0,05).

Yalnızca ozon uygulaması yapılan grubun çoklu anomaliye sahip sperm sayısı da kontrol grubundan yüksek olmasına karşın yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,591; p>0,05).

4.1.5 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sperm ölü-canlı oranın karşılaştırılması

Tablo 23' de gösterildiği gibi canlı sperm hücrelerinin sayısı kontrol grubunda 165,75 ± 4,52, BEP grubunda 94,625 ± 6,927, BEP + Ozon grubunda 163,66 ± 4,955, Ozon grubunda 156,75 ± 5,092 olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada canlı sperm hücrelerinin sayısı yönünden gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,0001).

Tablo 23. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının canlı sperm sayılarının ortalamalarının karşılaştırılması

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
Canlı Sperm Sayıları (1/200)	Min - Mak	157 - 172	87 - 109	158 - 171	147 - 163	**< 0,0001******
	Ort.	165,75	94,625	163,66	156,75	
	± Ss	4,52	6,927	4,955	5,092	

One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

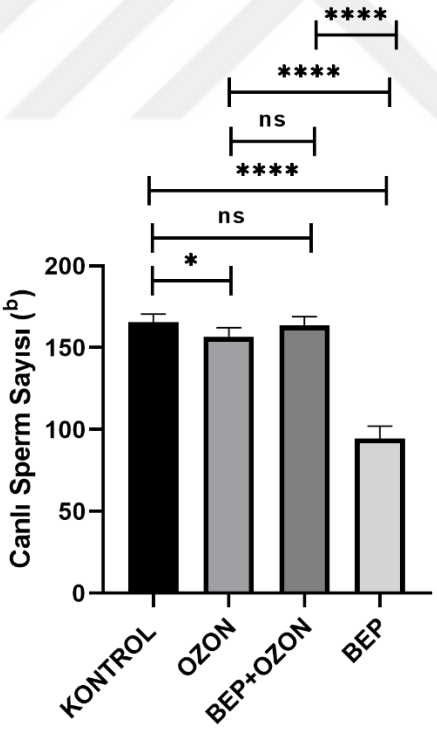
Tablo 24 ve Şekil 37' de gösterildiği gibi dört grup arasında canlı sperm hücreleri sayıları karşılaştırıldığında kontrol grubunun seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre çok daha yüksek olduğu (p=0,0001; p<0,0001), yalnızca ozon uygulanan gruba göre de nispeten yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,0249; p<0,05).

Kontrol grubundaki canlı sperm hücresi sayısı, BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba yüksek olsa da aralarında anlamı bir fark saptanmamıştır (p=0,912; p>0,05).

Tablo 24. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının canlı sperm sayılarının genel karşılaştırılması

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	71,13	0,921	63,04	79,21	< **0,0001******
	BEP + Ozon	2,083	0,921	-6,644	10,81	0,912
	Ozon	9	0,921	0,92	17,08	**0,0249***
BEP	BEP + Ozon	-69,04	0,921	-77,77	-60,31	< **0,0001******
	Ozon	-62,13	0,921	-70,21	-54,04	< **0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	6,917	0,921	-1,811	15,64	0,157

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 37. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının canlı sperm sayıları karşılaştırması (b)= 200 sperm sayılarak elde edilen sonuç
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 24 ve Şekil 37' de gösterildiği BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun ve yalnızca ozon uygulanan grubun canlı sperm hücresi sayısı yalnızca BEP uygulanan gruba göre çok daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0001 ve p=0,0001; p<0,0001).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun canlı sperm hücresi sayısı ile yalnızca ozon uygulanan grubunki karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır (p=0,157; p>0,05).

4.1.6 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının endokrin ve redoks değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 25. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması Testosteron, TAS, TOS ve TSH seviyelerinin karşılaştırılması (min-mak, ort ± ss).

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
Testosteron (ng/mL)	Min - Mak	5,417 - 11,528	2,896 - 4,368	4,914 - 6,725	4,329 - 7,135	**< 0,0001******
	Ort.	7,955	3,529	5,721	5,798	
	± Ss	2,378	0,478	0,673	0,932	
TAS (mmol Trolox Eq / L)	Min - Mak	4,191 - 6,148	3,233 - 4,431	3,755 - 6,606	5,415 - 7,489	**< 0,0001******
	Ort.	5,085	3,811	5,18	6,666	
	± Ss	0,727	0,436	1,168	0,807	
TOS (µmol H2O2Eq / L)	Min - Mak	1,118 - 2,741	2,338 - 3,692	1,732 - 2,431	0,862 - 2,431	**0,0001*****
	Ort.	1,9	2,966	2,044	1,756	
	± Ss	0,563	0,457	0,28	0,532	
TSH (mIU/L)	Min - Mak	3,234 - 4,546	0,789 - 2,704	2,287 - 3,99	3,322 - 5,573	**< 0,0001******
	Ort.	4,032	1,195	3,133	4,379	
	± Ss	0,401	0,676	0,648	0,825	

One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

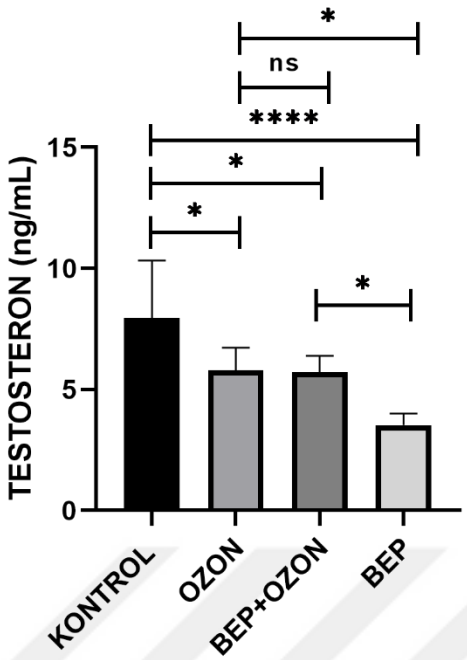
4.1.6.1 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması

Tablo 25' te gösterildiği gibi testosteron seviyesi kontrol grubunda 7,955 ± 2,378 ng/mL, BEP grubunda 3,529 ± 0,478 ng/mL, BEP + Ozon grubunda 5,721 ± 0,673 ng/mL, Ozon grubunda 5,798 ± 0,932 ng/mL olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada testosteron seviyeleri açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

Tablo 26. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testosteron seviyeleri (ng/mL)

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	4,426	0,862	2,427	6,426	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	2,233	0,862	0,147	4,32	**0,032***
	Ozon	2,157	0,862	0,225	4,089	**0,024***
BEP	BEP + Ozon	-2,193	0,862	-4,342	-0,043	**0,044***
	Ozon	-2,269	0,862	-4,268	-0,269	**0,021***
BEP + Ozon	Ozon	-0,076	0,862	-2,163	2,01	0,999

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 38. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testosteron seviyeleri (ng/mL)
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 26 ve Şekil 38' de gösterildiği gibi dört grup arasında testosteron seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubunun testosteron seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre çok daha yüksek olduğu (p=0,0001; p<0,05), BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba ve yalnızca ozon uygulanan gruba göre de nispeten yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla p=0,032 ve p=0,024; p<0,05).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun testosteron seviyesi yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek saptanmıştır (p=0,044; p<0,05).

Benzer şekilde yalnızca ozon uygulanan grubun testosteron seviyesi yalnızca BEP uygulanan gruba göre de yüksek saptanmıştır (p=0,021; p<0,05).

Yalnızca ozon uygulanan grubun testosetron seviyesi, BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre daha yüksek olsa da aralarında istatistiksel olarak anlamı bir fark saptanmamıştır (p=0,999; p>0,05).

4.1.6.2 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TOS seviyelerinin karşılaştırılması

Tablo 25' te gösterildiği gibi TOS seviyesi kontrol grubunda 1,9 ± 0,563 µmol H2O2Eq / L, BEP grubunda 2,966 ± 0,457 µmol H2O2Eq / L, BEP + Ozon grubunda 2,044 ± 0,28 µmol H2O2Eq / L, Ozon grubunda 1,756 ± 0,532 µmol H2O2Eq / L olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada TOS seviyeleri açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

Tablo 27. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TOS seviyeleri (µmol H2O2Eq / L)

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	-1,066	0,126	-1,729	-0,403	**0,0009*** **
	BEP + Ozon	-0,144	0,126	-0,86	0,571	0,944
	Ozon	0,143	0,126	-0,519	0,805	0,933
BEP	BEP + Ozon	0,922	0,126	0,206	1,638	**0,007** **
	Ozon	1,21	0,126	0,547	1,872	**0,0002*** **
BEP + Ozon	Ozon	0,287	0,126	-0,428	1,003	0,691

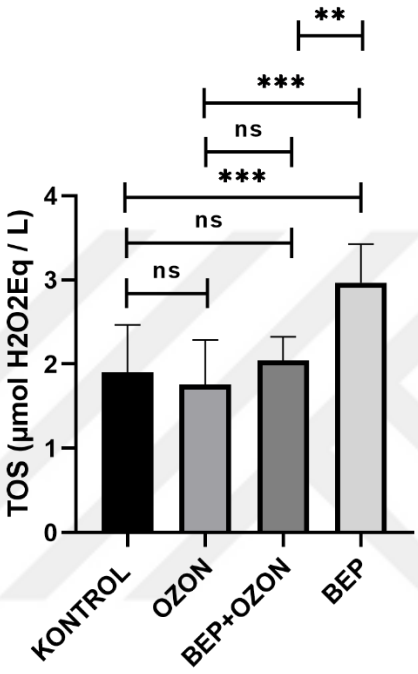
Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Tablo 27 ve Şekil 39' da gösterildiği gibi dört grup arasında TOS seviyeleri karşılaştırıldığında yalnızca BEP uygulanan grubun TOS seviyesinin kontrol grubuna ve yalnızca ozon uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla p=0,0009 ve 0,0002; p<0,05).

