T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METOTREKSAT UYGULANAN SIÇANLARDA APOSİNİN'İN TESTİSLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Kübra KAVRAM

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir
Proje Numarası:201559HD
Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ HADYEK 7/7-2015

KOCAELİ
2016

KABUL ONAY

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Metotreksat Uygulanan Sıçanlarda Aposinin'in Testisler Üzerindeki Etkilerinin Biyokimyasal ve Histolojik Olarak İncelenmesi

Tez yazarı: Kübra KAYRAM
Tez savunma tarihi: 27.06.2016

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Prof. Dr. F. Sürgyo Ceylan	
Üye	Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz	
Üye	Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK	

ONAY
Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ETİK KURUL ONAYI

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE NO: 2015 /29 **BAŞVURU BİLGİLERİ**	ARAŞTIRMANIN ADI	Metotreksat Uygulanan Sıçanlarda Aposinin'in Testisler Üzerindeki Etkilerinini Biyokimyasal ve Histolojik Olarak İncelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ /KOÜ Tıp Fak Histoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Yüks. Lis. Öğr. Kübra KAVRAM, Doç. Dr. Yusufhan YAZIR, Yard. Doç. Dr. Fatma Ceylan ERALDEMİR

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	×

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan **uygun** olduğu kararına varılmıştır.	
	KARAR NO: KOÜ HADYEK 7/7-2015	**KARAR TARİHİ: 09.07.2015**

ETİK KURUL ÜYELERİ

UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOÜ) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	☐ Katıldı ☑ Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	☐ Katıldı ☑ Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	☐ Katıldı ☑ Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi	☑ Katıldı ☐ Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	☐ Katıldı ☐ Katılmadı	

Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Sekreterliği, Umuttepe Yerleşkesi, Eski İstanbul Yolu 10.km, 41380 Umuttepe / İZMİT
Tel: 0 262 303 70 15; - Faks: 0 262 303 70 03

ÖZET

Metotreksat Uygulanan Sıçanlarda Aposinin'in Testisler Üzerindeki Etkilerinin Biyokimyasal ve Histolojik Olarak İncelenmesi

Amaç: Kanser ya da birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan Metotreksat'ın testis dokusu üzerinde oluşturduğu yan etkileri değerlendirmek ve bu etkilerin azaltılması ya da önlenmesine yönelik koruyucu bir faktör olarak antioksidan özellikte olan Aposinin uygulanmasının erkek fertilitesi üzerine etkilerini incelemektir.

Yöntem: Araştırma için 50 adet, 8 haftalık Wistar albino ırkı erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 10 adet olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 1.25 ml %0.9'luk NaCl verildi. DMSO grubuna ise Aposinin çözücüsü olduğu için hergün 0.2 ml DMSO verildi. Metotreksat alan gruplara deneyin 24.günü 20mg/kg tek doz Metotreksat; Aposinin alan gruplara da 20mg/kg ve 50mg/kg Aposinin hergün verildi. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal olarak yapıldı. 28.gün sonunda tüm sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Alınan testisler ve kan örnekleri histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol ve DMSO grubu sıçanların testis yapısı ve biyokimyasal parametreleri normal olarak izlendi. Metotreksat grubuna ait seminifer tübüllerde vakuolizasyona, lümene dökülen immatür germ hücrelerine ve bazal lamina ondülasyonuna; interstisyel alanda ise konjesyona rastlandı. Aynı zamanda apoptotik hücreler diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha fazla görüldü. Biyokimyasal olarak doku ve kan örneklerine bakıldığında, MDA ve MPO seviyeleri yüksek, GSH ve testosteron seviyeleri ise düşüktü. Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat gruplarının apoptotik indekslerinin Metotreksat grubuna göre önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Tedavi gruplarının testis histolojileri ve biyokimyasında ise Metotreksat'ın oluşturduğu bozukluklarının önemli ölçüde azaldığı gözlendi.

Sonuç: Bulgularımız Metotreksat'ın testiste oksidatif stresle oluşturulan etkilerin testiste yapısal bozukluklar oluşturduğunu; Aposinin'in ise antioksidan etkisiyle Metotreksat'ın testiste oluşturduğu bu oksidatif hasarı düzelttiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis, Metotreksat, Aposinin, Apoptoz, MDA, MPO, GSH, Testosteron

ABSTRACT

Histological and Biochemical Examination of Apocynin on Testes of Methotrexate-Induced Rats

Objectives: Methotrexate, widely used drug in cancer or many diseases therapy, has many adverse effects on tissues. Apocynin, NADPH oxidase inhibitor, has many antioxidant properties. We aim to demonstrate the adverse effects of Methotrexate on testicular tissue and evaluate the protective effects of Apocynin on Methotrexate-induced testis injury and male fertility.

Method: A total of 50 male Wistar albino rats (eight weeks old) were divided into five groups: Control (n=10), DMSO (n=10), Methotrexate (n=10), Apocynin(20mg)+ Methotrexate (n=10), and Apocynin(50mg)+ Methotrexate (n=10) groups. Control group received 1.25 ml, %0.9NaCl. DMSO group received 0,2 ml DMSO(Apocynin solvent) everyday. The experimental groups [Methotrexate, Apocynin(20mg/kg) and Apocynin(50mg/kg)] received 20 mg/kg Methotrexate as a single dose on day 24, while Apocynin (20mg/kg) and Apocynin (50mg/kg) received Apocynin everyday. All injections were performed intraperitoneally. At the end of day 28, all rats were sacrified under anesthesia. Testes were evaluated histologically and blood samples were analysed biochemically.

Results: Testicular tissue and biochemical parameters of rats were normal in control and DMSO groups. Methotrexate group displayed vacuolization in seminiferous tubules, immature germ cells in lumens, basal lamina ondulation and congestion in interstitial tissue. Apoptotic cells were significantly higher in Methotrexate group compared with the other groups. Tissue and blood MDA and MPO levels were increased while the GSH and testosterone levels were decreased in Methotrexate group. Apoptotic index were significantly decreased in Apocynin(20 mg/kg) and Apocynin(50 mg/kg) groups compared with the Methotrexate group. Apocynin treatment groups decimated the methotrexate-induced testicular injury and biochemical abnormalities.

Conclusion: Our results suggest that Methotrexate induces structural defects on testis morphology via oxidative stress and Apocynin ameliorates these effects with its antioxidant properties.

Keywords: Testis, Methotrexate, Apocynin, Apoptosis, MDA, MPO, GSH, Testosterone

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ'a,

Eğitimim boyunca destek, deneyim ve bilgi birikimlerini paylaşan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım; Prof. Dr. Süreyya CEYLAN, Prof. Dr. Serdar FİLİZ ve Prof. Dr. Süheyla GONCA'ya,

Tez çalışmalarım süresince bana bilgileriyle katkıda bulunan ve yönlendiren değerli hocalarım Doç. Dr. Yusufhan YAZIR ve Yrd. Doç. F. Ceyla ERASLAN'a,

Çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, tezimle ilgili her türlü sorunda tecrübelerini paylaşan çok değerli çalışma arkadaşlarım Sema KURNAZ ÖZBEK, Ayşegül AYTEKİN, Selenay FURAT RENÇBER, Fazilet DEDE, Mehmet SARIHAN, Liridona ADİLİ OSMANİ ve Esra ACAR'a,

Hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Ailem ve Dostlarıma,

TEŞEKKÜR EDERİM

Kübra KAVRAM

KOCAELİ, Mayıs 2016

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

/ / 2016

Kübra KAVRAM

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY iii
ÖZET v
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR vii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiii
ÇİZİMLER DİZİNİ xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ xviii
1.GİRİŞ 1
1.1. TESTİS 1
1.1.1. Testis Anatomisi 1
1.1.2.Testis Embriyolojisi 4
1.1.3.Testis Histolojisi 6
1.1.3.1.Seminifer Tübüller 7
1.1.3.1.1. Miyoid Hücreleri 9
1.1.3.1.3. Spermatogonyumlar 10
1.1.3.1.4.Primer ve Sekonder Spermatositler 11
1.1.3.1.5. Erken ve Geç Dönem Spermatidler 12
1.1.3.1.6. Spermatozoon (Olgun Spermatozoa) 12
1.1.3.2. İnterstisyel Alan 13
1.1.3.2.1. İnterstisyel Bağ Dokusu 13
1.1.3.2.2. Leydig Hücreleri 13
1.1.3.3. Spermatogenez 14
1.1.3.3.1. Spermatositogenez 15

1.1.3.3.2. Mayoz Bölünme 15
1.1.3.3.3.3. Spermiyogenez 16
1.1.3.3.3.1. Golgi Fazı 17
1.1.3.3.3.2. Başlık (Cap) Fazı 17
1.1.3.3.3.3. Akrozom Fazı 17
1.1.3.3.3.4. Olgunlaşma Fazı 18
1.1.4. Testisin Histofizyolojisi 18
1.1.4.1.Kan-Testis Bariyeri 19
1.2.KANSER VE KEMOTERAPİ 20
1.2.1. Antineoplastik (Antikanser) İlaçları 21
1.2.2. Antimetabolitler 23
1.3. METOTREKSAT 24
1.3.1. Metotreksatın Etki Mekanizması 24
1.3.1.1. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi 26
1.3.1.2. Metotreksatın Antiinflamatuvar Etkisi 26
1.3.1.3. Metotreksatın İmmunmodülatör Etkisi 26
1.3.2. Metotreksatın Farmakokinetik Özellikleri 26
1.3.3. Metotreksatın Endikasyonları 28
1.3.4. Metotreksatın Yan Etkileri 28
1.4. OKSİDATİF STRES 29
1.4.1. Serbest Radikaller 30
1.4.2. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri 31
1.4.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri 31
1.4.4.1. Glutatyon (GSH) 32
1.4.4.2. Malondialdehit (MDA) 33
1.4.4.3.Myeloperoksidaz (MPO) 33
1.5. NADPH OKSİDAZ (NOX) 34

1.6. APOSİNİN 34
2.AMAÇ 38
3.GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1.DENEY HAYVANLARI 39
3.2. GRUPLARIN OLUŞTURULMASI ve UYGULAMALAR 39
3.3. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER ve CİHAZLAR 40
3.3.1. Kimyasal Malzemeler 40
3.3.2.Cihazlar 40
3.4.VÜCUT AĞIRLIKLARININ ÖLÇÜMÜ 41
3.5.TESTİS AĞIRLIKLARININ ÖLÇÜMÜ 41
3.6. BİYOKİMYASAL ANALİZ 41
3.6.1.Doku Homojenizasyonu 41
3.6.2.Doku Protein Tayini 41
3.6.3.Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Tayini 41
3.6.4.Glutatyon (GSH) Düzeylerinin Tayini 41
3.6.5.Myeloperoksidaz (MPO) Düzeylerinin Tayini 42
3.6.6. Testosteron Ölçümü 42
3.7.IŞIK MİKROSKOBİ UYGULAMARI 42
3.7.1. Hematoksilen&Eozin Boyaması 43
3.7.2. Tunel Boyaması 43
3.8.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER 43
4.BULGULAR 45
4.1.VÜCUT ve ORGAN AĞIRLIKLARI 45
4.1.1. Metotreksat Verilmeden Önceki Vücut Ağırlıkları 45
4.1.3.Sağ Testis Ağırlığı 47
4.2.BİYOKİMYASAL BULGULAR 48
4.2.1. Malondialdehit (MDA) Ölçüm Bulguları 48

4.2.2. Glutatyon (GSH) Ölçüm Bulguları 50
4.2.3. Testosteron Ölçüm Bulguları 52
4.2.4. Myeloperoksidaz (MPO) Ölçüm Bulguları 53
4.3.HİSTOLOJİK BULGULAR 56
4.3.1. Işık Mikroskobik İnceleme 56
4.3.2. Tunel Boyaması Bulguları 60
5.TARTIŞMA 63
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER 68
KAYNAKLAR 70
ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm: Mikrometre