Benzer şekilde yalnızca BEP uygulanan grubun TOS seviyesinin, BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre de yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,007; p<0,05).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun TOS seviyesi kontrol grubuna ve yalnızca ozon uygulanan gruba göre daha yüksek olsa da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0,944 ve p= 0,691; p>0,05).

Kontrol grubu ve yalnızca ozon uygulanan grup arasında da TOS seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,933; p>0,05).



Şekil 39. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TOS seviyeleri (µmol H2O2Eq / L)
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

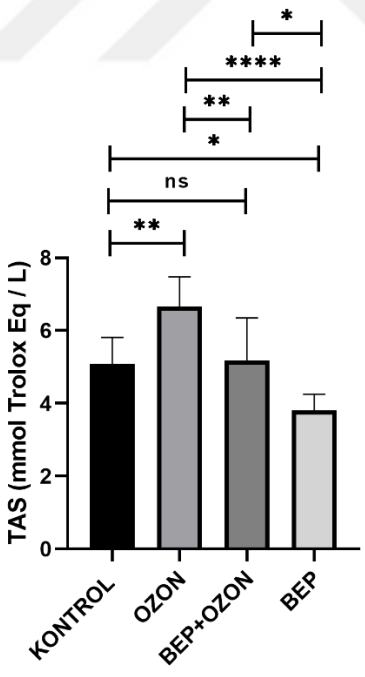
4.1.6.3 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TAS seviyelerinin karşılaştırılması

Tablo 25' de gösterildiği gibi TAS seviyesi kontrol grubunda 5,085 ± 0,727 mmol Trolox Eq / L, BEP grubunda 3,811 ± 0,436 mmol Trolox Eq / L, BEP + Ozon grubunda 5,18 ± 1,168 mmol Trolox Eq / L, Ozon grubunda 6,666 ± 0,807 mmol Trolox Eq / L olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada TAS seviyeleri açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,000; p<0,05).

Tablo 28. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TAS seviyeleri (mmol Trolox Eq / L)

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	1,274	0,301	0,183	2,364	**0,0176*** **
	BEP + Ozon	-0,095	0,301	-1,273	1,082	0,996
	Ozon	-1,581	0,301	-2,671	-0,49	**0,0026** **
BEP	BEP + Ozon	-1,369	0,301	-2,547	-0,191	**0,0182***
	Ozon	-2,855	0,301	-3,945	-1,764	**< 0,0001**** **
BEP + Ozon	Ozon	-1,485	0,301	-2,663	-0,307	**0,0095** **

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 40. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TAS seviyeleri (mmol Trolox Eq / L)
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 28 ve Şekil 40’ da gösterildiği gibi yalnızca ozon uygulanan grubun TAS seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre çok daha yüksek ($p=0,0001$; $p<0,05$), BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba ve kontrol grubuna göre ise daha yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0,0095$ ve $p=0,0026$; $p<0,05$).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun TAS seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,0182$; $p<0,05$).

Benzer şekilde kontrol grubunun TAS seviyesinin de yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p= 0,0176$; $p<0,05$).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun TAS seviyesi kontrol grubuna göre nispeten yüksek olsa da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,996$; $p>0,05$).

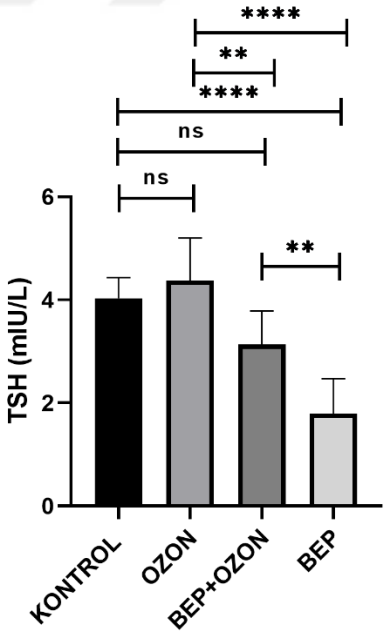
4.1.6.4 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TSH seviyelerinin karşılaştırılması

Tablo 25’ de gösterildiği gibi TSH seviyesi kontrol grubunda 4,032 ± 0,401 mIU/L, BEP grubunda 1,195 ± 0,676 mIU/L, BEP + Ozon grubunda 3,133 ± 0,648 mIU/L, Ozon grubunda 4,379 ± 0,825 mIU/L olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada TSH seviyeleri açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,000$; $p<0,05$).

Tablo 29. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TSH seviyeleri (mIU/L)

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	2,237	0,175	1,337	3,138	**< 0,0001******
	BEP + Ozon	0,899	0,175	-0,073	1,872	0,0774
	Ozon	-1,581	0,175	-1,247	0,553	0,7176
BEP	BEP + Ozon	-1,369	0,175	-2,31	-0,365	**0,0044****
	Ozon	-2,855	0,175	-3,485	-1,684	**< 0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	-1,485	0,175	-2,219	-0,274	**0,0083****

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



Şekil 41. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının TSH seviyeleri (mIU/L)
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 29 ve Şekil 41' de gösterildiği gibi kontrol grubunun TSH seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,0001; p<0,05).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre ise kontrol grubunun TSH seviyesi nispeten yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,0774; p>0,05).

Benzer şekilde yalnızca ozon uygulanan grubun TSH seviyesi de kontrol grubuna göre yüksek olmasına karşın istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,7176; p>0,05).

Yalnızca ozon uygulanan grubun TSH seviyesinin de yalnızca BEP uygulanan gruba ve BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla p=0,000 ve p=0,0083; p<0,05) .

Yine benzer şekilde BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun TSH seviyesinin de yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,0044; p<0,05).

4.1.6.5 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Beta-hCG ve AFP Seviyelerinin Ölçümü

Testis kanserinde hastalarda tanı, tedavi ve takibin düzenli yapılabilmesi için tümör belirteçlerinden olan, insan koryonik gonadotropin (hCG) ve alfafetoprotein (AFP) tayini önemli bir yer almaktadır (Mann K, 1990). Bununla beraber AFP tümör evrelemesinde de yaygın olarak kullanılan bir tümör belirtecidir (Gani ve ark., 2019).

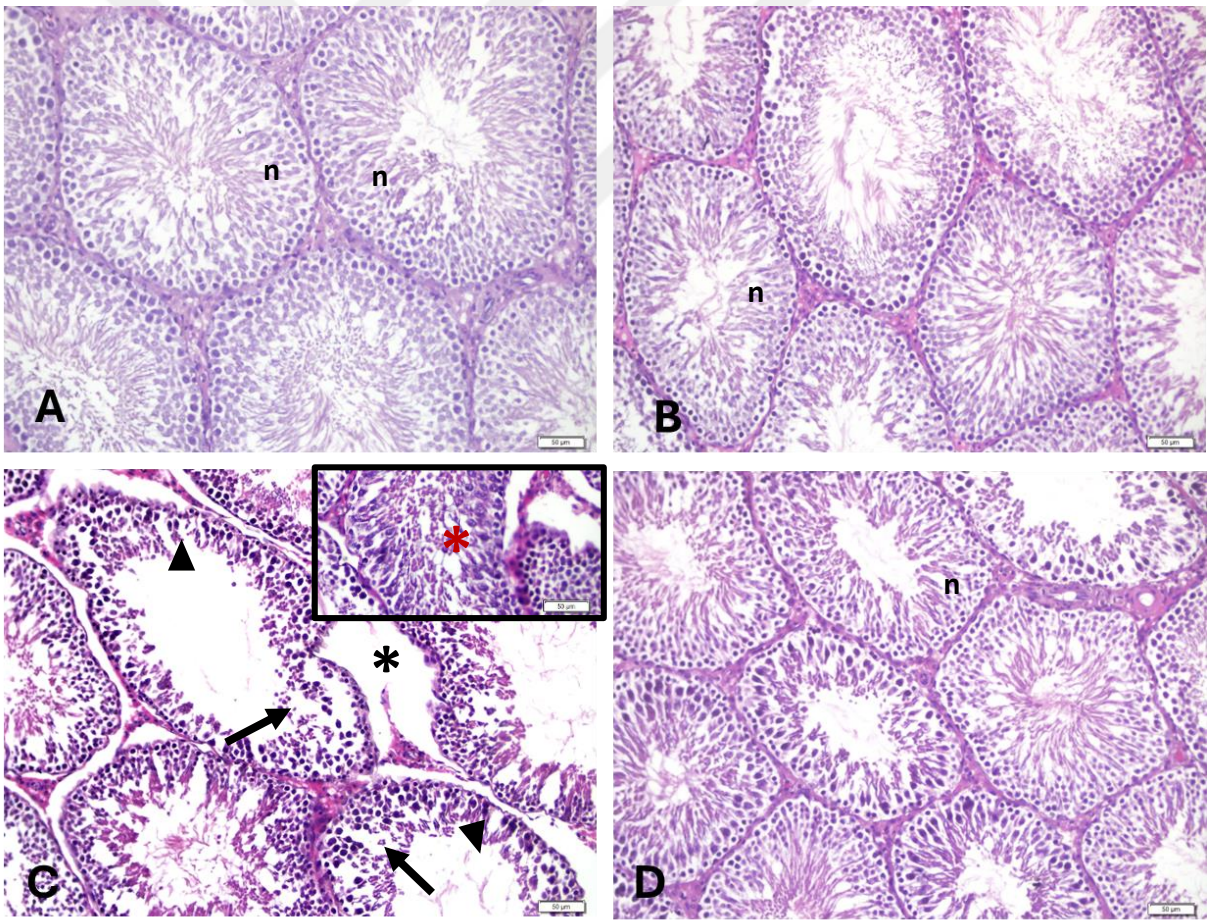
Çalışmamızda kullanılan sıçanlarda patojen herhangi bir tümör bulunmamaktadır. Medikal ozon terapisinin ve BEP tedavisinin birlikte ve ayrı ayrı normal dokulara sahip sıçanlarda serum beta-hCG ve alfa-fetoprotein seviyelerine etkilerine bakıldı.

Örnekler, daha hassas çalışılabilmesi adına özel bir veteriner tanı laboratuvarı olan VETLAB Veteriner Laboratuvar Hizmetleri Ltd. Şti.' ne gönderildi. Firmanın önerdiği protokol izlenerek Electro-Chemiluminescence Immunı Assay yöntemi ile (Roche Cobas® E 601) ölçümler yapıldı. Sonuç olarak tüm gruplardaki hayvanlarda beta-hCG

ve AFP seviyeleri normal düzeyde saptanmıştır. Gruplardaki hayvanlarda tümör olmaması sebebi ile herhangi bir artış olması beklenmemekteydi. Medikal ozon veya BEP tedavisi ayrı ayrı veya birlikte kullanımda, tümör olmaması durumunda beta-hCG ve AFP seviyelerinde herhangi değişikliğe sebep olmamıştır.

4.1.7 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının testis histopatolojisinin değerlendirilmesi

Testis histopatolojisinin değerlendirilmesi için elde edilen doku örneklerinden histopatolojik doku takibi yapılmış ve elde edilen veriler Johnson skorlaması ve seminifer tübül epitel kalınlığı bakımından karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırılmadan elde edilen veriler Şekil 42 ve Tablo 30' da gösterilmiş olup, aşağıda bahsi geçen konu başlıkları altında değerlendirilmiştir.



Şekil 42. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon Uygulaması Gruplarının karşılaştırmalı testis histogramı (A: Kontrol, B:Ozon, C:BEP, D: BEP + Ozon,. n:normal tübül, Ok başı: epitelde incelme, Ok: Vakuol, Siyah *: interstisyel alanın bütünlüğünü kaybetmesi, Kırmızı *: Deskuamasyon)

Tablo 30. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Johnson Skorlama ve Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı Karşılaştırması

		KONTROL	BEP	BEP + OZON	OZON	p değeri
Johnson Skorlama	Min - Mak	9,85 - 10	4 - 6	4 - 8	9,45 - 10	**< 0,0001******
	Ort.	9,925	5	6 ,916	9,843	
	± Ss	0,065	0,0755	1,8	0,169	
Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı (µm)	Min - Mak	77 - 126	38 - 90	73 - 121	87 - 105	**0,0061****
	Ort.	94,75	69,875	98,3	94,25	
	± Ss	15,471	17,529	21,722	7,478	

One-Way ANOVA *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

4.1.7.1 Johnson Skorlama

Tablo 30' da gösterildiği gibi Johnson skorlaması kontrol grubunda 9,925 ± 0,065, BEP grubunda 5 ± 0,075, BEP + Ozon grubunda 6,916 ± 1,8, Ozon grubunda 9,843 ± 0,169 olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada Johnson skorlaması açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,0001; p<0,0001).

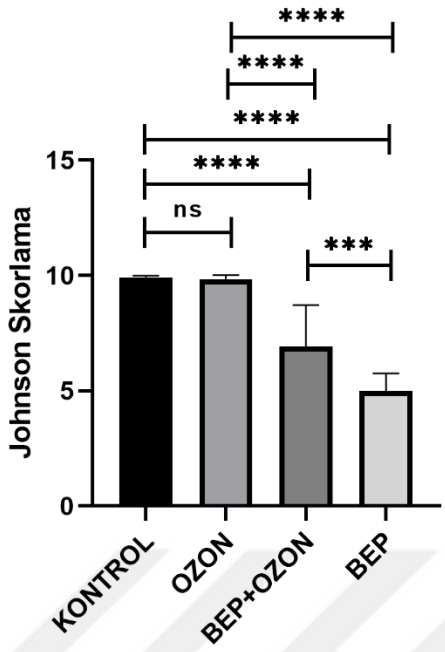
Tablo 31. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Johnson Skorlama Verileri

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	4,925	0,849	3,758	6,092	< **0,0001******
	BEP + Ozon	2,988	0,849	1,821	4,154	< **0,0001******
	Ozon	0,081	0,849	-1,085	1,248	0,9975
BEP	BEP + Ozon	-1,938	0,849	-3,104	-0,77	**0,0005*****
	Ozon	-4,844	0,849	-6,01	-3,677	< **0,0001******
BEP + Ozon	Ozon	-2,906	0,849	-4,073	-1,74	< **0,0001******

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Tablo 31 ve Şekil 43' de gösterildiği gibi yalnızca BEP uygulanan grubun Johnson Skorlaması, kontrol, BEP + ozonun birlikte uygulandığı grup ve yalnızca ozon uygulanan grubunkinden çok daha düşük saptanmıştır (sırsıyla p=0,0001; p<0,0001; p=0,0005; p<0,05 ve p=0,0001; p<0,0001).

BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun Johnson Skoru, yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek ancak kontrol grubuna göre daha düşüktür (sırasyıla p=0,0005; p<0,05 ve p=0,0001; p<0,0001). BEP ile birlikte uygulanan medikal ozon, BEP'in germ hücreleri üzerindeki olumsuz etkisini anlamlı farklılık gösterecek düzeyde azaltmış ancak tamamen ortadan kaldıramamıştır. Kontrol grubu ile hala anlamlı farklılık gözlenmektedir.



Şekil 43. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Johnson Skorlaması Verilerinin Karşılaştırması
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

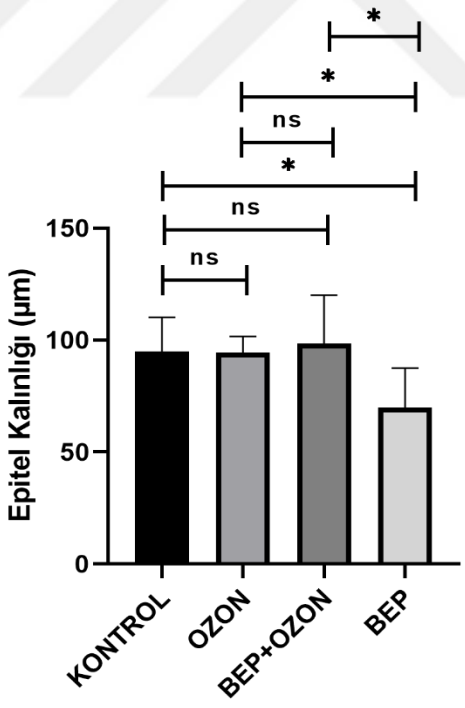
4.1.7.2 Seminifer Tübül Epitel Kalınlığı

Tablo 30' da gösterildiği gibi epitel kalınlıkları kontrol grubunda 94,75 ± 15,471 µm, BEP grubunda 69,875 ± 17,529 µm, BEP + Ozon grubunda 98,3 ± 27,722 µm, Ozon grubunda 94,25 ± 7,478 µm olarak bulunmuştur. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmada epitel kalınlıkları açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,0061$; $p<0,05$).

Tablo 32. Seminifer Tübül Epitel Kalınlıkları (µm)

Deney Grubu	Deney Grubu	Ortalama Fark	Std. Hata	%95' lik güvenilirlik aralığı		p değeri
				Alt Sınır	Üst Sınır	
Kontrol	BEP	24,88	5,976	3,059	46,69	**0,021***
	BEP + Ozon	-3,583	5,976	-27,15	19,98	0,975
	Ozon	0,5	5,976	-21,32	22,32	>0,99
BEP	BEP + Ozon	-28,46	5,976	-52,02	-4,894	**0,0136***
	Ozon	-24,38	5,976	-46,19	-2,559	**0,0243***
BEP + Ozon	Ozon	4,083	5,976	-19,48	27,65	0,963

Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001



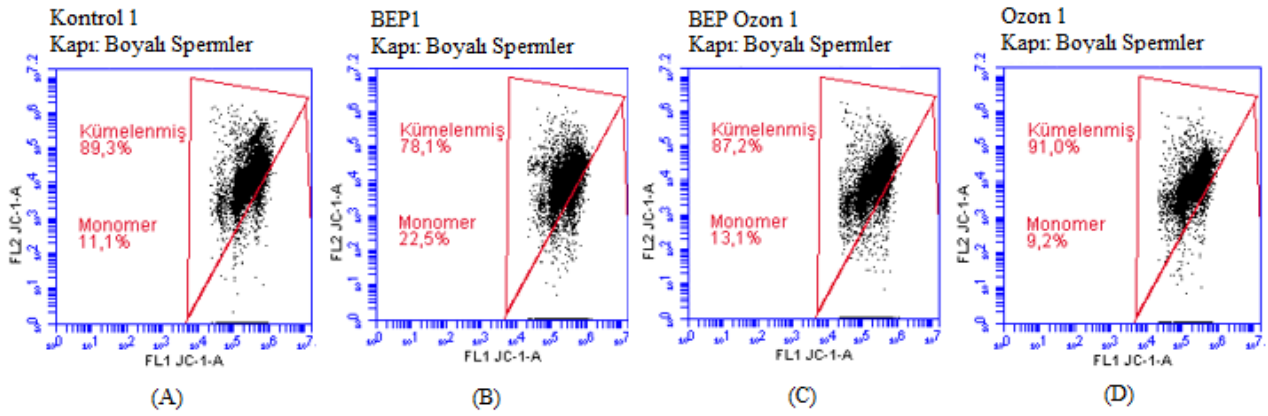
Şekil 44. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının Seminifer Tübül Epitel Kalınlıkları (µm) karşılaştırması
Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.
(Tukey HSD *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 32 ve Şekil 44'te gösterildiği gibi seminifer tübül epiteli BEP ile ozonun birlikte kullanıldığı grupta, yanlızca BEP kullanılan gruba göre daha kalın saptanmıştır (p= 0,0136; p p<0,05). Benzer şekilde kontrol ve yalnızca ozon kullanılan grupların seminifer tübül epitelleri de, yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha kalındır (sırasıyla p=0,021 ve p=0,0243; p<0,05).