µl: Mikrolitre

ABP: Androjen-bağlayıcı protein

AICAR: Aminoimidazol karbokzamid ribozil 5 fosfat

AMH: Antimülleriyan hormon

Ca^{+2}: Kalsiyum iyonu

cAMP: Adenozin monofosfat

COX: Siklooksijenaz sistemi

DHFR: Dihidrofolat redüktaz

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

FH2: Dihidrofolat

FH4: Tetrahidrofolat

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

GAR: Glisinamid ribozil 5 fosfat

GGT: Gama glutamil transferaz

GH: Büyüme hormonu

GIS: Gastrointestinal sistem

GPx: Glutatyon peroksidaz

GSH: Glutatyon

GSSG: Okside glutatyon konsantrasyonu

H_2O_2: Hidrojen peroksit

hCG: İnsan koryon gonadotropin hormon

H&E: Hematoksilen–eozin

İ.P.: İntraperitoneal enjeksiyon

LH: Lüteinleştirici hormon

LPO: Lipit peroksidasyonu

MDA: Malondialdehit

MİM: Mülleryan inhibitör madde

MTX: Metotreksat

MPO: Myeloperoksidaz

8FH2Glun: Dihidrofolatpoliglutamat

N5-formiltetrahidrofolat: Folinik asid

NO: Nitrik oksit

ONOO: Peroksit nitrit

PMNL: Polimorfonükleer lökositler

RA: Romatoid artrit

ROP: Reaktif oksijen partikülleri

ROS: Reaktif oksijen süpürücüler

SAM: S-adenozil metionin

SRY: Sex determining region Y

TBA: Tiyobarbitürik asit

TdT: Terminal deoxynucleotidy transferase

TNF-α: Tümör nekrozis faktör-alfa

TUNEL: Terminal dUTP nick end labelling

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Erkek üreme sistemi 1
Çizim 1.2. Testisin anatomik yapısı. 2
Çizim 1.3. Yolk kesesi duvarında oluşan primordial germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo. 4
Çizim 1.4. Seminifer tübül epiteli 8
Çizim 1.5. Olgun spermatozoon 12
Çizim 1.6. Germ hücrelerinin geçirdiği evreleri gösteren çizim 15
Çizim 1.7. Spermiyogenezin aşamaları 16
Çizim 1.8. Metotreksatın kimyasal yapısı 24
Çizim 1.9. Folik asitin kimyasal yapısı 24
Çizim 1.10. Dihidrofolatın molekül yapısı 25
Çizim 1.11. Folik asitin tetrahidrofolata (FH4)'e dönüşümü 25
Çizim 1.12. Erkek infertilitesine neden olan oksidatif stres faktörleri ve etki basamakları 30
Çizim 1.13. *Apocynum cannabinum* 34
Çizim 1.14. *Picrorhiza currua*……35
Çizim 1.15. Aposinin'in aktif dimerizasyonunun oluşumu 35
Çizim 1.16. Aposinin'in NOX inhibisyonu mekanizması 35
Çizim 4.1. Sıçanların Metotreksat verilmeden önceki vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması 45
Çizim 4.2. Sıçanların deney sonu vücut ağırlıklarının deney gruplarına göre karşılaştırılması 46
Çizim 4.3. Metotreksat uygulanmadan önceki ve deney sonu vücut ağırlıkları arasındaki farkların gruplara göre karşılaştırılması (gram) 47
Çizim 4.4. Sıçanların sağ testis ağırlıklarının deney gruplarına göre karşılaştırılması. 48
Çizim 4.5. Doku MDA düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması 50
Çizim 4.6. Serum MDA düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması 50
Çizim 4.7. GSH düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması 51
Çizim 4.8. Testosteron düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması 53
Çizim 4.9. Doku MPO düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması 55
Çizim 4.10. Serum MPO düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması 55
Çizim 4.11. Kontrol grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. 58

Çizim 4.12. DMSO grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. 58
Çizim 4.13. Metotreksat grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. 59
Çizim 4.14. Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. 59
Çizim 4.15. Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. 60
Çizim 4.16. Tunel boyaması ile boyanmış testis dokusu kesitlerinin mikrofotografileri. .. 61
Çizim 4.17. Tunel boyaması ile boyanmış testis dokusu kesitlerinin mikrofotografileri. .. 62

ÇİZELGELER DİZİNİ

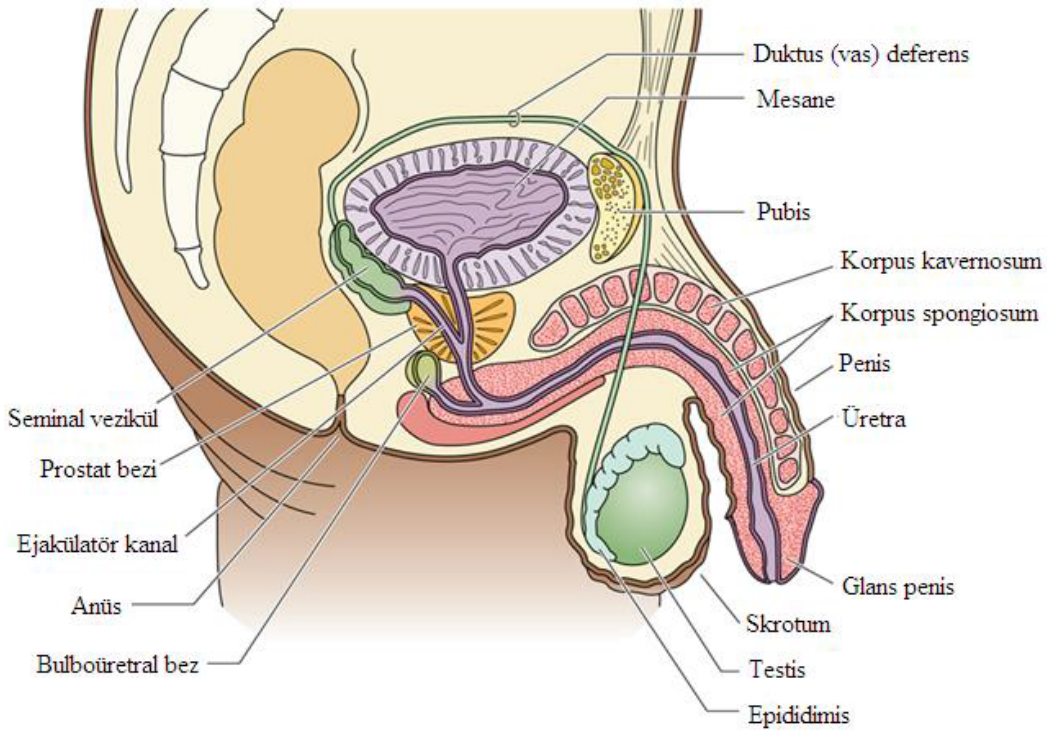
Çizelge 1. 1.Testise ait tabakalar 2
Çizelge 1.2. Antimetabolit ilaçlar 23
Çizelge 1.3. Antioksidan sistemleri 32
Çizelge 1.4. Antioksidanların işlevleri 32
Çizelge 3.1. Histolojik takip serileri 42
Çizelge 4.1. Gruplara göre deney öncesi vücut ağırlıkları farkları (gram) 45
Çizelge 4.2. Sıçanların gruplarına göre deney sonu vücut ağırlıkları (gram) 46
Çizelge 4.3. Sıçanların gruplarına göre sağ testis ağırlıkları (gram) 47
Çizelge 4.4. Sıçanların gruplarına göre doku MDA ve serum MDA değerleri 49
Çizelge 4.5. Sıçanların gruplarına göre GSH değerleri 51
Çizelge 4.6. Sıçanların gruplarına göre testosteron değerleri 52
Çizelge 4.7. Sıçanların gruplarına göre doku MPO ve serum MPO değerleri 54
Çizelge 4.8. Gruplara göre apoptotik indeks 61

1.GİRİŞ

1.1. TESTİS

1.1.1. Testis Anatomisi

Testisler abdominal kavite dışında skrotum içinde oblik pozisyonda yer alan ovoid şekilli bir çift organ olup spermatik kordona asılıdırlar. İnsanlarda testis uzunluğu yaklaşık 4-5 cm, eni ise 2,5 cm ve ağırlığı da 20-30 gr civarındadır. Büyüklükleri yaklaşık olarak aynı olsa da sola göre sağ testis % 10 kadar daha ağır ve genellikle 1 cm daha aşağıda bulunmaktadır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4ºC daha düşüktür. Kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotumun iç yüzü skrotal septum (septum scrotum) ile iki ayrı bölüme ayrılır (Çizim 1.1) (Arıncı ve Elhan 2006, Dere 1999, Moore ve diğ. 2013). Testisler, hipofiz bezinin anterior bölgesinden salınan lüteinleştirici hormon (LH) ve folükül uyarıcı hormon (FSH) tarafından uyarılarak testosteron hormonu üretimini gerçekleştirir (Sierens ve diğ. 2005). Aynı zamanda erkek üreme hücresi olan sperm üretiminden sorumludurlar (Sancak ve Cumhur 2002, Şimşek 1992).



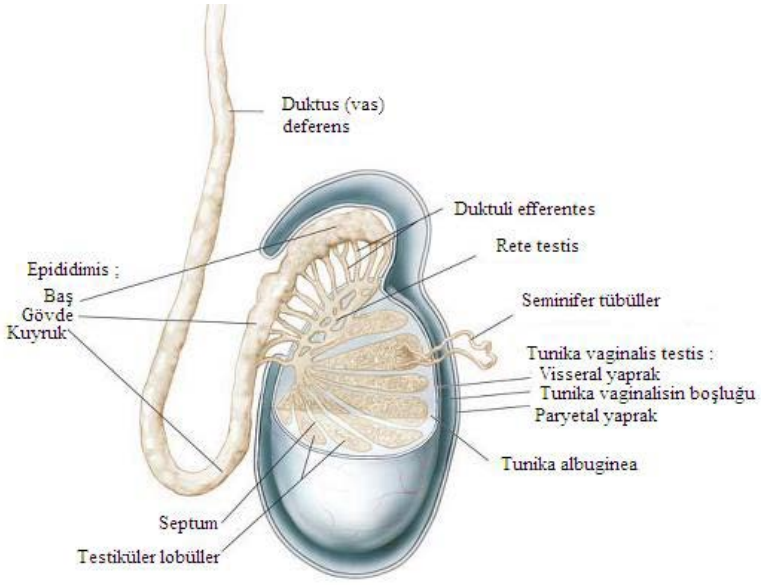
Çizim 1.1. Erkek üreme sistemi (Gartner ve Hiatt 2003)

Testislerin fasya medialis ve fasya lateralis adı verilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen iki kenarı, ekstremitas superior ve ekstremitas inferior adı verilen iki ucu bulunmaktadır. Testislerin ön kenarı her iki yüzü ve uçları visseral periton (epiorchium) ile örtülüdür. Periton, arka kenarın sadece yan kısmını örtmektedir. Testislerin arka kenarının dış kısmı boyunca epididimis yer alır. Spermatik kordon epididimisin medyalinde margo posterior'da bulunur (Arıncı ve Elhan 2006, Dere 1999, Şimşek 1992).

Testisler fetal hayatta karın boşluğu içinde, fasya transversalis ve periton arasında gelişir. Fakat doğumdan önce kanalis inguinalis'ten skrotum içine geçiş yapar. Karın ön duvarı tabakalarına da uzantıları olan tabakalar yer alır (Aktümsek 2006, Arıncı ve Elhan 2006). Bu tabakalar şunlardır:

Çizelge 1. 1. Testise ait tabakalar (Aktümsek 2006)

Skrotum	Deri
	Tunica dartos
Fascia spermatica externa	
Fascia kremasterika	
Fascia spermatica interna	
Tunica vaginalis testis	



Çizim 1. 2.Testisin anatomik yapısı (Sternberg 1997).

Testis dıştan içe; tunika vaginalis' in lamina visceralis' i (epiorchium), tunika albuginea ve tunika vaskuloza olarak üç tabaka ile sarılıdır (Çizim 1.2) (Arıncı ve Elhan 2006, Sancak ve Cumhur 2002).

Canalis inguinalis karın boşluğundan skrotum içine geçiş yoludur. Fetal hayatta testisten skrotumun iç yüzüne uzanan ve gubernaculum testis adı verilen fibröz bir yapı ile karakterize edilir. Fetal gelişimin daha ileriki dönemlerinde peritonun parmak şeklinde bir çıkıntısı olan processus vaginalis oluşur ve gubernaculum testis'i izleyerek karın ön duvarından geçer, testisin skrotuma inişine öncülük eder. Processus vaginalis bu geçiş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürükler ve doğumdan kısa bir süre sona kapanır. Bu nedenle testisin etrafında processus vaginalis'in kalıntısı olan bir tabaka kalır. Bu tabakaya tunika vaginalis testis adı verilir (Aktümsek 2006, Arıncı ve Elhan 2006, Şimşek 1992).

Tunika vaginalisin lamina iki yaprağı vardır. Bunlar; lamina visceralis (epiorchium) ve lamina parietalisdir (periorchium) . Lamina visceralis, sadece testisin ön kenarını ve iki yüzünü örter; arka kenarın medyali ve lateral taraflarında ise kendi üstüne kıvrılarak lamina parietalis ile devam eder. Lamina parietalis ise testisin alt kısmından üst kısmına doğru, funiculus spermaticus'un ön ve iç tarafını da kaplayacak şekilde, bir miktar yukarıya doğru uzanır. Lamina parietalis ve lamina visceralis'in arasında potansiyel bir boşluk ve bu boşluk içinde de eser miktarda seröz bir sıvı bulunur (Dere 1999, Moore ve diğ. 2013, Şimşek 1992). Sinus vaginalis'teki az miktardaki sıvı parietal ve visseral yaprakları birbirinden ayırarak testisin skrotum içinde serbestçe hareketini sağlar (Aktümsek 2006, Arıncı ve Elhan 2006).

Tunika albuginea, testisleri örten kalın, fibröz bir tabakadır. Elastikiyeti ve genişleme özelliği yoktur. Arka kenardan testis içine doğru girer ve vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölmeye mediastinum testis adı verilir. Mediastinum testis, testis'in ekstremitas superior'undan ekstermitas inferior yakınına kadar uzanır. Mediastinum testis'in ön ve yan kısmından çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Bu uzantılar, testis parankiminden geçerek tunika albuginea'nın iç yüzüne ulaşır ve böylece testisi koni biçiminde lobüllere böler (lobuli testis). Testis parankimini lobuli testis içinde bulunan ve kıvrımlı şeklinden dolayı tubuli seminiferi contorti adı verilen kanalcıklar oluşturur. Her bir testis kanalcığı, mediastinum testis yakınında tubuli seminiferi recti adı verilen düz bir kanalcıkla uzanır. Bütün lobüllerden gelen bu kanalcıklar mediastinum'a sokulur ve burada rete testis denilen ağı oluşturur. Lobuli testislerde yapılan spermiumlar rete testis'ten ductuli efferentes testis adı verilen kanallar aracılığı ile epididimise gelir (Aktümsek 2006,

Arıncı ve Elhan 2006, Moore ve diğ. 2013, Sancak ve Cumhur 2002, Şimşek 1992). Spermler, kısa düz borucuklar ile (tubuli seminiferi recti) rete testis'e bağlanan tubuli seminiferi contorti'lerde oluşur (Arıncı ve Elhan 2006).