4.1.8 Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının mitokondriyal transmembran potansiyellerinin flow sitometri sonuçlarının değerlendirilmesi

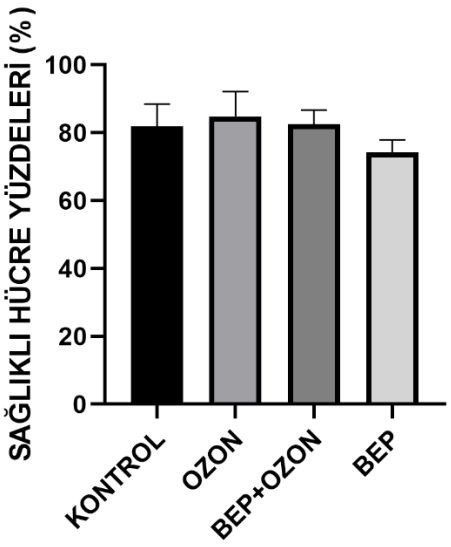
Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü için katyonik ve lipofilik bir boya olan tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1) kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda (yüksek mitokondriyal membran potansiyeli nedeniyle), JC-1 mitokondride kümelenerek J-agregatları adı verilen tersinir kompleksler oluşturur ve kırmızı ila turuncu renkli bir emisyon (590±17,5 nm) elde edilir. Dolayısıyla, sağlıklı hücrelerde JC-1 mitokondriye girer ve kümelenerek baskın olarak FL-2 kanalında saptanabilen kırmızı floresan yayar. Apoptotik hücrelerde ise JC-1 yine mitokondriye girer fakat artan membran geçirgenliği sebebi ile J agregatlarını oluşturacak konsantrasyonlara ulaşamaz, monomer olarak kalır ve baskın olarak FL-1 kanalında saptanabilen yeşil floresan elde edilir (emisyon: 530±15 nm).

Sonuç olarak mitokondriyal membran potansiyeli yüksek olan sağlıklı hücreler baskın olarak FL-2 (BD Accuri cihazında 585/40) kanalında kırmızı floresan sergilerken membran potansiyeli düşük, apoptotik hücreler ise FL-1 (BD Accuri cihazında 533/30) kanalında yeşil floresan verir (Sivandzade vd., 2019; Kanev Orlinov M., Muranlı Gökalp FD., 2016).



Şekil 45. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının kümelenmiş ve monomer yapıda olan hücrelerin yüzde değerleri

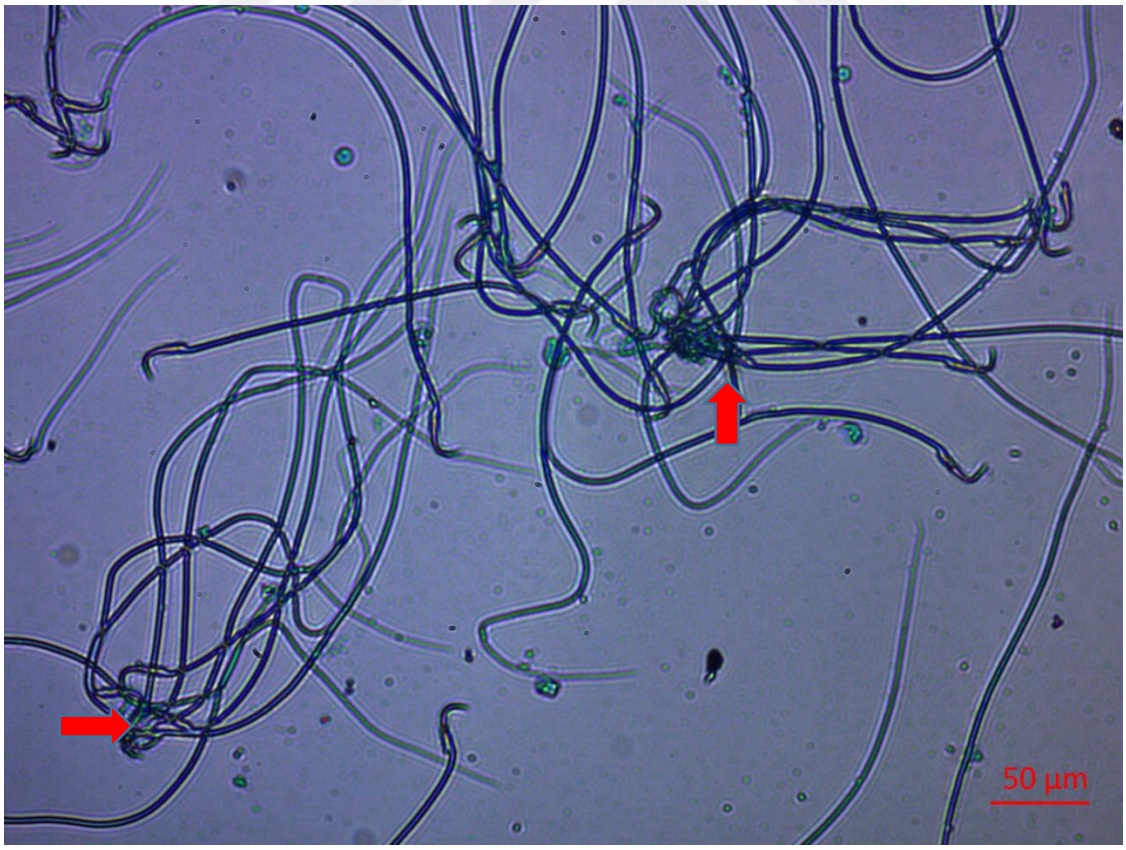
Şekil 45'te tüm gruplardaki birinci hayvanların boyama sonrası grafikleri gösterilmektedir. Analiz esnasında elde edilen grafiklerdeki olaylar, büyüklük (FSC) ve granül yapıları (SSC) esas alınarak kapı alınmıştır. Hücrelerde membran geçirgenliği arttıkça monomer formda bulunan JC-1 baskın olarak FL1 kanalında saptanır. Membran geçirgenliği normal olan sağlıklı hücreler ise kümelenerek baskın olarak FL2 kanalında sinyal vermektedir.



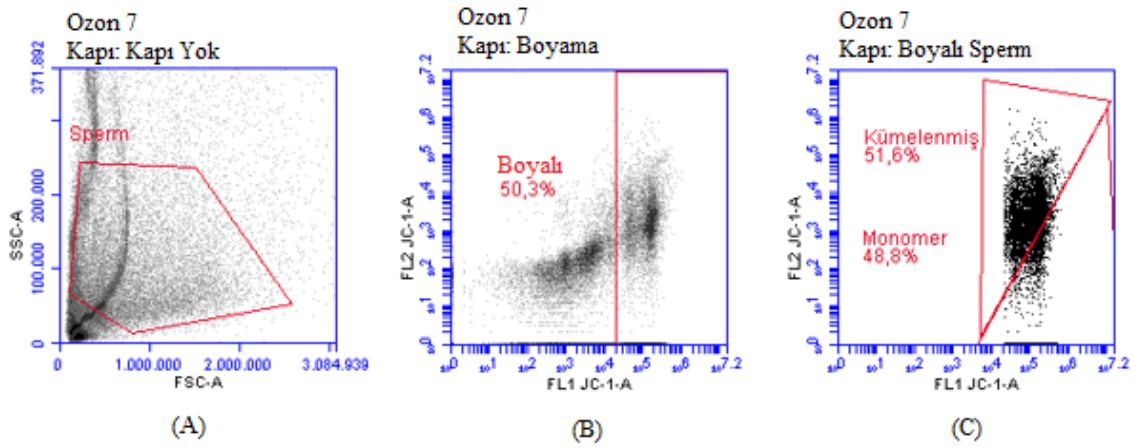
Şekil 46. Kontrol, BEP, BEP+Ozon ve Ozon uygulaması gruplarının sağlıklı hücrelerin yüzde (%) ortalamaları

Şekil 46'da görüldüğü üzere gruplardaki sonuç elde edilebilen hayvanların sağlıklı hücrelerinin yüzde ortalamaları kontrol grubunda % 81,86 ± 5,37, yalnızca BEP uygulanan grupta % 74,3 ± 3,21, ozon ile birlikte BEP uygulaması yapılan grupta % 82,53 ± 3,38 ve yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta ise % 80,76 ± 11,5 olarak bulunmuştur.