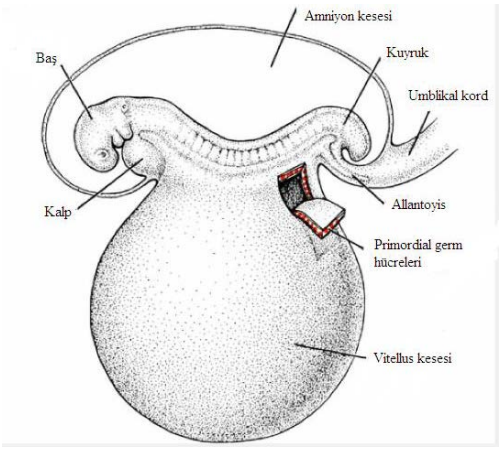
Tunika vasküloza, testisin damar ağından oluşur. Tunika albuginea'nın iç yüzünü örten tabakadır. Bu tabaka tunika albuginea'nın uzantısı olan septula testislerin iç yüzeyini kapladığı için lobuli testis'lerin de etrafında bir tabaka oluşturur (Moore ve diğ. 2013).

Testis ve epididimis, aortanın dalı olan arteria testikülarislerden beslenir. Testis ve epididimisin venleri, önce funiculus spermaticus saran bir ağ şeklinde pleksus pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena testikülarisi oluştururlar. Bunlar da sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya açılır (Sancak ve Cumhur 2002).

1.1.2.Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, sperm çeşidi ile döllenme sırasında belirlenmiştir. Ancak morfolojik özellikler, embriyo döneminin 7. haftasına kadar gelişim göstermez. Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer. Bu yüzden genital sistemin bu aşaması "seksüel gelişimin farklanmamış safhası" olarak adlandırılır. Gonadlar da "farklanmamış gonadlar" olarak isimlendirilir (Ata 2009; Junqueira ve Carneiro 2009).
Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alır (Çizim 1.3). Bunlar;

- Karın arka duvarını döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri (Junqueira ve Carneiro 2009)



Çizim 1.3. Yolk kesesi duvarında oluşan primordial germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo (Sadler 2004).

Primordial germ hücreleri büyük yuvarlak şekilli hücreler olup 4. hafta başında vitellüs kesesi duvarında, allantoyisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında, vitelllus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olması ile, primordial germ hücreleri de arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler (Çizim 1.3). 6. hafta sırasında primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar (Burukoğlu ve Bayçu 2008, Junqueira ve Carneiro 2009).

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medyalinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin altındaki mezenşimin çoğalması ile mezonefrozun mediyalinde bir kabarıklık (gonadal kabartı) oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları bırakarak geriler, dejenere olur (Junqueira ve Carneiro 2009, Maskar 1969, Şahintürk ve diğ. 2007).

Embriyo genetik olarak erkekse, primordial germ hücrelerinin cinsiyet kromozom seti XY'dir. Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY (sex determining region Y) geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medüller kordonları oluşturmak üzere, çoğalmaya devam eden germ hücreleri medullanın derinliklerine ilerler. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, ileri süreçlerde rete testis tübüllerini oluşturacak ince hücre sıralarından ibaret bir ağ şeklinde dağılırlar. Gelişimin ilerleyen evrelerinde testis kordonlarının yüzey epiteli ile olan ilişkileri tunika albuginea adlı yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesiyle sona erer (Bozdoğan 2012, Maskar 1969, Sadler 2004).

Gonadal sırtın orjinal mezenşiminden köken alan interstisyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklanmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Embriyo gelişiminin 8. haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Testislerde insan koryon gonadotropin (hCG) hormonu testosteron üretimini uyararak, testislerin cinsiyete bağlı genital kanal ve dış genital organların gelişimini yönlendirebilmesini sağlar (Sadler 2004, Şahintürk ve diğ. 2007).

Testosterona ek olarak, fetal testisler, glikoprotein yapıda bir hormon olan antimülleriyan hormon (AMH) veya mülleryan inhibitör madde (MİM) adı verilen bir

hormonu da salgılamaktadır. AMH, Sertoli hücreleri (destek hücreleri) tarafından salgılanır ve hormonun salınması ergenliğe kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, uterus ve tuba uterinalara farklılaşan, paramezonefroz kanallarının (Müller) gelişimini baskılar (Junqueira ve Carneiro 2009).

Dördüncü ayda, testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu at nalının uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken almış Sertoli destek hücrelerinden meydana gelmiştir (Maskar 1969, Sadler 2004).

Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüller haline gelirler. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur:

- Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişir.
- Primordial sperm hücreleri olan spermatogonialar, primordial germ hücrelerinden farklılaşırlar (Junqueira ve Carneiro 2009).

Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübülleriyle birleşir ve duktuli eferenslere girerler. Bu eferent duktuslar mezonefrik sistemin geride kalmış boşaltım tübülleridir. Duktus deferens olarak bilinen bu kanallar, rete testis ile mezonefrik veya Wolffian kanallarını birbirine bağlarlar (Sadler 2004).

Testisler, genellikle 26. haftada başlayan ve 2-3 gün devam eden, inguinal kanallardan geçerek skrotuma iniş süreci yaşamaktadırlar. Testisler, periton ve processus vaginalis dışından geçerler. Skrotuma girdikten sonra, inguinal kanal, spermatik kord etrafında kasılır. Doğumdan sonraki ilk üç ay içerisinde, inmemiş testislerin çoğu skrotuma iner. Testislerin skrotuma inişinde, fetal testislerce üretilen androjenler sayesinde kontrol edilmesinin yanında; fetal pelvisin genişlemesi, embriyonun boyutlarının uzaması, karın içi organların büyümesi ve karın içi basıncın artmasının rol oynadığı düşünülmektedir (Junqueira ve Carneiro 2009, Maskar 1969).

1.1.3.Testis Histolojisi

Testisler, epididimis ve vas deferensin başlangıç kısmı tunika vaginalis denilen mezotelyum boşluğu içine alan deriyle kaplı bir cep olan skrotal kese içinde yer alırlar (Abraham 2006). Embriyolojik gelişim sırasında karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle her bir testis kendisiyle birlikte peritonu, tunika vaginalis adı verilen seröz bir kese şeklinde skrotum içine sürükler. Her bir testisin anterior ve lateral

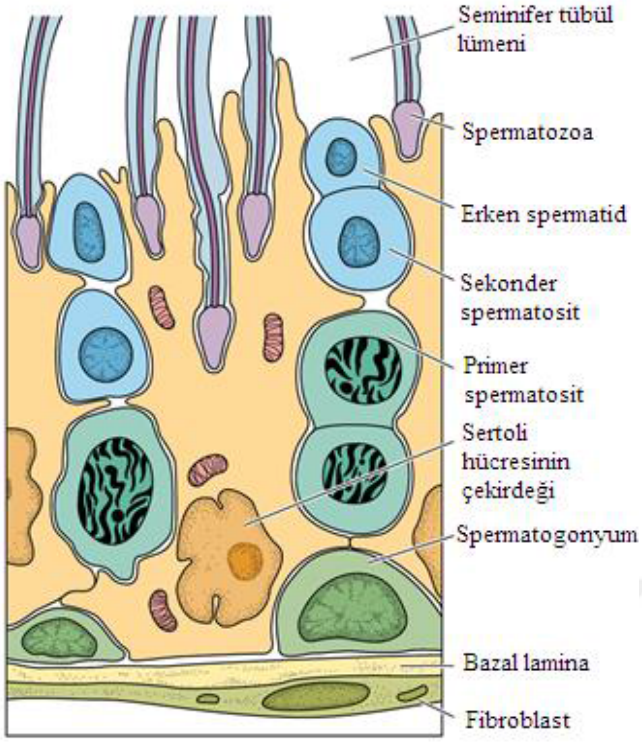
yüzeylerinin belirli bir kısmını kaplayan peritondan kökenlenmiş seröz kesedir. Dışta parietal, içte visseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarında tunika albugineayı örter (Gartner ve Hiatt 2016, Junqueira ve Carneiro 2009).

Testisler, tunika albuginea olarak isimlendirilen sıkı bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir (Ross ve Pawlina 2014). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi testis lopçukları denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Genellikle bu bölmeler birbiriyle bağlantılıdırlar. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül bulunur (Pan ve diğ. 1998). Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler, makrofajlar ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler testis androjenlerini salgılar (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014).

Kapsülün iç kısmı olan tunika vasküloza kan damarları içeren gevşek bir bağ dokusudur (Ross ve Pawlina 2014). Tunika vasküloza, tunika albugineanın testis içindeki uzantılarının iç yüzeyini örter ve bütün tübülleri dıştan sarar (Gartner ve Hiatt 2007).

1.1.3.1.Seminifer Tübüller

Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül; çapları yaklaşık 150-250 μm ve boyları 30-70 cm olan; iki ucu U şeklinde ve rete testise açılan tüplerdir (Gartner ve Hiatt 2016). Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eden kangallar şeklinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlar (Junqueira ve Carneiro 2009). Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağı bütünüdür (Abraham 2006). Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanmaktadır (Çizim 1.4) (Junqueira ve Carneiro 2009; Şahintürk 2000).



Çizim 1.4. Seminifer tübül epiteli (Gartner ve Hiatt 2003)

Seminifer tübüller fibröz bir bağ doku kılıfı, belirgin bir bazal membran ile karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal membrana yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri gösteren yassılaşmış miyoid hücreler içerir.

Seminifer tübüllerin arasındaki boşluğu kan damarları, lenfatik kanallar ile sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten hücre grupları olan interstisyel (Leydig) hücreleri doldurur (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009).

Seminifer epitelde iki tip hücre vardır: Sertoli (destek) hücreleri ve spermatogenez serisini oluşturan hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler). Spermatogenez serisinin hücreleri 4-8 tabaka halinde organize olmuştur; görevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatozoonların üretimi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (Junqueira ve Carneiro 2009, Gartner ve Hiatt 2016).

1.1.3.1.1. Miyoid Hücreleri

Miyoid hücreler hareketsiz spermlerin rete testise ilerlemesi için gerekli ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludurlar. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar (Abraham 2006).

Tunika propria fibroblast içeren çok katlı bir bağ dokusudur, peritübüler doku olarak da adlandırılır. Seminifer tübül etrafını çevreleyen 3-5 kat miyoid hücre ve kollajen fibril katmanından oluşmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Bazı hayvanlarda miyoid hücreler ultrastrüktürel olarak incelendiğinde, sitoplazmalarında çok sayıda aktin filamentleri ve bazal membrana sahip olmaları yönüyle düz kas hücrelerine benzedikleri gösterilmiştir. Fibroblastlarında düz endoplazmik retikulum içermeleri sayesinde kollajen sentezinde görev almaktadırlar (Gartner ve Hiatt 2016, Ross ve Pawlina 2014).

Spermatozoon ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden duktus epididimise ulaşması miyoid hücrelerin ritmik kasılma hareketi ve peristaltik hareketin sağlanması sonucunda gerçekleşir. Miyoid tabakanın en dışında kan damarları, yaygın lenf damarları ve Leydig hücreleri bulunmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

1.1.3.1.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri; spermatogenez serisindeki hücreleri saran, bazal membrandan seminifer tübül lümenine doğru uzanan, uzun ve piramidal hücrelerdir. Destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmektedir. Tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreleri olarak görev alırlar (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014).

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipidir. Puberteden sonra postmitotiktir. Seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatojenik hücre populasyonu düştüğünde, Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez (Abraham 2006).

Işık mikroskobunda, gelişmekte olan spermatojenik hücrelere kriptalar sağlayarak ev sahipliği yapmak için çok sayıda yan uzantı bulundurması nedeniyle, Sertoli hücresinin sınırları iyi belirlenemez. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin genişlemiş düz endoplazmik retikulum ve dar granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondriyon, lizozomlar ve lipid damlacıkları ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin mikrotübüller) içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde

olan çekirdeğinde çok sayıda girinti, belirgin çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin bulunur (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014).

Bazolateral bölgelerinde, Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleri ile okludens bağlantıları oluştururlar. Bu bağlantılar; seminifer epiteli bir bazal ve adluminal kompartmana böler ve gelişmekte olan spermatojenik hücreleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyeri olarak da adlandırılan elemanları belirlerler (Abraham 2006). Sertoli hücrelerinin şu fonksiyonları vardır;

- Gelişmekte olan spermatojenik hücrelerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi,
- Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidüel (artık) cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarının fagositoz ile elimine edilmesi,
- Olgun spermatidlerin aktin-aracılı kasılmalarla, spermiyasyon denilen bir süreç, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırılması,
- Gelişmekte olan spermatositlerin ve spermatidlerin otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyeri olarak da adlandırılan bazolateral (alt yan yüz) bağlantılar ile kandaki zararlı maddelere karşı korunması,
- Seminifer tübül lümenine genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınması için kullanılan bir sıvı salgılanması,
- AMH üretimi sayesinde erkek fetüste Müller kanallarının gerilemesinin sağlanması,
- Seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen-bağlayıcı proteinin (ABP) salgılanması,
- İnhibin ve aktivin altünitelerini (α ve β alt üniteleri) salgılayarak hipotalamus ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH salınımı üzerine negatif ve pozitif feedback (geri etkili) bir etki gösterilmesi,
- Üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılan testiküler transferinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alınması (Abraham 2006, Bloom ve Fawcett 1994, Gartner ve Hiatt 2016, Junqueira ve Carneiro 2009).