Şekil 47'de görüldüğü üzere sıçan spermlerinin baş kısmı anatomisi gereği kanca şeklindedir. Bu anatomik şeklinden dolayı bazı örneklerde santrifüj sonrası heterojen kompleks oluşumu yoğun oranda gözlenmiştir (Şekil 47). Şekil 48'da FSC/SSC parametrelerinin analiz edildiği grafikte bu heterojen kompleks oluşumuna bağlı atipik hücre popülasyonu görülmektedir. Bu oluşumların, JC-1 boyaması esnasında hücrelerin boyayı verimli almasına engel olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durumun gözlendiği numunelerin analiz dışı bırakılması gerekmiştir. Sonuçta gruplarda örneklem büyüklükleri yetersiz kalmış olup mitokondriyal transmembran potansiyellerinin ölçümü için istatistiksel analizler yapılamamıştır.



Şekil 47. Sıçan spermlerinin kanca şeklinde baş kısmından kaynaklı kümelenmeleri



Şekil 48. Santrifüjleme esnasında meydana gelen kümelenmelere bağlı gerçekleşen olaylar

4.2 Tartışma

Çalışmamızda üreme çağına gelmiş (12-14 hafta) erkek sıçanlara 9 hafta boyunca BEP tedavisi uygulanmış ve erkek üreme sisteminde meydana getirdiği hasar, sperm sayısı, ölü / canlı oranı, morfolojisi ve testis histopatolojisi yönlerinden incelenmiş olup medikal ozon tereapisinin de uzun süreli etkilerine bakılmıştır. Bunlara ek olarak deneklerden elde edilen serumdan oksidatif stres parametrelerinden TAS ve TOS değerlerine ve endokrinolojik olarak da testosteron ve TSH değerlerine bakılmış, hücresel enerji aktivitesi açısından da mitokondriyal transmembran potansiyelleri incelenmiştir.

BEP uygulaması yapılan grubun ağırlık artışının daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde (Peckham vd., 1983; Bieber vd., 2006) diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede az olduğu tespit edilmiş olup BEP ile ozonun beraber uygulandığı grubun ağırlık artışı BEP grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte yalnızca ozon uygulanan grubun ağırlık artışının kontrol grubuna göre daha az olması, medikal ozonun vücuda alımını takiben oksidatif etki göstermesinin ardından buna karşılık oluşan antioksidan yanıtın çok hızlı olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bocci ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada ozonun vücuda alımını takiben çok hızlı bir şekilde kanda çözünüp çeşitli antioksidanlar ile hızla reaksiyona girerek tamamıyla nötralize olduğunu bunun sonucunda da ROS, hidrojen peroksit ve LOP meydana getirdiğini göstermiş, daha sonra oluşan tüm serbest radikallere karşı antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GSH-Px vb.) hızla aktif hale geldiğini ortaya

koymuşlardır (Bocci V 2006a; Bocci V 2006b; Bocci V 2007). İlk etapta oluşan oksidatif stresin vücut ağırlık artışı ile ilişkisini ortaya koyabilmek için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Gerçekleştirdiğimiz literatür taramalarında medikal ozon tedavisinin uzun süreli tekrarlanan dozlarda uygulanmasına rastlanmamıştır. Çalışmamız, BEP tedavisi ile birlikte medikal ozon terapisinin 9 hafta boyunca tekrarlanan dozlarda uygulanması yönüyle ilk olma özelliğindedir. Aynı zamanda medikal ozonun oksidan-antioksidan dengesine uzun süreli etkisine bakıldığı ilk çalışmalardandır. Buna bağlı olarak bazı sonuçların (uzun süreli kullanımın kiloya etkisi vb.) literatüre yeni girecek olması açısından önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Gruplar arası testis ağırlıklarına bakıldığında, Moradi ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde BEP uygulaması yapılan grubun testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarında olduğu gibi diğer gruplara göre daha az olduğu görülmüştür (Moradi vd., 2021). Ancak BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grup ile yalnızca BEP uygulanan grubun testis ağırlıkları bakımından aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Testis ağırlıklarında olduğu gibi gruplar arası testis ağırlık indeksi (TAİ) değerlerinde de yalnızca BEP uygulanan grubun değerlerinin diğer gruplara göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde TAİ değerlerinde de yalnızca BEP uygulaması yapılan grup ile BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Testis ağrılıkları ve TAİ değerleri göz önüne alındığında BEP tedavisi ile birlikte ozon uygulamasının yalnızca BEP uygulaması yapılan gruba göre bir etki oluşturmadığı görülmüştür.

BEP uygulamasının oligospermi ve azospermiye neden olduğu bilinmektedir (Bieber A.M vd., 2006; Marcon L. vd., 2008). Mevcut çalışmada sperm sayılarına bakıldığında daha önceki çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde, BEP uygulaması yapılan grubun sperm sayısının diğer tüm gruplara göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte BEP ve ozonun birlikte uygulandığı grubun sperm sayısının diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, BEP ve ozonun birlikte uygulandığı grubun sperm sayısının BEP uygulanan gruba göre anlamlı derecedeki artışı ozon terapisinin BEP'in oligospermi ve azospermi etkilerini önlemede etkin olabileceğini düşündürmektedir. Yalnızca ozon uygulanan grubun sperm sayısının kontrol grubuna

göre daha fazla çıkmasının ozonun antioksidan etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Salem EA vd., 2017; Tusat M vd., 2017; Bocci V, 2008; Mete F vd., 2017).

Bieber A.M. ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada BEP tedavisinin spermlerde morfolojik anomaliyi arttırdığını gözlemlemişlerdir (Bieber A.M vd., 2006). Çalışmamızda benzer şekilde yalnızca BEP uygulaması yapılan grubun morfolojik anomali gösteren sperm sayısının, toplam sperm sayısına ters orantılı şekilde diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Antioksidan özellikteki maddelerin BEP tedavisinin gonadlar üzerindeki toksik etkisini tamamen engellemese de gözlemlenebilir düzeyde azalttığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Aydos TR. vd., 2014; Salem EA vd., 2017; Kilarkaje vd., 2013; Moradi vd., 2021). Bu çalışmalardan farklı olarak BEP ile birlikte ilk kez uygulanan ozon terapisinin de yalnızca BEP uygulamasına göre spermlerde gerçekleşen anomaliyi anlamlı derecede düşürdüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte yalnızca ozon uygulanan grubun morfolojik anomali gösteren sperm sayısı yönünden kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmasının sebebinin yine ozon terapisinin vücuda alımını takiben ilk etapta oluşturduğu oksidatif stresten kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Bocci V 2006a; Bocci V 2006b; Bocci V 2007). BEP ile birlikte kullanılan ozon uygulamasının morfolojik anomali gösteren sperm sayısında BEP uygulanan gruba göre anlamlı derecede azalma göstermesi ozonun antioksidan etkisinin kemoterapötiklere karşı umut vaad ettiğini göstermektedir. Bu etkinin kesinliğini ortaya koyabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Morfolojik anomaliler yönünden elde ettiğimiz verilere baktığımızda, baş, boyun ve kuyruk anomalisi gösteren sperm sayıları yönünden genel morfolojik anomali tablosuna benzer bir tablo görülmektedir. Tüm bu anomalilerde yalnızca BEP uygulaması yapılan grubun baş, boyun ve kuyruk anomalisi gösteren sperm sayısının diğer tüm gruplardan anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmektedir. BEP ile ozonun birlikte uygulandığı gruba baktığımızda, yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha düşük çıkması ozon terapisinin muhtemel koruyucu etkilerini tekrar öne sürmektedir.

Ölü-canlı sperm sayılarına baktığımızda BEP uygulamasının canlılık oranını kontrol grubuna göre yarı yarıya azalttığı buna karşın BEP ile birlikte ozon uygulanmasının canlılık oranını BEP grubuna göre yaklaşık iki katına çıkardığı görülmektedir. Semet M

ve arkadaşlarının 2017 de yayınladıkları çalışmada da sitotoksik etkili ilaçların erkeklerde canlılık, sayı vb. sperm parametrelerinde olumsuz etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Semet M vd., 2017). Bu çalışmaya benzer şekilde mevcut çalışmamızda da sitotoksik etkili BEP tedavisinin, sperm canlık oranını önemli ölçüde düşürdüğü görülmüştür.