1.1.3.1.3. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal membran ile direkt ilişkide olan yaklaşık 12 μm çapında diploid spermatojenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkayıcı bağlantıların altında yer alır. Bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar.

Spermatogonyumlar; spermatogonyal kök hücreden köken alır ve puberte çağında mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir: A tipi spermatogonyumlar olarak da isimlendirilen kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir. Yüksek mitotik aktivite gösterirler, ya aynı tipte daha fazla hücre ya da tip B spermatogonyumları oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Mitoza girerek primer spermatozoayı oluştururlar (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2016, Ross ve Pawlina 2014).

Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücreler olduğu için radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler ise kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdırlar (Abraham 2006, Şahintürk 2000).

1.1.3.1.4.Primer ve Sekonder Spermatositler

Başarılı mitotik bölünmeler geçirdikten sonra, tip B spermatogonyumlar, son S fazını (DNA sentezi) tamamlayarak mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Spermatojenik hücrelerin yaşam süresindeki esas DNA sentez aktivitesinin bu son turu, mayozun profaz I aşamasına başlayan bir primer spermatositin spermatogonyuma göre iki kat DNA miktarına sahip olacağını belirler. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) ve 4N DNA (N haploid kromozom sayısını [insanlarda 23 kromozom] ya da bu kromozom takımındaki DNA miktarını gösterir) içerir (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009). Spermatositler iki başarılı mayotik hücre bölünmesi geçirirler ve Sertoli hücreleri arasındaki tıkayıcı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Dolayısıyla, mayoz bölünmenler kan-testis bariyeri içinde gerçekleşir (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2016).

Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye gider. Primer spermatositler spermatojenik serinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde, sarmalanma sürecinin değişik aşamalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar. Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan

ikinci mayoz bölünmeye giderler. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. Her bir sekonder spermatosit artık herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm şeklinde olgunlaşan iki adet haploid spermatid meydana getirir. Döllenmeyle bunlar diploid sayıya dönerler (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014, Sternberg 1997).

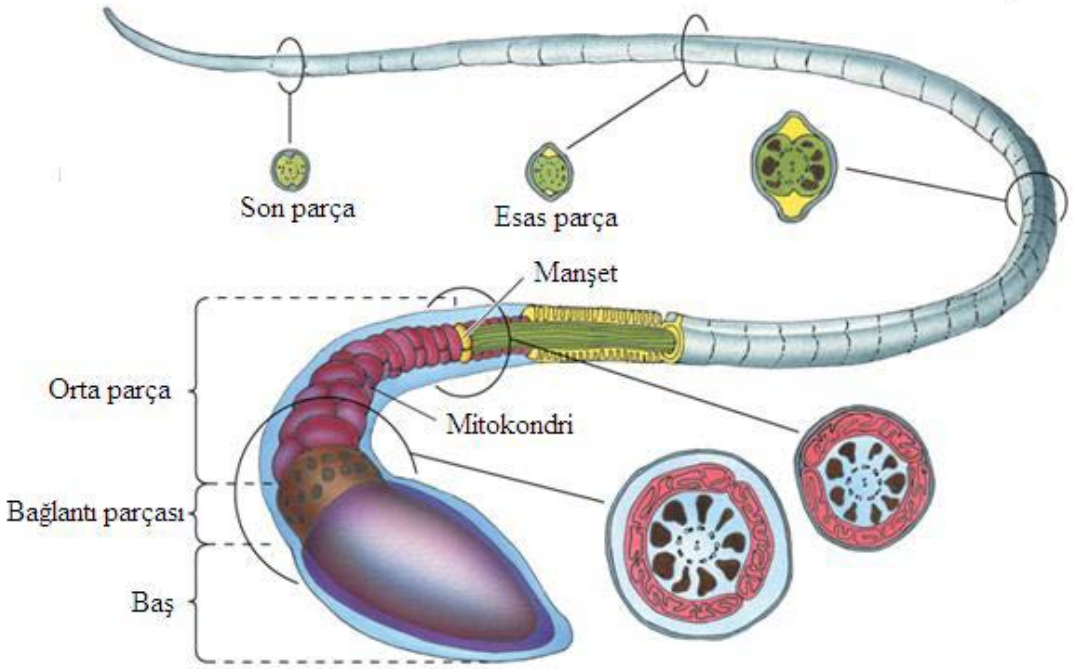
1.1.3.1.5. Erken ve Geç Dönem Spermatidler

Haploid spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda yerleşen, Sertoli hücre sitoplazma kriptaları içinde gömülü, küçük boyutları (7-8 µm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilebilir hücrelerdir (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

Spermatidin sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyumlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum tübüllerini içerir. (Junqueira ve Carneiro 2009).

1.1.3.1.6. Spermatozoon (Olgun Spermatozoa)

Olgun bir insan spermatozoonu yaklaşık 60 µm uzunlukta olup; baş ve kuyruktan oluşur (Çizim 1.5) (Bloom ve Fawcett 2002).



Çizim 1. 5. Olgun spermatozoon (Gartner ve Hiatt 2003)

Baş: Yaklaşık 4.5-5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. Spermatozoanın baş kısmı yassıdır, 23 kromozomlu homojen bir nukleusa sahiptir (Gartner ve Hiatt 2016). Çekirdek başın büyük kısmını oluşturur ve 2/3'lük ön kısmı hidrolitik enzimleri içeren akrozomla örtülüdür. Akrozomal enzimler, oositi saran korona radiyata ve zona pellusida'ya spermatozoon girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır (Sternberg 1997).

Kuyruk: Sperm kuyruğu; bağlantı (boyun) parçası, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan oluşur. Bağlantı (boyun) parçası yaklaşık 5 µm uzunluğunda, çekirdeğe tutunmuş proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolü bulunduran dar bir parçadır. Boyun sentriyolleri ve kuyruğun geri kalan kısmının dokuz adet dış yoğun fibriller ile tutunmuş bağlantı parçasını içerir. Orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğunda olup spermatozoonun dairesel düzenlenmiş mitokondriyonunu içeren kuyruk bölümüdür. Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır ve yaklaşık 45 µm uzunluğundadır. Dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve fibröz bir kılıftan oluşur. Son parça yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanması nedeniyle sadece aksonemi kapsar ve kuyruğun en kısa parçasıdır (Bloom ve Fawcett 2002, Gartner ve Hiatt 2016, Sternberg 1997).

1.1.3.2. İnterstisyel Alan

1.1.3.2.1. İnterstisyel Bağ Dokusu

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kapillerler ve lenf damarları ile doludur. Bağ dokusu değişik tipte hücreler (fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar) içerir. Ergenlikte, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleri de fonksiyonel olarak belirgin hale gelir (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

1.1.3.2.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücre toplulukları, kan damarları ve lenfatik kanal veya sinozoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir. Yuvarlak ya da çokgen şekilli, çekirdeği merkezde ve küçük lipid damlacıklarından zengin, tübüler kristalı mitokondriyumlar ve iyi gelişmiş bir düz endoplazmik retikulumu içeren, eozinofilik sitoplazması bulunan bir hücredir. Bazıları, henüz kesin yapısı bilinmeyen sarı-kahverengi bir pigment olan lipokrom pigmenti içerir. Sitoplazmalarında insana özgü, özellikle elektron, bazen de ışık

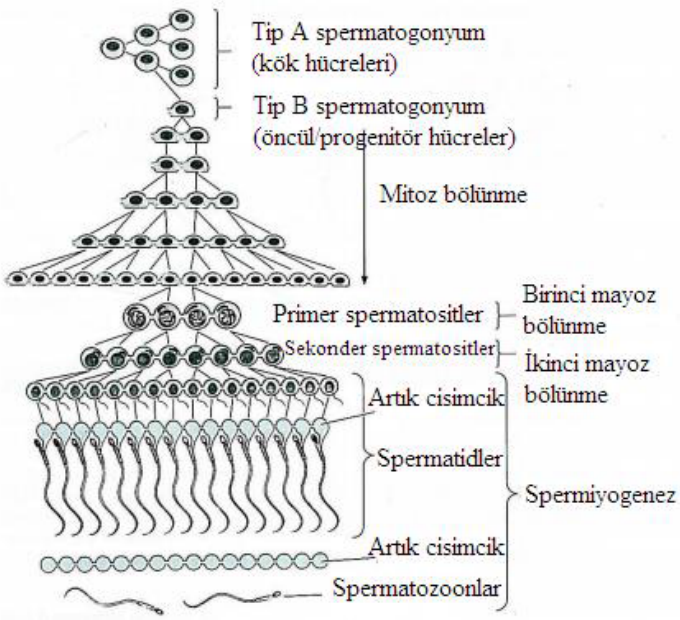
mikroskobunda belirgin olarak görülen ve henüz fonksiyonları bilinmeyen renksiz Reinke kristalleri bulunur (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2016, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2006).

Bu hücreler, mitokondriada ve düz endoplazmik retikulumlarında bulunan enzimler tarafından erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Spermatogenez, embriyonal ve fetal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması ve gonadotropin salgısının kontrolü açısından testosteron önemlidir. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık % 95'i Leydig hücreleri tarafından sentezlenir, kalan testosteron adrenal korteks tarafından üretilir. Ergenlikte ve erişkinde vücuttaki çoğu organ ve dokuda etki gösterir (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).

İnterstisyel hücrelerin hem fonksiyonları ve hem de sayıları hormonal uyarılara bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, anne kanından fetüse geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testis interstisyel hücreleri uyarır. Bu hormonların varlığı, erkek genital organlarının embriyonik farklılaşması için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4. ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar ve sonra testosteron sentezinde bir azalmayla birlikte gerilerler. Daha sonra gebeliğin geri kalanı boyunca ve hipofizden salgılanan luteinizan hormon (LH) uyarısı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (Junqueira ve Carneiro 2009, Sternberg 1997).

1.1.3.3. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan olgun sperme dönüşme aşamasındaki bir süreci kapsamaktadır (Çizim 1.6) . Puberteden kısa bir süre önce, hipofizden salınan gonadotropinler sayesinde başlar ve hayat boyu devam eder (Sternberg 1997).



Çizim 1.6. Germ hücrelerinin geçirdiği evreleri gösteren çizim (Junqueira ve Carneiro 2009)

Spermatogenez süreci üç bölümde incelenmektedir:

1) Spermatositogenez

2) Mayoz

3) Spermiyogenez (Sternberg 1997)

1.1.3.3.1. Spermatositogenez

Spermatogonyumların mitozla çoğalarak ve primer spermatosite farklılaşmasıdır. Bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar olarak devam ederler ya da mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Sertoli bariyerinden geçen her bir tip B spermatogonyum büyüyerek, daha büyük yuvarlak hücreler olan primer spermatosit halini alır. Primer spermatositler, birinci mayozun profazına girerler (Gartner ve Hiatt 2016, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014, Şahintürk ve Erçakır 1999).

1.1.3.3.2. Mayoz Bölünme

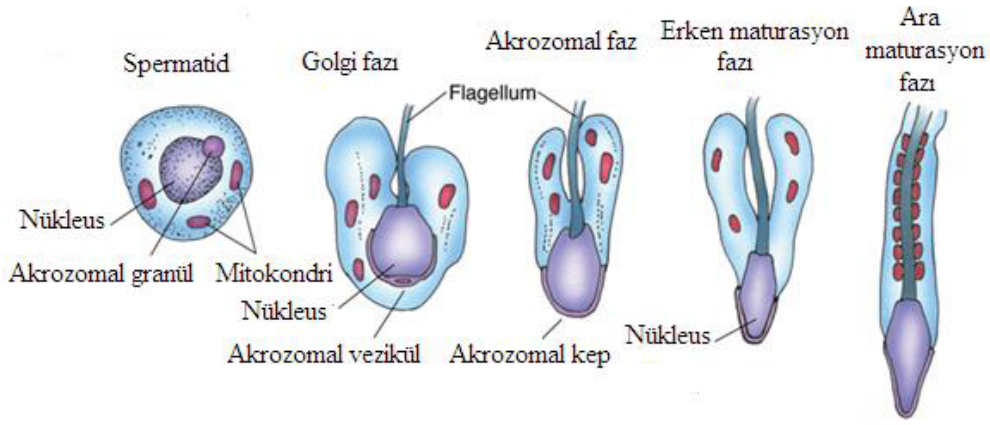
Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye gider. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan ikinci mayoz bölünmeye giderler. Her bir sekonder spermatosit herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm şeklinde gelişen iki adet spermatid meydana getirir (Abraham 2006).

Birinci mayoz bölünmenin sonunda, primer spermatositin 4N DNA miktarı sekonder spermatositte 2N'ye düşer. İkinci mayoz bölünmenin sonunda 2N DNA miktarı 1N'ye düşer. Meydana gelen spermatidler haploid spermatidlerdir ve spermiyogenez denilen bir farklılaşma sürecini başlatırlar.

Birinci mayoz bölünmenin profazında eşleşmiş homolog kromozomlar ayrılırken, ikinci mayotik bölünme sırasında interfaz safhasının S aşamasında DNA miktarı iki katına çıkarılmaması sebebi sırası ile; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarından sonra kardeş kromatidler yavru hücreler olan haploid spermatidlere dağılırlar (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2016, Ross ve Pawlina 2014)

1.1.3.3.3.3. Spermiyogenez

Haploid spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanında yerleşmişlerdir. Sertoli hücre sitoplazma kriptaları içinde gömülüdürler. Spermiyogenez spermatidlerin hücre bölünmesi gerçekleşmeden spermatozoona dönüştüğü süreç olup spermatogenezin son aşamasıdır (Çizim 1.7) (Abraham 2006, Junqueira ve Carneiro 2009).



Çizim 1.7. Spermiyogenezin aşamaları (Gartner ve Hiatt 2003)

Spermatidler, küçük boyutları (7-8 μm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilebilirler. Spermatidlerin sitoplazmasında mitokondriyumlar, bir sentriyol çifti, serbest ribozomlar ve granülsüz endoplazmik retikulumu bulunur. Çekirdeğinin hemen yanında ise Golgi kompleksi yer almaktadır (Gartner ve Hiatt 2007, Junqueira ve Carneiro 2009).

Spermiyogenez dört faza ayrılır (Abraham 2006, Gartner ve Hiatt 2016, Ross ve Pawlina 2014) :

1.1.3.3.3.1. Golgi Fazı

Proakrozomal granüller olarak adlandırılan PAS-pozitif küçük granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek akrozomun oluştuğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem komponentleri çevresine sarılır (Gartner ve Hiatt 2016, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014).

1.1.3.3.3.2. Başlık (Cap) Fazı

Bu fazda, akrozom vezikülü çekirdeğin ön yarısından fazlasını sarar. Bu yapı akrozomal kep olarak adlandırılır. Çekirdekteki yoğunlaşma devam ederken, çekirdek etrafını saran akrozomal kep kalınlaşır. (Gartner ve Hiatt 2016, Ross ve Pawlina 2014).

1.1.3.3.3.3. Akrozom Fazı

Akrozom hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri aktivitesi olan proteaz gibi bazı hidrolitik enzimleri içerdiği için lizozomun özelleşmiş tipi olduğu söylenebilir. Bu enzimlerin, yumurtayı çevreleyen korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Bu işlem akrozom reaksiyonu olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamaklarından biridir.

Bu fazda spermatid kendisini yeniden düzenleyerek başını Sertoli hücresine doğru gömülü bir biçimde tutar. Gelişmekte olan kamçı seminifer tübül lümenine uzanır. Spermatidin yoğunlaşan çekirdeği yassılaşır ve uzar. Aynı zamanda akrozom hücre zarının ön kısmına hareket eder. Sitoplazmik mikrotübüller organize olarak silindir haline gelirler ve çekirdeği çevreleyen manşet meydana gelerek spermatidin arka kısmına doğru ilerlerler.

Sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur. Hücre zarı gelişen flagellumu da sarar. Mitokondriler de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça olarak isimlendirilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir (Gartner ve Hiatt 2016, Junqueira ve Carneiro 2009, Ross ve Pawlina 2014).

Çekirdekteki kromatin yoğunlaşır. Somatik histonlar arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirerek sperme özel histonlara dönüşür (Abraham 2006).

1.1.3.3.3.4. Olgunlaşma Fazı

Spermatid sitoplazmasında oluşan artık cisimler spermiyasyon aşamasında bırakılır ve Sertoli hücrelerince fagosite edilir. Sonuncu spermatid olgunlaşma evresi sırasında mitokondriyumlar gelişen flagellum (kamçı) boyunca dizilmelerini tamamlarlar. Flagellum keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrilidir. Aksonem eş merkezli 9+2 mikrotübül çiftinden oluşur. Çekirdek uzar yoğunlaşır ve manşetin kaudaline ilerler. Olgunlaşma işlemi, çekirdek son uzamış, yoğunlaşmış şeklini aldığında, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır (Bloom ve Fawcett 2002).

Spermatidler tübülün lümenine doğru hareket ederler. Sertoli hücreleri ile aralarındaki sitoplazmik köprüler varlığını sürdürmektedir. Seminifer epitelde belirli spermatojenik hücreler sadece diğer belirli spermatojenik hücrelerle bağlantılıdırlar.
Seminifer tübül şeritinde farklı hücre gruplarının bir serisi bir döngü tamamlanıncaya kadar devam eder. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur (Junqueira ve Carneiro 2009, Karaaslan 2009, Sternberg 1997).

1.1.4. Testisin Histofizyolojisi

Hormonlar, spermatogenez üzerinde en önemli uyarıcılardır. Bunlar (Ackermann 2006, Patton 1989, Şahintürk ve Erçakır 1999) :

1. Testosteron: Testisin interstisyel dokusunda yer alan Leydig hücreleri tarafından salgılanır. Spermatojenik hücrelerin büyümesi ve bölünmesi için gerekli ve ikincil cinsiyet karakterlerinin devam ettirilmesinden de sorumludur (Şahintürk ve Erçakır 1999).
2. Luteinizan hormon (LH) : Ön hipofizden salgılanır. Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgılatır. Hipofizden LH salgılanması negatif geri besleme ile düzenlenir. Testosteron sentezinin artmasıyla LH salınımı baskılanır ve tersine testosteron düşük ise LH salınımı artar (Patton 1989, Şahintürk ve Erçakır 1999).
3. Folikül stimülan hormon (FSH) : Ön hipofizden salgılanır. Sertoli hücrelerini, adenil siklaz yapımını ve döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) artışını uyarır. Ayrıca

Androjen bağlayıcı protein (ABP)' nin sentez ve salgılanmasını harekete geçirir. Daha sonra ABP testosterona bağlanarak bu hormonu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenez uyarılmış olur. Bu uyarı olmazsa spermatidlerin sperme dönüşmesi gerçekleşmez (Patton 1989, Şahintürk ve Erçakır 1999).

4. Östrojenler: FSH sonucunda uyarılan Sertoli hücresinde testosterondan yapılmaktadır (Ackermann 2006, Şahintürk ve Erçakır 1999).

5. Büyüme hormonu (GH) : Diğer hormonlar gibi testisin metabolik fonksiyonlarının kontrolü için gereklidir. GH spermatogonyumun erken bölünmesini destekler, yokluğunda ise spermatogenez durur ya da sekteye uğrar (Patton 1989, Şahintürk ve Erçakır 1999).

6. İnhibin ve Aktivin: Adenohipofizden FSH salgılanması inhibinler tarafından baskılanırken, aktivinler tarafından uyarılır (Patton 1989).

37ºC olan vücut sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda sıcaklık çok önemlidir. Testislerdeki sıcaklık yaklaşık 35ºC'dir ve bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz ağ olan pampiniform pleksus testis arterlerinin etrafını sararak testis sıcaklığının sürdürülmesini sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla sıcaklık değişimi yaparak sağlamaktadır. Diğer bir faktör ise, düşük sıcaklıklarda spermatik kordondaki kramester kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (Ackermann 2006, Patton 1989).

İnsanda günlük sperm üretimi testis başına 94.6 milyon olarak hesaplanmıştır. Spermler, dişi üreme yollarında normalde mevcut olan sıvı akıntısına karşı hareket etme yeteneğine sahip olmasına pozitif reotaksis, dişi üreme yollarında bazı kimyasal maddeler tarafından ise kendisine doğru çekilmesine pozitif kemotaksis denir (Patton 1989, Şahintürk ve Erçakır 1999).

1.1.4.1.Kan-Testis Bariyeri

İnsanlar da dâhil pek çok türde, Sertoli hücreleri arasında oluşturulmuş sıkı bağlantı birimlerinden kan ve lenfatik yolla gelen maddelerin seminifer tübüller içerisine geçisini kontrol eder. Puberte öncesi insan testisinde, komşu Sertoli hücrelerinin karşılıklı gelen membranları arasında sadece birbirine geçmiş parmaksı uzantılar görülür. Pubertenin başlamasıyla birlikte bunlar işlevsellik kazanırlar. Bu bariyerin oluşması ise, Sertoli hücrelerinin bölünmeyen hücre konumuna geçmesi ve spermatogenezisin başlaması ile eş zamanlı olarak gerçekleşir. Kan-testis bariyeri; haploid erkek gamet için immünolojik bakımdan korunmuş bir bölgenin yaratılmasını, Sertoli hücreleri arasında bağlantıların sürdürülmesini ve yüksek seçicilikte geçirgenliği sayesinde germ hücre gelişimi için ideal mikro çevrenin sürdürülmesini sağlamaktadır (Borgen ve diğ. 1992).

1.2.KANSER VE KEMOTERAPİ

Kanser büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımıdır. Somatik genetik hastalıkların en yaygın ve en komplike olanıdır (Futreal ve diğ. 2001).

Dünyada en çok ölüm nedeni olan hastalıklardan biri kanserdir ve hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü regüle eden genlerde bozukluk sonucu ortaya çıkar (Olah 2005).

Kanser, hem çevresel hem de kalıtsal etkenlerin oluşturduğu değişiklerden kaynaklıdır ve hücrenin genetik materyalini ilgilendirdiği için, genetik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Mocan 2007).

Kanser hücrelerini karakterize eden özellikler tanımlanmıştır. Bunlar;

-Büyüme sinyalleri oluşturabilme,

-Büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlaşma,

-Programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçabilme,

-Sınırsız bölünme,

-Çoğalma potansiyeline sahip olma,

-Anjiogenezi sürekli destekleyebilme, invazyon ve metastaz yapabilme özellikleridir (Olah 2005).

Günümüzde kanser tedavilerinde yaygın olarak cerrahi, radyoterapi, immünoterapi ve kemoterapi kullanılmaktadır (Olgun ve Şimşek 2010).

Kemoterapi, hastanın normal hücrelerine zarar vermeden özellikle kontrolsüz çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya yok etmek amacını taşır (Akyol 2004).

Kemoterapotik ajanlar en fazla hücreler proliferatif dönemde iken etkilidirler. Çoğu kemoterapotik ilaç kanserli hücrelerin normal hücrelere göre hızlı büyümesi ve çoğalmasını yok edilmesi şeklinde geliştirilmiştir. Ancak bazı normal hücrelerde de benzer özellikler bulunmaktadır. Normal hücreler de kemoterapiyle doğrudan etkilenmekte ve yan etkileri de meydana gelmektedir. Bu yan etkiler daha çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl folikülleri ve spermler gibi hızlı bölünebilen hücreler üzerinden olmaktadır. Bu etkilerin dışında bazı kemoterapotikler kalp, böbrekler, mesane, akciğerler ve sinir sistemi organları gibi hayati organlar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (Akyol 2004, Yeter 2006).

Kemoterapotikler normal doku ve hücrelerde farklı seviyelerde yan etkilere sahip olduğu için erkek infertilitesi üzerinde meydana getirdiği olumsuz faktörlerdendir. Spermatogenezdeki aksaklıklar, sperm kalite parametrelerindeki bozukluklar, ejakülasyon

bozukluğu, hipotalamus-hipofiz-gonad eksenindeki fonksiyon bozukluğu, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi olumsuz durumlar kemoterapotiklerin üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler arasında gösterilmektedir. Testisteki Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen kemoterapotiklere dirençli iken, germinal epitel bu ilaçlara duyarlıdır. Ancak kullanılan kemoterapi protokolünün ilaç sayısı, dozları ve uygulama sürelerine bağlı olmakla birlikte, germinal epiteldeki kök hücrelerin sağlam kalmasıyla beraber, tedavinin sonlandırılmasından belli bir zaman periyodunda spermatogenez geriye dönebilmektedir (Ragheb ve Sabanegh 2010, Sabanegh ve Ragheb 2009, Trottmann ve diğ. 2007, Yeter 2006).

Kanserli insan ve hayvanlarda yapılan pek çok çalışmada hormon uygulamalarının, sperm ve testiküler doku kriyoprezervasyonunun, testiküler biyopsi aracılığıyla in vitro spermatogenezin, testis transplantasyonunun ve çeşitli antioksidan maddeleri bulunduran alternatif uygulamaların kemoterapiden önce ya da kemoterapi esnasında ilaçların erkek üreme sistemindeki yan etkilerinin azaltılması veya önlenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmaların pek çoğunda kemoterapotiklerin genellikle oksidatif stresle ilişkili veya ilişkisiz DNA hasarı oluşturma mekanizmasıyla erkek üreme sisteminde yan etkilere sebep olduğu, dolayısıyla da farklı yapıdaki birçok antioksidan maddenin koruyucu rollere sahip olduğu bildirilmektedir (Çeribaşı ve diğ. 2010, Meistrich 1999, Ragheb ve Sabanegh 2010, Schrader ve diğ. 2001, Tempest ve diğ. 2008).

1.2.1. Antineoplastik (Antikanser) İlaçları

Kemoterapotik ajanlar, kimyasal yapılarına ve hücredeki aktivitelerine göre; alkilleyiciler, antimetabolitler, sitotoksik antibiyotikler, alkoloidler, enzimler, kortikosteroidler (hormonlar ve hormon antagonistleri) olmak üzere etki mekanizmaları birbirinden tamamen çeşitli kategorilere ayrılırlar (Özalp 2008).

- Alkillleyici ajanlar ve ilgili bileşikler, DNA ile kovalent bağlar oluşturarak etki ederler ve böylece replikasyonu engellerler. Busulfan, Melphalan, Karmustin, Lomustin, Klorambusil, Karboplatin, Cisplatin, Dakarbazin, Siklofosfamid, Prokarbazin, İfosfamid, Nitrojen mustard alkilleyici ajanlar arasında yer alır.