Endokrin sistemi değerlendirdiğimizde, testis tümörlerinde kemoterapi yan etkileri açısından Kilarkaje ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada belirttikleri gibi BEP tedavisi hipofiz-testis ekseninde bozukluğa yol açmaktadır (Kilarkaje vd., 2013) . Mevcut çalışmamızda yalnızca BEP uygulaması yapılan grubun testosteron seviyesinin diğer tüm gruplardan anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da Al-Bader ve Kilarkaje' nin yaptıkları çalışmada BEP tedavisinin testosteron seviyesini anlamlı derecede düşürdüğünü ortaya koymaları ile benzer sonuç göstermektedir (Al-Bader M. ve Kilarkaje N., 2015). BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun testosteron seviyesinin, yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek olması ozon terapisinin BEP' in toksik etkisine karşı muhtemel koruyucu etkinliğini bir kez daha düşündürmektedir. Bununla birlikte ozon terapisinin testosteron üretiminden sorumlu olan Leydig hücrelerinin korunmasına da katkı sağladığını ortaya koymaktadır. TSH seviyelerine bakıldığında yalnızca BEP terapisi uygulanan grubun TSH seviyesinin diğer gruplardan anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun TSH seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek çıkması daha önce bahsedilenlere paralel olarak ozon terapisinin, BEP tedavisinin sebep olduğu hipofiz-testis eksenindeki bozukluğu önlemede etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak endokrin aksın değerlendirilmesi için son organ fonksiyonlarını bütünüyle değerlendirecek ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

BEP'in oksidatif stres ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (Marcon L vd., 2011; Delbes G vd., 2007; Chan D vd., 2012). TOS seviyeleri yönünden gruplara bakıldığında daha önceki çalışmalara (Moradi vd., 2021) benzer şekilde, yalnızca BEP uygulaması yapılan grubun TOS seviyesinin diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte BEP ile ozon uygulaması yapılan grupta TOS seviyesi yalnızca BEP uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşüş göstermiştir. Bu da bir kez daha medikal ozon terapisinin antioksidan etkisinin güçlü olduğunu düşündürmektedir. TAS seviyelerine bakıldığında ise antioksidan özelliği bilinen ozonun, uygulandığı

grupların TAS seviyesinin kontrol ve BEP gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Yalnızca ozon uygulanan grubun TAS seviyesinin diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun TAS seviyesinin yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da medikal ozonun, gonadotoksik etkilerin sebep olduğu serbest oksijen radikallerinin seviyesinin artışını düşürdüğünü ve oksidan – antioksidan dengesinin korunmasına katkı sağladığını göstermektedir.

Moradi ve arkadaşlarının çalışmasında belirttiği gibi BEP tedavisi, sıçanlarda testis histopatolojilerinde değişikliklere yol açarak spermatogenezi etkiler (Moradi vd., 2021). Benzer şekilde mevcut çalışmamızda da BEP tedavisinin, seminifer tübül epitelinde diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede incelmeye yol açtığı tespit edilmiştir. BEP ile ozonun birlikte kullanımında ise seminifer tübül epitelinin, yalnızca BEP tedavisi uygulanan gruba göre anlamlı derecede daha kalın olduğu görülmüştür. Johnson skorlamasına bakıldığında yalnızca BEP uygulanan grubun Johnson skorlaması, diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır. BEP ile ozonun birlikte uygulandığı grubun Johnson skorlaması ise, yalnızca BEP uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur.

Tümör belirteçlerinden olan beta-hCG ve AFP seviyeleri incelendiğinde sonuçların tüm gruplardaki hayvanlarda referans değerlerde olduğu gözlemlenmiştir. Medikal ozon terapisinin tek başına ve BEP tedavisi ile birlikte uzun süreli kullanımında hayvanlarda, sakrifikasyon esnasında yapılan makroskobik incelemede de herhangi bir tümör oluşumuna rastlanmamıştır. Bununla birlikte mevcut çalışma, direkt kanserli organizmalar yerine sağlıklı erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlarda yapılmış olup, sitotoksik etki BEP protokolü uygulanarak elde edilmiştir. Medikal ozon terapisinin hali hazırda tümör gelişmiş organizmalarda etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için aynı evrede ve patolojik tipte hastalık taşıyan canlılar ile deneysel çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. Önerilen bu tip çalışmalar ile medikal ozonun kanserli dokuda esas etkilerinin nasıl olacağı ancak anlaşılabilir.

Sıçan sperminin mitokondriyal membran potansiyeli analizleri için örnekler elde edildikten hemen sonra zaman kaybetmeden ve dondurmadan taze bir şekilde çalışılması gerekmektedir. Shi ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptıkları çalışmada belirttikleri gibi sperm örnekleri dondurulup çözülürken üretilen çok miktardaki ROS, oksidatif strese yol

açarak sperm hücrelerini programlanmış hücre ölümüne yönlendirir. Sperm hücrelerinde hasara yol açarak sperm kalitesini düşürür. Bu da yapılan analizlerde doğru sonuç alınmasını imkânsız hale getirmektedir. Gravance CG ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada taze bir şekilde çalışılan spermlerde mitokondriyal zar potansiyelinin, dondurulup çözülen spermlere oranla çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Gravance CG vd., 2001). Mevcut çalışmamızda sıçan sperm hücrelerinde santrifüj işlemi sonrası analizlerde heterojen kompleks oluşumları yoğun oranda gözlenmiş olup bu oluşumlara bağlı olarak da atipik hücre popülasyonları görülmüştür. Bu oluşumların, JC-1 boyaması esnasında hücrelerin boyayı verimli almasına engel olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durumun gözlendiği numunelerin analiz dışı bırakılması gerekmiş ve sonuç olarak da gruplarda örneklem büyüklükleri yetersiz kaldığından mitokondriyal transmembran potansiyellerinin ölçümü için istatistiksel analizler yapılamamıştır.

Ozon terapisi ile ilgili güncel literatürde çok kez çalışılmış olmasına karşın bu çalışmalarda uygulanan dozlar ile ilgili büyük farklılıklara rastlanmaktadır. Mevcut çalışmamızda uyguladığımız medikal ozon terapisi doz/etki mekanizması bakımından mevcut literatüre katkı sağlayacak sonuçlara sahiptir. Medikal ozon dozu yanında, BEP protokolü için daha önce yapılan çalışmalarda (Bayram vd., 2023) kullanılan doz tercih edilmiş olup, ilgili dozun deneysel modelleme için etkili olduğu gösterilmiştir.

Mevcut çalışmamızda hücre morfolojisi, hücre sayıları, redoks hemostazisi ve endokrin durum gibi birçok açıdan çok sayıda parametre incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar yanında bu sonuçların güvenilirliği ve tekrar edilebilirliği açısından ileride benzeri yapılacak çalışmalara ışık tutması muhtemeldir. Medikal ozon terapisi için etkin dozlar kullanılmasının, dişi cinsiyetteki hayvanlarda da benzer ve farklı parametrelerin araştırılmasının, BEP protokolünden farklı kemoterapi protokollerinin çalışılmasının, oksidatif stres sürecindeki belirteçlerin direkt etkilediği protein denatürasyonu / DNA metilasyonu-hidroksilasyonu, lipid peroksidasyonu belirteçlerinin incelenmesinin, kan ve testis dokuları haricinde idrar, beyin omurilik sıvısı ve doku homojenatları gibi farklı biyolojik ortamların da incelenmesinin mevcut çalışmayı ileriye taşıyacağı ve literatüre katkı sağlayacağı kanaati oluşmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada BEP tedavisi alan, üreme çağına gelmiş erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlarda medikal ozon terapisinin, vücut ağırlık artışları, testis ağırlık indeksleri, sperm sayıları, sperm morfolojileri, testis histopatolojileri, testosteron, TAS, TOS, TSH seviyeleri ve mitokondriyal transmembran potansiyelleri üzerindeki koruyucu etkisi araştırıldı.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda,

BEP tedavisinin sıçanlarda;

a) Vücut ağırlık artışında, testislerin ağırlık artışında ve testis ağırlık indeksinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.
b) Sperm sayısında azalmaya bununla birlikte morfolojik anomali gösteren sperm sayısında artışa yol açtığı gösterilmiştir.
c) Testis histopatolojisinde neden olduğu bozulmalardan dolayı, Johnson skorunda azalmaya ve seminifer tübül epitelinde incelmeye yol açtığı gösterilmiştir.
d) Serum testosteron, TSH ve TAS seviyelerinde azalmaya, TOS seviyesinde ise artışa yol açtığı gösterilmiştir.

BEP tedavisi ile birlikte uygulanan medikal ozon terapisinin ise sıçanlarda BEP tedavisinin aksine;

a) vücut ağırlıklarında artışa yol açtığı gösterilmiştir.
b) Sperm sayısında artışa ve bununla birlikte morfolojik anomali gösteren sperm sayısında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.
c) Testis histopatolojisinde kontrol grubuna benzer şekilde doku yapısını koruduğu, Johnson skorunda değişikliği sınırlandırıp seminifer tübül epitelinde atrofiyi azalttığı gösterilmiştir.
d) Serum testosteron, TSH ve TAS seviyelerindeki artışa, TOS seviyesinde ise azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda Ozon terapisinin, BEP tedavisinin neden olduğu olumsuzluklara karşı koruyuculuğu araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda medikal ozon kullanımının BEP tedavisinin organizmada neden olduğu sekonder hasarı önlemede etkin bir koruyuculuğu olduğu saptanmıştır.

Güçlü antioksidan etkisi bilinen medikal ozon terapisi, BEP tedavisinin sebep olduğu kilo kaybını, sperm sayısındaki azalmayı, sperm canlılığındaki azalmayı, spermlerdeki morfolojik anomalileri büyük ölçüde önlemiş, testosteron ve TSH gibi fertilite için önemli hormonlardaki düşüşü anlamlı derecede engellemiş ve artan oksidatif stresi önleyerek oksidan-antioksidan dengesini koruduğu görülmüştür.

Mevcut çalışma ozon terapisinin tek başına ve BEP ile birlikte uzun süreli kullanımı açısından literatürde bir ilk olma özelliğindedir. Bu sebeple elde edilen verilerin literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Bununla birlikte çalışmamızdaki hayvanlar tüm patojenlerden ari ve yapılan değerlendirmelerde herhangi bir tümörü bulunmayan hayvanlardır. Bu nedenle ozon terapisinin ortaya koyduğumuz bu koruyucu etkisinin optimizasyonu için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKÇA

Akande, A. A., Isah, I. A., Aliyu, I. S., ve Adesiyun, A. G. (2022). Thyroid dysfunction in women of reproductive age: laboratory protocol for infertility evaluation. *Ann Ib Postgrad Med.*, 20(1), 53-57.

Al-Bader M, Kilarkaje N. (2015). Effects of bleomycin, etoposide and cisplatin treatment on Leydig cell structure and transcription of steroidogenic enzymes in rat testis. *European Journal of Phramacology.* 2015 Jan 15;747:150-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.12.006.

Albers, P., Siener, R., Krege, S., Schmelz, H. U., Dieckmann, K. P., Heidenreich, A., vd. (2008). Randomized phase III trial comparing retroperitoneal lymph node dissection with one course of bleomycin and etoposide plus cisplatin chemotherapy in the adjuvant treatment of clinical stage I Nonseminomatous testicular germ cell tumors: AUO trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology,* 26(18), 2966–2972. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.0899

Amirshahi, T., Najafi, G., ve Nejati, V. (2014). Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine,* 12(3), 209-216.

Arıcan, E. Y., Gökçeoğlu Kayalı, D., Ulus Karaca, B., Boran, T., Öztürk, N., Okyar, A., vd. (2020). Reproductive effects of subchronic exposure to acetamiprid in male rats. *Scientific Reports*, 10(1), 8985. doi:10.1038/s41598-020-65887-0

Ateşşahin, A., Karahan, İ., Türk, G., Gür, S., Yılmaz, S., ve Çeribaşı, A. O. (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, 21(1), 42-47.

Aydos, T. R., Başar, M. M., Kul, O., Atmaca, H. T., Uzunalioğlu, T., Kisa, Ü., vd. (2014). Effects of ozone therapy and taurine on ischemia/reperfusion-induced testicular injury in a rat testicular torsion model. *Turk J Med Sci.*, 44, 749–755.

Bamias, A., Aravantinos, G., Kastriotis, I., Alivizatos, G., Anastasiou, I., Christodoulou, C., vd. (2011). Report of the long-term efficacy of two cycles of adjuvant bleomycin/etoposide/cisplatin in patients with stage I testicular nonseminomatous germ-cell tumors (NSGCT): a risk adapted protocol of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Urol Oncol*, 29, 189-193.

Bailly C. (2023). Etoposide: A rider on the cytokine storm. *Cytokine*. 2023 Aug; 168:156234. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156234. Epub 2023 Jun 1. PMID: 37269699.

Bayram H, Donmez Cakil Y, Sitar ME, Demirel G, Selam B, Cincik M. (2023). The Effects of Glutathione on Clinically Essential Fertility Parameters in a Bleomycin Etoposide Cisplatin Chemotherapy Model. Life (Basel). Mar 17;13(3):815. doi: 10.3390/life13030815. PMID: 36983969; PMCID: PMC10058932.

Bennett, J. M., ve Reich, S. D. (1979). Bleomycin. *Annals of internal medicine*, 90(6), 945–948.

Bieber, A. M., Marcon, L., Hales, B. F., ve Robaire, B. (2006). Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl*, 27, 189-200.

Björndahl, L., Apolikhin, O., Baldi, E., Barratt, C. L. R., Festin, M. P. R., Kirkman-Brown, J. C., vd., (Eds.). (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). Geneva: World Health Organization. 10 Ocak 2024'de https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208

Björndahl, L., Söderlund, I., Kvist, U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment , *Human Reproduction*, 18 (4) : 813-816.

Bocci, V. (1996). Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonetherapy today. *J Biol Regul Homeost Agents Apr-Sep,* 10(2-3), 31-53.

Bocci, V. (2006a). Scientific and medical aspects of ozone therapy. *State of the art. Archives of Medical Research,* 37, 425-435.

Bocci, V. (2006b). Is It True That Ozone Is Always Toxic? The End of A Dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology,* 216(3), 493-504.

Bocci, V. (2007). Can Ozonetherapy Be Performed. If The Biochemistry Of The Process Cannot Be Controlled. *Archives Of Medical Research,* 38, 584-585

Bocci, V., Zanardi, I., ve Travagli, V. (2011). Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Med Gas Res.,* 1, 6–6.

Bocci, V. (2008). The question of balance: The interaction between blood and ozone. In: Valacchi G, Davis P, editors. *Oxidants in Biology.* Dordrecht, Netherlands: Springer; 2008. pp. 155–65.

Calabrò, F., Albers, P., Bokemeyer, C., Martin, C., Einhorn, L.H., Horwich A., vd. (2012). The contemporary role of chemotherapy for advanced testis cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol,* 61, 1212-1221.

Chan, D., Delbès, G., Landry, M., Robaire, B., ve Trasler, J.M. (2012). Epigenetic alterations in sperm DNA associated with testicular cancer treatment. *Toxicol Sci,* 125, 532-543.

Christian, B. (2023). Etoposide: A rider on the citokine storm. *Cytokine*, Aug:168:156234. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156234. Epub 2023 Jun 1.

Cochard, L.R. (2013). *Netter's Atlas of Human Embriyology* (Update Edition). Chicago, USA: Elsevier Health Sciences.

Culine, S., Kramar, A., Théodore, C., Geoffrois, L., Chevreau, C., Biron P., vd. (2008). Randomized trial comparing bleomycin/etoposide/cisplatin with alternating

cisplatin/cyclophosphamide/doxorubicin and vinblastine/bleomycin regimens of chemotherapy for patients with intermediate- and poor-risk metastatic nonseminomatous germ cell tumors: Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers Trial T93MP. *J Clin Oncol*, 26, 421-427.

Darwish, I. A., Wani, T. A., Alanazi, A. M., Hamidaddin, M. A., ve Zargar, S. (2013). Kinetic-exclusion analysis-based immunosensors versus enzyme-linked immunosorbent assays for measurement of cancer markers in biological specimens. *Talanta,* 111, 13-9. doi: 10.1016/j.talanta.2013.03.034.

Delbes, G., Hales, B. F., ve Robaire, B. (2007). Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl*, 28, 241-249.

Einhorn, L. H., ve Foster, R. S. (2006). Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin for Three Cycles Compared With Etoposide and Cisplatin for Four Cycles in Good-Risk Germ Cell Tumors: Is There a Preferred Regimen? *Journal of Clinical Oncology*, 24(16), 2597-2598.

Ertaş K, Eroğlu Ö, Yüksel S. Azospermik ve oligospermik hastaların spermiyogram parametrelerine göre sınıflandırılması. *J Health Sci Med /JHSM /jhsm*. Aralık 2018;1(4):85-93. doi:10.32322/jhsm.471058

Eşrefoğlu. (2017). *Embriyoloji.* İstanbul: İstanbul tıpm Kitabevleri

Feldman D. R., Bosl G. J., Sheinfeld J., ve Motzer R.J. (2008). Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA*, 299, 672-684.

Gani S.A., Muhammad S.A., Kura A.U., Barahuie F., Hussein M.Z., Fakurazi S., vd. (2019). Effect of protocatechuic acid-layered double hydroxide nanoparticles on diethylnitrosamine/phenobarbital-induced hepatocellular carcinoma in mice. *PLoS ONE*. May 29;14(5):e0217009. doi: 10.1371/journal.pone.0217009.

Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T. (2001). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol.* 2001 Jan-Feb;15(1):5-10. doi: 10.1016/s0890-6238(00)00113-1. PMID: 11137373.

Güven, A., Gundoğdu, G., Sadir, S., Topal, T., Erdoğan, E., Korkmaz, A., vd. (2008). The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. *J. Pediatr. Surg*., 43, 1679-1684

Halliwell, B. (2009). Free Radicals and Antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews,* 52(8), 253-265. http://doi.org/10.1111(j.1753-4887.1994.tb01453.x

Hande K. R. (1992). Etoposide pharmacology. *Seminars in oncology*, 19(6 Suppl 13), 3–9.

Hay, J., Shahzeidi, S., ve Laurent, G. (1991). Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Archives of toxicology*, 65(2), 81–94.

Hecht, S.M. (2000). Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *Journal of Natural Products*, 63(1), 158-168. http:// doi.org/10.1021/np990549

Howell S.J., ve Shalet S.M. (2002). Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl*, 25, 269-276.

Howell, S. J., ve Shalet, S. M. (2005). Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (34), 12–17.

Howell, S. J., ve Shalet, S. M. (2001). Testicular function following chemotherapy. *Human reproduction update*, 7(4), 363–369.

İrez, T., Kuçur, M., ve İşman, F.K. (2007). Androloji Kitabı El Kitabı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, Bölüm: 1-1

Jahnukainen, K., Ehmcke, J., 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.

Kanev Orlinov M., Muranlı Gökalp FD. (2016). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, *SAÜ Fen Bil Der* 20. Cilt,1. Sayı, s.33-38,2016

Karakçı, D. (2021). The potential effects of sulforaphane hydrolyzed from glucosinolates and relationship between Nrf-2 Keap-1 signal pathway. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences,* 6(3), 352-356

Kawai, K., ve Akaza, H. (2010). Current status of chemotherapy in risk-adapted management for metastatic testicular germ cell cancer. *Cancer science,* 101(1), 22–28.

Kelland L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nature reviews. *Cancer,* 7(8), 573–584.

Khadivi, F., Razavi, S., ve Hashemi, F. (2020). Protective effects of zinc on rat sperm chromatin integrity involvement: DNA methylation, DNA fragmentation, ubiquitination and protamination after bleomycin etoposide and cis-platin treatment. *Theriogenology,* 142, 177-183.

Kilarkaje, N., Mousa, A. M., Al-Bader, M. M., ve Khan, K. M. (2013). Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin–induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. *Fertility and Sterility*, 100(4), 1151-1159.e5.