-Antimetabolitler, DNA senteziyle ilgili bir veya daha fazla yolu bloke eder ve yıkarlar. Allopürinal, Fluorourasil, Metotreksat, 6-Merkaptopürin, Hidroksiürea, Floksüridin, Gemsitabin, Fludarabin, 6-Tioguanin, Pentostatin anti-metabolit ajanlar arasında yer alır.

-Sitotoksik antibiyotikler, memelilerde hücre bölünmesini engelleyen mikrobiyal kaynaklı maddelerdir. Bleomisin, Aktinomisin, Daktinomisin, Adriyamisin, Doksorubisin, Epirubicine, Daunorubicin, Mitomycin-c, Mitoxantrone, İdarubisin antibiyotik ajanlar arasında yer alır.

-Alkoloidler, bunların çoğu mikrotübül fonksiyonlarını ve bundan dolayı mitotik iğleri etkilerler. Etoposid, Teniposid, Vinkristin, Vinblastin, Vineralbin, Paklitaksel,
Doketaksel alkoloid ajanlar arasında yer alır.

-Enzimler, protein sentezini inhibe ederek lösemik hücre proliferasyonunu engeller. Lasparaginase bu grupta yer alan ajanlardandır.

-Kortikosteroidler, hormon sekresyonlarını baskılayan veya antagonist hormon etkisi gösteren ilaçlardır ve tümörün büyümesini geciktirici etkileri vardır. Prednisone,
Dexamethasone kortikosteroidler grubunda yer alan ajanlardır (Bilge 1981, Küçüksu ve Ruacan 1978, Özalp 2008, Sipahioğlu 1981).

Kemoterapotik ilaçlar oluşturduğu etkiye göre iki gruba ayrılırlar;

1- Hücre siklusuna bağımlı ilaçlar:

- S fazına dönük ilaçlar (Antimetabolitler): Hücre metabolizmasını ve DNA sentezini bozarak etki ederler. Methotrexate, 5Flourouracil, Cytarabine, Procarbazine, 6 Tyoguanin, 6 Mercaptopurine gibi.
- M fazına dönük ilaçlar (Bitki alkoloidleri): Ana hücreden iki yavru hücre oluşmasını engellerler. Vincristine, Vinblastine bu gruptandır.
- G2 fazına dönük ilaçlar (Antitümör antibiyotikler): RNA, DNA ve protein sentezini etkilerler. Bleomisin, Acytinomycin-D, Daunorubisin gibi.

2- Hücre siklusundan bağımsız ilaçlar:

- Alkilleyici ajanlar: Hücre çekirdeğini, DNA ve RNA sentezini etkilerler. Hızlı çoğalan hücrelerin ölümüne yol açarlar. Nitrojen mustard, Cisplatin, Cyclophashamide, Procarbazine gibi
- Hormonlar: Tümör ortamını değiştirerek büyüme ve çoğalmayı engellerler, protein sentezini bloke ederler. Estrojenler, Kortikosteroidler gibi.
- Antibiyotikler: DNA replikasyonunu bozarlar. Adriamisin gibi (Akyol 2004, Kantemir 1969, Özalp 2008).

1.2.2. Antimetabolitler

Antimetabolit ilaçlar, hücrenin normal metabolitleri ile yapısal ve kimyasal benzerlik gösterdiklerinden dolayı, enzimsel aktivitelerde benzerlik gösterdikleri metabolitlerin yerine geçer veya aynı rolü alarak metabolik aktiviteyi bloke eder ya da makromoleküllerin içine girerek, fonksiyonu olmayan bir makromolekül oluşuna yol açar (Çizelge 1.2) (Akyol 2004).

Çizelge 1.2. Antimetabolit ilaçlar

ANTİMETABOLİT İLAÇLAR		
FOLİK ASİT METABOLİTLERİ	PÜRİN ANTİMETABOLİTLERİ	PİRİMİDİN ANALOGLARI
Metotreksat	6-Merkaptopurin	5-Fluorourasil
Raltireksed	Tioguanin	Kapesitabin
Pemetreksed	Fludarabin	Sitozin
	Kladribin	Arabinozid
		Gemsitabin

Antimetabolit ilaçların etkinliklerini ya çeşitli enzimleri inhibe ederek (folik asit, pürin ve pirimidinlerin yapılmının engellenmesi) veya nükleosid ve nükleik asit komplekslerine katılıp fonksiyonlarını yerine getirmelerine engel olarak, DNA ve RNA sentezini önler. Antimetabolit ilaçlar döneme özgü ilaçlardır. Özellikle hücre döngüsünde "S" fazında (kemik iliği, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler gibi hızlı bölünen hücrelerde görülen çoğalma kapasitesi yüksek tümörlerde) etkilidirler. Bu gruptan bazıları kimyasal yapılarının farklı oluşundan dolayı (merkapto grubu, flor ihtiva etmeleri gibi) nükleosid ve nükleik asit birleşimlerine girmekte ve toksik etki göstermektedirler (Bilge 1981, Küçüksu ve Ruacan 1978).

Antimetabolit ilaçların başlıca kullanım alanları :

- Akut Lenfositik Lösemi
- Akut Melojenik Lösemi
- Göğüs Kanseri
- Lenfoma
- Osteosarkom

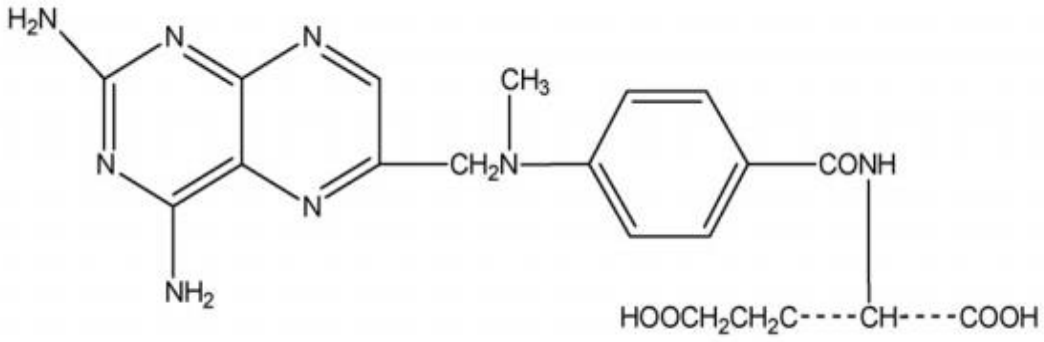
- Ewing’s Sarkomu
- Hodgkin ve Hodgkin Dışı Lenfoma
- Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
- Prostat Karsinoması
- Testiküler Karsinoma
- Wilms Tümörü (Aran 1974, Dökmeci 2007, Kantemir 1969)

1.3. METOTREKSAT

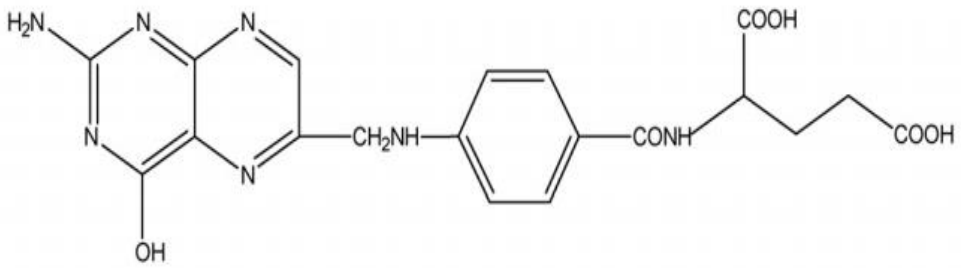
Bir folik asit antogonisti olan Metotreksat (Çizim 1.8), kemoterapik tedavilerde yaygın olarak kullanılan başlıca antimetabolitlerden olup; dihidrofolik asit (Çizim 1.10) analoğudur (Feagan ve Alfadhli 2004). İlk kez 1948 yılında çocukların lösemilerini tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır (Dökmeci 2007).

1.3.1. Metotreksatın Etki Mekanizması

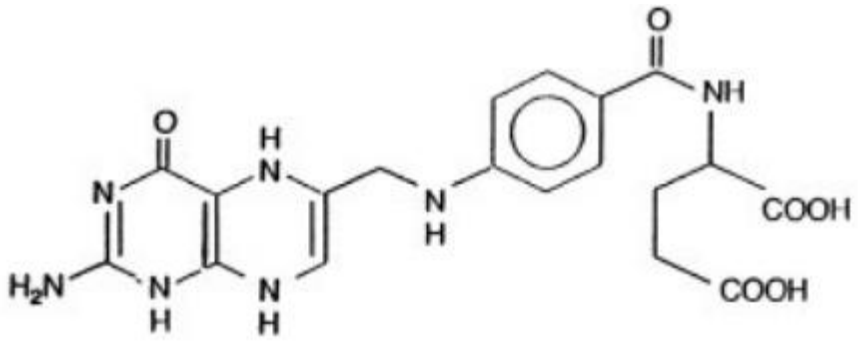
Bir folik asit antagonisti olarak bilinen Metotreksat (MTX), kimyasal olarak folik asidin (Çizim 1.9) 4-aminoN10-metil analoğu olup dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimi inhibitörüdür (Kayaalp 2012).



Çizim 1.8. Metotreksatın kimyasal yapısı (Padmanabhan ve diğ. 2009)

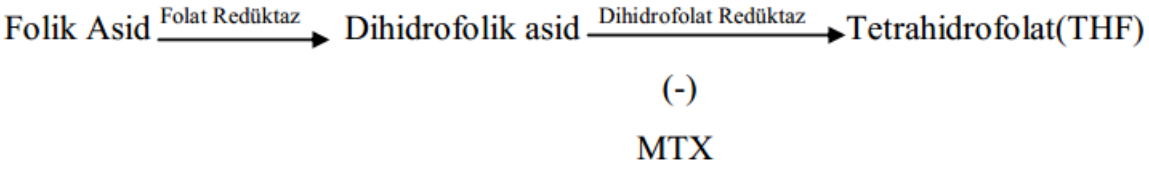


Çizim1.9. Folik asitin kimyasal yapısı (Padmanabhan ve diğ. 2009)



Çizim 1.10. Dihidrofolatın molekül yapısı (Uzar 2006)

Folik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimler, vitamin şeklinde besinler içinde alınan folik asidin vücut metabolizmasındaki yararlı şekileridir. Bu koenzimler, timidilat, pürin, metionin ve glisinin sentezinde rol oynayan tek-karbon transferi reaksiyonları için gereklidir. Folik asidin, dihidrofolat (FH2) üzerinden tetrahidrofolat (FH4)'a dönüşümü şu şekilde olur (Kantemir 1969):



Çizim 1.11. Folik asitin tetrahidrofolata (FH4)'e dönüşümü (Aşcı 2010)

Metotreksat, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine bağlanarak enzimi geri dönüşlü bir şekilde inhibe eder. THF sentezinin inhibisyonu, pirimidin timidilat ve pürin nükleotidlerinin biyosentezinin durmasıyla sonuçlanır. Bu yapı taşlarının üretilememesi hücre prolifersyonu ve yaşamsal aktivitelerin devam için gerekli olan DNA ve RNA'nın sentezini ve enerji için gerekli olan ATP yapımını inhibe eder (Aşcı 2010). Metotreksat, S dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterir. Aynı zamanda FH4'e dönüşemeyen FH2, dihidrofolatpoliglutamatlar (8FH2Glun) ve Metotreksatın poliglutamat türevleri (metotreksat Glun) şeklinde hücrede birikir. Poliglutamatlar kanser hücresi içinde timidilat sentetaz ve transformilaz enzimlerinin inhibisyonundan sorumlu metabolitlerdir. Metotreksatın hücrelerdeki toksik etkileri folinik asid (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından antogonize edilir. Folik asidin kendisi, THF'a dönüşemediğinden antidot olarak kullanılamaz (Kantemir 1969, Kayaalp 2012, Nouri ve diğ. 2008).

MTX, DHFR'ı inhibe ettiğinden ortamda THF'ın azalmasına sebep olur. Bu yüzden THF'ın azalmasına neden olur. MTX poliglutamatları 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid ribozil 5 fosfat (GAR) formiltransferaz ve aminoimidazol karbokzamid ribozil 5

fosfat (AICAR) formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerin inhibisyonu pürin ve primidin metabolizmalarının engellenmesi ile sonuçlanır. Bu baskılanma sonucunda DNA ve RNA sentezi inhibe eder. 5-metil THF'ın azalması homosisteinin remisyonunda azalmaya ve homosistein ile adenozin düzeylerinde artmaya neden olur. MTX, S-adenozil metionin (SAM) miktarındaki azalmaya ek olarak doğrudan metionin sentetazı ve metionin transportunu inhibe edebilir. Transmetilasyonun azalmasını takiben poliaminlerin sentezini de azaltır (Uzar 2006).

1.3.1.1. Metotreksatın Antiproliferatif Etkisi

MTX, yüksek dozlarda lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi kanserlerin tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılır. MTX'ın antiproliferatif ve immünomodülatör etkilerini aktif T hücrelerinde ve keratinositlerde nükleik asit sentezinin inhibisyonu ile gösterdikleri düşünülmektedir (Taşlı diğ. 2011).

1.3.1.2. Metotreksatın Antiinflamatuvar Etkisi

Antiinflamatuvar özelliği olmasından dolayı MTX, Romatoid artrit (RA)'da ve psöriatik artritin tedavisinde kullanılan bir ajandır. RA'da tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), interlökin 1-beta gibi sitokinler ile metaloproteinazlar gibi inflamasyonun mediatör düzeylerinin MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (Bozan ve Gürelik 2004, Tian ve Cronstein 2007).