Kim, H. S., Noh, S. U., Han, Y. W., Kim, K. M., Kang, H., Kim, H. O., vd. (2009). Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *Journal of Korean Medical Science*, 24(3), 368–374.

Holmström, K. M., Kostov, R. V., ve Dinkova-Kostova, A. T. (2016). The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Current opinion in toxicology,* 1, 80–91.

Kopp, H. G., Kuczyk, M., Classen, J., Stenzl, A., Kanz, L., Mayer, F., vd. (2006). Advances in the treatment of testicular cancer. *Drugs*, 66(5), 641–659.

Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., ve Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 49(1), 112–117.

Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., van Zyl, J. A., vd. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46(6), 1118–1123.

Kul, S. (2014). Uygun İstatistiksel Test Seçim Kılavuzu, *Türk Toraks Derneği Dergisi*

Kul, S. (2011). Klinik Araştırmalarda Örnek Genişliği Belirleme. *Ekstraplevral* , 129-132.

Ma Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 401–426.

Mann K. (1990). Tumor markers in testicular cancer. *Urologe A.* Mar;29(2):77-86.

Marcon, L., Hales, B. F., ve Robaire, B. (2008). Reversibility of the Effects of Subchronic Exposure to the Cancer Chemotherapeutics Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin on Spermatogenesis, Fertility, and Progeny Outcome in the Male Rat. *Journal of Andrology*, 29(4), 408-417

Marcon, L., Zhang, X., Hales, B. F., Robaire, B., ve Nagano, M. C. (2011). Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *Journal of Andrology*, 32(4), 432–443.

Maselli, J., Hales, B. F., Chan, P., ve Robaire, B. (2012). Exposure to Bleomycin, Etoposide, and Cis-Platinum Alters Rat Sperm Chromatin Integrity and Sperm Head Protein Profile1. *Biology of Reproduction,* 86(5), 1-10.

Menkveld, R., Lacquet, F. A., Kruger, T. F., Lombard, C. J., Sanchez Sarmiento, C. A., ve de Villiers, A. (1997). Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia*, 29(1), 1–7.

Menkveld, R., Stander, F. S., Kotze, T. J., Kruger, T. F., ve van Zyl, J. A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 5(5), 586–592.

Mescher, A.L. (2019). *Junqueira Basic Histology Text and Atlas* (14.). New York: McGraw-Hill.

Mete, F., Tarhan, H., Celik, O., Akarken, I., Vural, K., Ekin, R. G., vd. (2017). Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 43–46. https://doi.org/10.4103/1008-682X.171570

Moradi, M., Goodarzi, N., Faramarzi, A., Cheraghi, H., Hashemian, A. H., ve Jalili, C. (2021). Melatonin protects rats testes against bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced toxicity via mitigating nitro-oxidative stress and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111481.

Mortimer, D. (1994) *Practical Laboratory Andrology*. New York, USA: Oxford University Press, pp 66–69.

Narayana, K., Al-Bader, M., Mousa, A., ve Khan, K. M. (2012). Molecular effects of chemotherapeutic drugs and their modulation by antioxidants in the testis. *European Journal of Pharmacology*, 674(2-3), 207–216.

Oner, Ç., Çolak, E., ve Coşan, D. T. (2017). Potassium channel inhibitors induce oxidative stress in breast cancer cells. *Asian Biomed*, 11(4), 323–30

Padma-Nathan, H. (1999). *Medical management of erectile dysfunction: a primary care manual*. New York, NY:Professional Communications Publishers.

Peckham, M. J., Barrett, A., Liew, K. H., Horwich, A., Robinson, B., Dobbs, H. J., vd. (1983). The treatment of metastatic germ-cell testicular tumours with bleomycin, etoposide and cis-platin (BEP). *British Journal of Cancer*, 47(5), 613–619. https://doi.org/10.1038/bjc.1983.99

Petersen, D. R., ve Doorn, J. A. (2004). Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free radical biology & medicine*, 37(7), 937–945.

Qu, D. D., Peng, F. J., Liu, L., Yang, S. L., ve Guo, Y. B. (2011).. Effect of ozonized saline on signaling passway of Keap1-Nrf2-ARE in rat hepatocytes. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 19(5), 367–371.

Razavi S, Khadivi F, Hashemi F, Bakhtiari A. Effect of Zinc on Spermatogenesis and Sperm Chromatin Condensation in Bleomycin, Etoposide, Cisplatin Treated Rats. *Cell J.* 2019 Jan;20(4):521-526. doi: 10.22074/cellj.2019.5522. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30123998; PMCID: PMC6099135.

Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2017). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas.* (B. Baykal, Ed.) (6.). Ankara: Palme Yayınevi.

Sadler, T. W. (2020). *Langman's Medikal Embriyoloji* (13th ed). Ankara: Palme Yayınevi

Sahinturk V, Guclu C, Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian J Androl.* 2007 Jan;9(1):117-24. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00229.x. PMID: 17187163.

Sahoo, D. K., Roy, A., ve Chainy, G. B. N. (2008). Protective effects of vitamin E and curcumin on l-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions,* 176(2-3), 121-128.

Salem, E. A., Salem, N. A., ve Hellstrom, W. J. (2017). Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin-induced testicular toxicity in an experimental rat model. *Andrologia,* 49(1), 10.1111/and.12603.

Schieber, M., ve Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology :* CB, 24(10), R453–R462.

Semet M, Paci M, Saïas-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Boissier R, Lejeune H, Perrin J. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology.* 2017 Jul;5(4):640-663. doi: 10.1111/andr.12366. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28622464.

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., ve De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect.

International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 3(1), 91-100.

Shi H, Li QY, Li H, Wang HY, Fan CX, Dong QY, (2024). ROS-induced oxidative stress is a major contributor to sperm cryoinjury. *Hum Reprod.* 2024 Feb 1;39(2):310-325. doi: 10.1093/humrep/dead250. PMID: 38011909.

Sivandzade, F., Bhalerao, A., ve Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol*, 9(1), e3128. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3128

St. Germain, C., Niknejad, N., Ma, L., Garbuio, K., Hai, T., ve Dimitroulakos, J. (2010). Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-acivated protein kinase pathways ana activating transcription factor 3. *Neoplasia*, 12(7), 527-538. http://doi.org/10.1593/neo.92048

Tapul, l. (2018). *Genel ve Özel Embriyoloji.* İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri.

Tusat, M., Mentese, A., Demir, S., Alver, A., ve Imamoglu, M. (2017). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. International braz j urol : official journal of the *Brazilian Society of Urology*, 43(6), 1160–1166. https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0546

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., vd. (2017). Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521. https://doi.org/10.3390/nu9050521

Weijl, N. I., Cleton, F. J., ve Osanto, S. (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer treatment reviews*, 23(4), 209–240. https://doi.org/10.1016/s0305-7372(97)90012-8

Wyns, C., Curaba, M., Vanabelle, B., Van Langendonckt, A., ve Donnez, J. (2010). Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Human reproduction update*, 16(3), 312–328. https://doi.org/10.1093/humupd/dmp054

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onay Formu

“Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

EK 2: Deney hayvanları kullanım sertifikası

“Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

ÖZ GEÇMİŞ

NECDET ALTINER

Eğitim

Derece	Yıl	Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı
Ls. - Y.Ls.	2015	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Lise	2010	Marmara Koleji Fen Lisesi

İş/İstihdam

Yıl	Görev
2022 -	Sorumlu Yönetici Veteriner Hekim / / Maltepe Üniversitesi Deney Hayvaları Uygulama ve Araştırma Merkezi
2019 - 2022	Veteriner Hekim / Maltepe Üniversitesi Deney Hayvaları Uygulama ve Araştırma Merkezi
2018 - 2019	Hava Veteriner Teğmen / Milli Savunma Üniversitesi Hava Harp Okulu Komutanlığı
2017 - 2018	Veteriner Hekim - Araştırmacı / Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi
2015 - 2017	Sorumlu Veteriner Hekim / Maywell Veteriner Kliniği

Mesleki Birlik/Dernek Üyelikleri

Yıl	Kurum
2015 -	İstanbul Veteriner Hekimler Odası

Yayınlar ve Diğer Bilimsel/Sanatsal Faaliyetler

- Effect of a bovine collagen matrix on tendon adhesions during the repair of rat Achilles tendon. Hand Surgery & Rehabılıtatıon (2021) Cilt: 40 Sayı: 3 Sayfa: 250-257

M. Gurler, T. Aksan, M. B. Ozturk, M. Tezcan, A. N. T. Yildirim, E. Bozdag, N. Altiner & F. Yamak

- How do the effective therapeutics for hepatocellular carcinoma treatment change PIWI Interacting RNA expressions. Acta Medica Alanya (2020) Cilt: 4 Sayı: 3 Sayfa: 242-246

Ç. Öner, N. Altıner & E. Çolak

- Coumarin Treatment Changes Expressions of PIWI Interacting RNAs Selectively in Hepatolcellular Carcinoma. Konferans Adı: INSAC Natural and Health Sciences Yer: Türkiye

Ç. Öner, N. Altıner & E. Çolak

- Experimental Vitamin D Deficiency in Rats: Clinical Chemistry, Histopathological, and Immunological Evaluation. Cureus. 2024 Aug 22;16(8):e67490. doi: 10.7759/cureus.67490. PMID: 39310506; PMCID: PMC11416068.

ME Sitar, Y Donmez Cakil, BO Ipek, N Altıner, MS Aydin, H Gunal, AD Atamis, A Karadeniz.