1.3.1.3. Metotreksatın İmmunmodülatör Etkisi

RA'nın patogenezinde immün mekanizmalar önemlidir. B ve T lenfositlerdeki aktivite artışının MTX ile baskılandığı gösterilmiştir. RA'lı hastaların idrar, sinoviyal sıvı ve lenfositlerinde poliamin seviyeleri yüksek olduğu için, poliaminlerin RA'nın patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir. Poliaminlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtta önemli görevleri vardır. MTX'ın immünmodulatör etkisi poliaminlerin sentezindeki inhibisyon ile ilişkili olabilir (Aslankara ve diğ. 2007, Kane ve diğ. 2004, Uzar 2006, Yılmaz 2008).

1.3.2. Metotreksatın Farmakokinetik Özellikleri

MTX, hücre içine aktif transportta folatlar ile rekabete girerek hücre içerisinde folatın yerini alır. MTX, karaciğerde diğer folatlarda oldugu gibi poliglutamilasyona uğrar. Poliglutamasyon sonrası MTX intrasellüler olarak uzun süre devamlılığını koruyabilir.

Hidrolitik enzimlerin aracılığı ile eski haline yeniden dönebildiği için haftalık tek doz şeklinde kullanım önerilmektedir (Eray 2009).

MTX'ın gastrointestinal sistemden emilimi doza bağımlı olup gıdaların emilim üzerine etkileri hakkındaki bilgiler çelişkilidir. Emilimden 1-2 saat sonra serum en üst seviyesine ulaşır. Genel kullanım dozu 7,5-25 mg/hafta olup bu dozun haftada bir gün tek seferde alınması önerilmektedir. Fakat klinik açıdan bu dozun 2-3 eşit miktara bölünerek alınması fark oluşturmadığı için hasta toleransına göre kullanım şekli belirlenmelidir. İyi emilim gösterdiği için etkin doz alımı 5-25 mg arasındadır ve bu doz alımından % 60 oranında biyoyararlanım gösterir. Doz artırıldığında ise intestinal flora tarafından metabolize edilerek atılımının sağlanması gerçekleştiğinden emilimi azalır. Yaklaşık % 50'si serum proteinlerine bağlanır ve diğer albümine bağlanan maddelerle rekabete girer. Verilen dozun %60-90'a kadar olan kısmı, 48 saat içinde, en çok ilk 8- 12 saat içinde değişmeden idrarla atılır. MTX'ın çok bir kısmının atılımı, glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonla böbreklerden gerçekleşirken ve az bir kısmıda safra yolu ile gerçekleşir. Bu yüzden, renal kan akımını azaltan, nefrotoksik ya da zayıf organik asit yapısındaki ilaçlarla birlikte kullanımı, renal atılımı azaltması sonucu daha ciddi myelosupresyona neden olabilir. MTX metabolizması, insanlarda genellikle minimal düzeydedir ancak yüksek doz ilaç uygulaması ardından 7- hidroksi-MTX gibi metabolitler gözlenebilir. MTX' ın sistemik dolaşımdaki dozunun yaklaşık %3' ü kadarı santral sinir sitemine geçer (Eray 2009, Sarıkaya ve diğ. 2013, Savran 2011).

Kanser hücrelerin membranından geçişi kolaylaştırmak amacıyla MTX'ın yüksek dozlarda uygulanması önerilmektedir. Hücre içinde ilacın konsantrasyonunun artması, DHFR artışından ya da MTX'a karşı DHFR'ın afinitesinin azalmasından kaynaklanan direnci de yeneceği belirtilmektedir. MTX'ın bu yüksek dozları hücrede poliglutamatların oluşumuna neden olmakta ve dolayısıyla ilacın etki süresini artırmaktadır. Ancak bu yüksek dozların etkinliği konvansiyonel (normal) dozlarla karşılaştırıldığında önemli bir farklılık görülmemektedir. Yüksek doz tedavisine 5- formil-tetra folik asit (lökovorin) eklenmesi yararlı olmaktadır. Ayrıca MTX'ın yüksek dozlarının uygulanmasında timidin ve 1-asparaginazla hücre siklusu inhibisyonuda yapılan çalışmalarla denenmiştir (Dökmeci 2007, Krakower ve Kamen 1983, Kutluana ve diğ. 2011).

Birçok ilaç MTX ile etkileşime girebilmekte ve yapısı, emilimi ve atılımı etkilenebilmektedir. Diğer antifolat ajanlardan olan trimetoprim-sulfametoksazol ile birlikte alımı aşırı folat yetersizliğine, salisilatlarla alımı ise kan serumundaki serbest ilaç oranını artıracağından toksik etkilerde artışa neden olabilmektedir. Ayrıca non-steroid

antiinflamatuvar ilaçlarla birlikte alındığında böbreklerle atılımının etkilendiği yönünde çelişkili yayınlar vardır, ancak renal fonksiyonları iyi olanlarda rahatlıkla kombine edilebilmektedir (Eray 2009, Karyağar 2006).

1.3.3. Metotreksatın Endikasyonları

Onkolojide yüksek dozda (3-10g/m2/gün) kullanılan metotreksat; koriyokarsinomlar, lösemiler, lenfomalar, osteosarkomlar, KBB kanseri, meme kanseri, baş ve boyun kanseri, ovaryum ve mesane gibi kanser çeşitlerinde diğer antineoplastiklerle birlikte kombine edilerek kullanılmaktadır (Arora ve diğ. 2011, Dökmeci 2007, Nouri ve diğ. 2008, Widemann ve Adamson 2006). Onkolojide uygulanan dozların 100-1000 kez daha azaldığı düşük dozda (1,000–33,000 mg/m2) uygulanan metotreksat ise; antiinflamatuvar ve hücre bölünmelerini inhibe edici etkileri nedeniyle psöriyazis, romatoid poliartritler, testis kanseri, sindirim kanalının, karaciğerin bazı inflamatuar hastalıkları ve bazı şiddetli şiddetli astımlarda kullanılabilmektedir (Arora ve diğ. 2011, Choudhury ve diğ. 2001, Dökmeci 2007, Jahovic ve diğ. 2003, Nouri ve diğ. 2008, Padmanabhan ve diğ. 2009).

1.3.4. Metotreksatın Yan Etkileri

MTX' ın çok sayıda yan etkisi bulunmaktadır. Kullanımı sırasında oluşabilecek yan etkiler şunlardır:

-Ağızdaki ağrı ve ülserasyonlar toksisitenin ilk belirtileridir (Aran 1974, Kantemir 1969).

-Lökopeni, trombositopeni, agranülositoz kemik iliği depresyonu sonucunda görülür (Aran 1974, Kane ve diğ. 2004, Sipahioğlu 1981).

-Sindirim mukozalarında inflamasyon oluşturmasıyla bulantı, kusma, anoreksi, karın ağrısı oluşabilir (Aran 1974, Bilge 1981).

-Enfeksiyonlara karşı duyarlılık artabilmektedir (Dökmeci 2007).

-Radyoterapi ile birlikte, intraketal yolla uygulandığında, baş ağrısı, ateş ve ensede sertlik gibi belirtilerle karakteristik kimyasal bir araknoidit tablosu ortaya çıkar. Uygulamadan 2-3 hafta sonra motor paralizi, kraniyal sinirlerin paralizi, konvülsiyonlar ve koma görülebilir (SSS ile ilgili yan etkiler, radyoterapi ile şiddetlenebilir) (Bilge 1981, Dökmeci 2007).

-MTX kullanımı gebeliğin bütün dönemlerinde zarar verebilmektedir (Aran 1974, Kantemir 1969).

-Gonadlar üzerinde toksik etkilir, spermazoidlerde değişme ve oligospermiye neden olmaktadır (Aran 1974, Dökmeci 2007).

-Uzun süreli oral tedaviler siroz ve vena porta fibrozuna neden olabilir. Kimyasal hepatit kolin uygulanmasıyla giderilebilmektedir (Kantemir 1969).

-Düşük dozlarda sık olarak saçların incelmesi gözlenmektedir (Aran 1974).

-Yüksek dozlar alopesi ve deride pigmentasyon ve fotosansibiliteye sebep olur (Aran 1974).

-Nefrotoksik etkileri vardır. Bu nedenle tedaviye başlanmadan önce hasta hidrate edilmeli, lökovorin ile idrar alkalileştirilmelidir (Kantemir 1969, Sipahioğlu 1981).

-Akciğerlerde infiltrasyon yapabilir (Kantemir 1969).

MTX gibi anti-kanser ilaçlarının, hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi kanser hücreleri için selektif değildir. Bu nedenle yüksek proliferasyon oranına sahip olan kemik iliği, bağırsak mukozası ve saç folikülleri gibi sağlam dokular içinde toksik olan bir ajandır. Antikanser ajanlar gonadları da etkiler (Vardı ve diğ. 2010).

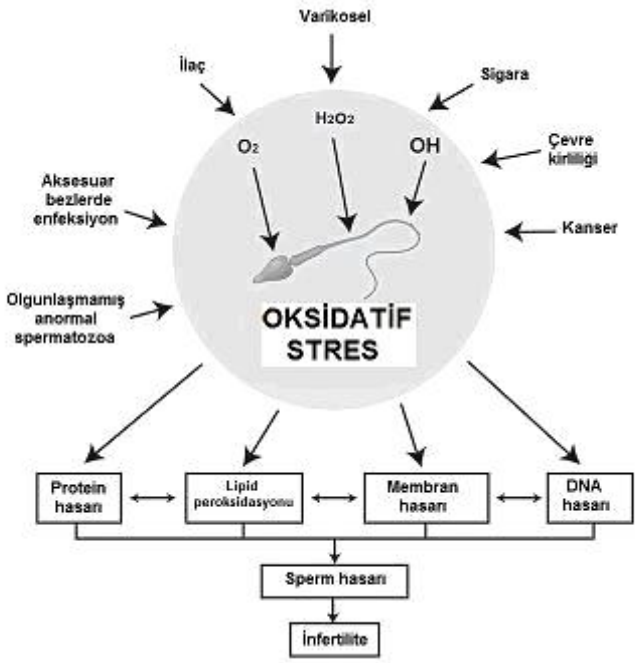
Yapılan çalışmalar MTX' ın, antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltarak, hücreleri reaktif oksijen partiküllerine (ROP)'ne karşı hassas duruma getirip hasara neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres testiküler ve germ hücrelerinde hasara yol açarak üremeyi etkilemektedir. MTX uygulamasında testis ağırlığında azalma, seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerin dökülmesine, morfolojik değişiklikler, sperm sayısında azalma ve apoptosize, birincil ve ikinci spermatosit boyutlarında değişiklik, kromatin kitle yoğunlaşması, vakuolizasyon ve hücresel ve kromozomal değişiklikler ile oligospermiye yol açtığını gözlemlenmiştir (Vardı ve diğ. 2010, Oktar ve diğ. 2010, Padmanabhan ve diğ. 2008, Saxena ve diğ. 2004).

1.4. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, normal durumlarda dengede olan prooksidan-antioksidan dengesinin bozularak, prooksidanlar yönünde artması olayıdır (Valko ve diğ. 2007). Oksidatif strese karşı gerekli enzimlerin, moleküler şaperonların ve antioksidan moleküllerin üretiminin artmasıyla sonuçlanan uyumsal yanıtlar bulunmaktadır (Fomenko ve diğ. 2011).

Organizmada bulunan elektron alıcı moleküller olarak bilinen serbest radikallerin, DNA, RNA ve enzimatik aktiviteleri etkileyen aktif oksijen türevi olan oksidanlar hücre hasarlarına neden olurlar. Bu serbest radikaller, normal şartlarda antioksidanlar tarafından yıkılırlar. Ancak savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu moleküller arasındaki dengenin bozulur ve oksidanlar yönüne kayarak hücreler oksidatif hasara duyarlı hale gelirler. Böylece oluşan bu hasarlar hücrede birçok hastalığa neden olurlar

(Romero ve diğ. 1998, Halliwell ve Whiteman 2004, Valko ve diğ. 2006, Berk ve diğ. 2008).



Çizim1.12. Erkek infertilitesine neden olan oksidatif stres faktörleri ve etki basamakları (Cocuzza ve diğ. 2007)

1.4.1. Serbest Radikaller

Bir ya da daha çok sayıda çiftleşmemiş elektron içeren atom veya atom gruplarına serbest radikal denir. Herhangi bir atom veya molekülün dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron bulunmasıyla, kimyasal türün reaktivitesi artar. Böylece kararsız hale gelir. Kararlı hale gelmek için dış yörüngesindeki elektronun ortak kullanılmasını sağlayarak diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek aktif bir yapı gösterir (Halliwell ve Gutteridge 1995).

Ekzojen kaynaklar: doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijen), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüslerdir (Halliwell ve Gutteridge 2000).

Endojen kaynaklar ise mitokondrial elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum fonksiyonları, araşidonik asit metabolizması veya siklooksijenaz (COX) sistemi, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit, makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, XO, NOX gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır (Akkus1990).

Serbest radikaller başta nükleik asitler, lipidler ve proteinler olmak üzere birçok moleküle zarar verir. Reaktif oksijen ürünlerinin biyolojik sistemde hasara neden olmasına

oksidatif veya nitrozaktif stres olarak adlandırılmaktadır. Membran lipid komponentleri ise serbest radikallerin hücrede ilk karşılaştıkları yapıdır (Gutteridge ve Halliwell 1990).

1.4.2. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Hücre membranları çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına lipid peroksidasyonu denir. Lipid peroksidasyonu zincirleme olarak kendiliğinden süren bir reaksiyon çeşididir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal aracılı oksidasyonu ile birincil metabolitler (lipid hidroperoksitler) ve ikincil metabolitler (siklik peroksitler) oluşır (Yin ve Porter 2005). Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, yapılarındaki hidrojen atomunun zincir başlatıcı radikale veya hidroksil radikali gibi kararsız yapılara transferi sonucu pentaenil karbon merkezli lipid radikalinin oluşması ile başlar. Burada karbon merkezli lipid radikali moleküler oksijenle tepkimeye girerek lipid hidroperoksil radikalini oluşturur. Lipid hidroperoksitler bölünüp siklik aldehitlere (4-hidroksinonenal, MDA, 4- hidroksihekzenal) dönüşebilir. Bu aldehitler diğer biyolojik moleküllerle (aminoasitler, proteinler) reaksiyona girerek hürede sitotoksik, genotoksik hatta proliferatif etki gösterirler (Esterbauer ve diğ. 1991).

1.4.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

ROS veya diğer oksidan metabolitlerin, kovalent modifikasyonu sonucu proteinlerin oksidasyonu gerçekleşir. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının ve proteaz inhibitor aktivitesinin kaybı, protein agregasyonu, artmış ya da azalmış proteolize yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immunojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (Shacter 2000).

1.4.4. Oksidan ve Antioksidanlar

Organizmalardaki lipid, protein, nükleik asit ve karbohidratlar oksidatif hasar için hedef moleküllerdir. Vücutta oluşan serbest radikalleri metabolize eden, onların düzeylerini kontrol altında tutan, serbest radikal oluşumunu önleyen, temizlenmesini artıran veya oluşabilecek hasarı engelleyen ve onaran savunma mekanizmaları vardır.
Savunmayı yapan bu maddelere antioksidan maddeler denir. Aerobik hücrelerde bulunan antioksidan sistemler endojen veya eksojen olabilir.

Çizelge 1.3. Antioksidan Sistemleri (Naito ve diğ. 2010)

Antioksidan Sistemler		
Endojen Antioksidanlar		Eksojen Antioksidanlar
Enzimatik	Non enzimatik	
-Glutatyon transferaz -Glutatyon redüktaz -Mitokondriyal oksidaz sistemi	-Bilirubin -Albumin -Ürik asit -α-tokoferol -Serüloplazmin -Transferrin -Ferritin -Glutatyon	-C vitamini -E vitamini -Folik asit -Asetilsistein -Allopurinol -Mannitol -Demir şelatörleri

Çizelge 1.4. Antioksidanların İşlevleri (Akkus 1995)

Antioksidanların İşlevleri		
Primer Antioksidanlar	Sekonder Antioksidanlar	Tersiyer Antioksidanlar
Yeni ROS oluşumunu önler	Zincir kırıcı reaksiyonlarıyla serbest raikalleri uzaklaştırır	Serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarır.
Ferritin Serüloplazmin Haptoglobulin Hemopeksin gibi	Vitamin C Vitamin E Bilirubin β karoten Ürik asit gibi	

1.4.4.1. Glutatyon (GSH)

Sistein, glutamik asit ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptid olan intrasellüüler tiyol bileşiğidir. Gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril grubu şeklinde iki kısımdan meydana gelmektedir. Gama glutamil transferaz (GGT) ile dokulardaki düzeyi ayarlanır. Lipit peroksidasyonuyla glutatyon (GSH) konsantrasyonu azalırken, okside glutatyon (GSSG) konsantrasyonu yükselir. Proteinlerdeki –SH gruplarının korunması ve aminoasidlerin hücre içine taşınmasında rol oynamaktadır. GSH, selenyum içeren

glutatyon peroksidaz (GPx) ile yükseltgenmektedir. GPx ise GSH'ın indirgenmesinde görev yapmaktadır.

Glutatyon Redüktaz

2GSSG + NADPH ----------> 2GSH + NADP

Karaciğer, plazma, kan hücreleri, beyin, akciğer, böbrekler gibi organlarda bulunur. Karaciğer sitozolündeki GSH hızlı bir döngüye sahiptir ve yarı ömrü 2-4 saattir, mitokondride ise yarı ömrü yaklaşık 30 saattir. Hücreden toksik metabolitleri uzaklaştırır ve indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfihidril grubunun devamlılığını sağlar. (Anderson ve Costas 2008).

1.4.4.2. Malondialdehit (MDA)

Malonaldialdehit lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde MDA seviyesi ölçülür. Enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksid parçalanması sonucu oluşur. Reaktif oksijen ürünlerinin seviyesinin tesbitinde MDA önemli bir göstergedir. MDA nükleik asitlere, proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (Yarıktaş ve diğ. 2003).

Lipid peroksidasyonu, bir zincir reaksiyonu olup daha ileri peroksidasyonu başlatan serbest radikaller için sürekli bir kaynak sağlar. Lipid peroksidasyonu; fosfolipid, gliserid, glikolipid ve steroidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidan maddeler aracılığıyla aldehit, alkol, hidroksi asit, pentan ve etan gibi ürünlere yıkılmasını sağlayan yıkıcı etkileri vardır. Bu şekilde oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu, organizmada serbest radikallerin etkisi sonucu, membranın yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla başlar ve MDA seviyesinin artmasına neden olur.

MDA mutajenik, karsinojenik ve genotoksik bir bileşiktir. Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna, membranın salgılama fonksiyonunun kaybına, transmembran iyon gradiyentini bozarak Ca^{+2} gibi iyonlara karşı nonspesifik permeabiliteyi arttırmaya, mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliklere, hücre içi organellerin (lizozom gibi) bütünlüğünün kaybolmasına yol açar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu olumsuz yönde etkiler (Deveci 2007).

1.4.4.3.Myeloperoksidaz (MPO)

Myeloperoksidaz (MPO), NO metobolizmasında yer alan nitrit, nitrat ve peroksidasyon işlemlerinde rol alan bir enzimdir. Antioksidan kapasitedeki azalmanın yanı sıra oksidatif stres düzeyini gösteren bir belirteçtir (Zeng ve Fena 1992) .

Nötrofiller ve monositler bakterilerin öldürülmesi için, hem oksijen bağımlı hem de oksijenden bağımsız mekanizmaları kullanırlar. Oksijen bağımlı mekanizmalar, MPO sistemini ve oksijen türevi serbest radikallerin üretimini sağlayan başka sistemleri içerirler. Polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) azurofil granüllerinde bulunur. Bu yüzden MPO aktivitesinin ölçümü dokuya PMNL toplanmasını göstermekte oldukça yararlıdır (Krawisz ve diğ.1984).

1.5. NADPH OKSİDAZ (NOX)

NADPH oksidaz yapısı; gp91phox ve p22phox olan iki membran sınır elemanından, p67phox, p47phox ve p40phox olan üç sitozolik bileşenden ve rac 1, rac 2 gibi düşük molekül ağırlıklı G proteininden oluşur (Yin ve Porter 2005).

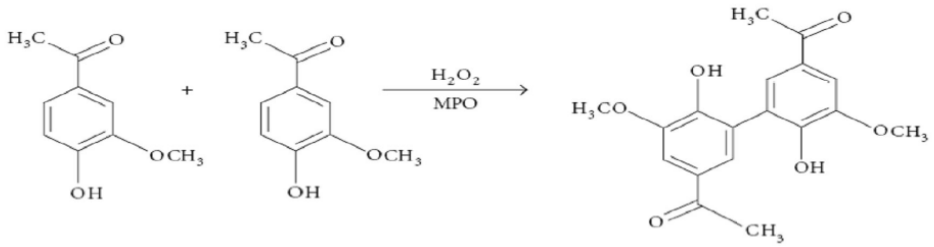
NADPH oksidaz, sitozoldeki elektronu fagosomdaki oksijene nakleden, ayrıca sitozolden fagosoma proton transfer eden aposininin inhibitörü olduğu enzimdir. Mikroorganizmaları öldürmenin dışında lizozomal proteazların salınımını ve aktivasyonunu optimal pH ayarlaması yaparak sağlar.

1.6. APOSİNİN

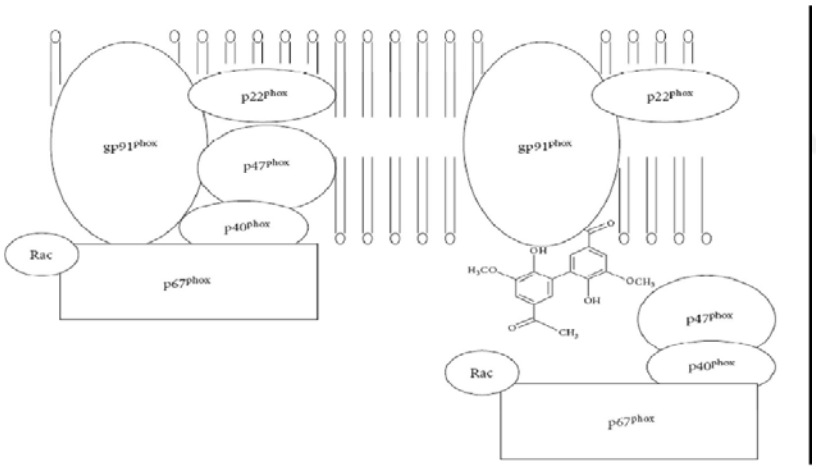
Aposinin, ilk olarak 1883 yılında Schmiedeberg tarafından tanımlanmıştır. *Apocynum cannabinum* bitkisinin özünden elde edilerek (Kanada keneviri), ödem çözücü olarak kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Çizim 1.13). Sonraki yıllarda Hindistan, Nepal, Tibet ve Pakistan dağlarında yetiştirilen bir bitki olan *Picrorhiza kurroa* kökünden izole edilmiştir (Çizim 1.14). Geleneksel Hint tıbbında kullanılmıştır. Aposininin 1990 yılında immünomodülatör etkisi bulunmuştur (Stolk ve diğ.1994). Aposinin hafif bir vanilya kokusuna ve 115 ° C'lik bir erime noktasına sahiptir. Yüz altmışaltı dalton molekül ağırlığında ve beyaz kristalimsi bir yapısı vardır (Anderson ve Costas 2008).

Çizim 1.13. *Apocynum cannabinum* **Çizim 14.** *Picrorhiza curroa* (Stefanska ve Pawliczak 2008)

Aposinin peroksidaz aracılı oksidasyon ile bir dimere dönüşürek daha aktif forma geçer (Çizim 1.15). Aposinin hücre içi translokasyon inhibitörüdür. Hücre membranında etkilediği kritik sitozolik komponentler vardır. Aposinin'in NOX inhibisyon mekanizması tam bilinmemekle birlikte NOX'un sitozolik bileşenleri olan p47phox ve gp91phox translokasyonlarını önleyerek hareket ettiği düşünülmektedir (Çizim 1.16). Aposinin NOX aktivitesini selektif olarak inhibe eder. Fagositik ve nonfagositik hücrelerin fonksiyonları ile ilişkilidir (Stolk ve diğ.1994).



Çizim 1.15. Aposinin'in aktif dimerizasyonunun oluşumu (Barry ve diğ. 2011)



Çizim 1.16. Aposinin'in NOX inhibisyonu mekanizması (Barry ve diğ. 2011)

NADPH oksidaz; ROS üretiminden sorumlu enzimdir. Bu enzimin inhibe edilmesiyle birçok hastalığın tedavisi için terapötik bir amaç oluşacaktır. Aposinin'in, GSH'u artırarak antioksidan savunma sistemini ve iskeminin indüklediği hücresel stresi sınırladığı görülmüştür (Liu ve diğ. 2008)**.**

Aposinin halen NADPH oksidaz enzim ailesinin bilinen en selektif inhibitörüdür. Aposinin'in temel etki mekanizması NADPH oksidaz enziminin sitozolik bir alt ünitesi olan p47phox' un NADPH oksidaz membranına translokasyonunu engellemesidir. Biyokimyasal olarak NADPH oksidaz tarafından üretilen süperoksit iyonunun açığa

çıkmasını engelleyen Aposinin'in bir diğer önemli özelliğide fagositoz yapan hücrelerin diğer fonksiyonlarını engellememesidir (Stolk ve diğ. 1994).

Biyokimyasal olarak yapısında benzen halkası ve metoksil içeren bileşiklerin genel antioksidan aktivitesi bilinmektedir (Van den Worm ve diğ. 2001). Vanilin benzeri yapısına ek olarak hidroksilasyon ve metoksilasyon sonrası oluşan Aposinin'in bu özellikleri onu güçlü bir antioksidan yapmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda inflamasyonu engelleyici etkisi sebebiyle yoğun olarak deneysel çalışmalara konu olmaktadır. Aposinin'in, aynı zamanda kimyasal yapısı göz önünde bulundurularak analogları üretilmeye çalışılmakta ve bu analogların da serbest oksijen radikallerini engelleyici etkileri araştırılmaktadır (Stuppner ve diğ. 1995, Dorsch ve diğ. 1994).

Aposinin aktivitesinin MPO'dan başka H_2O_2 ile indüklendiği varsayılır. Aposinin'in NOX inhibitör etkisini tiyol, glutatyon ya da sistein takviyesiyle önlediği görülmüştür (Van den Worm ve diğ. 2001).

Aposinin'in invitro anti-inflamatuar etkileri arasında; nötrofil aracılı oksidatif hasarı azaltılması, tümör nekroz faktörü ile muamele edilmiş insan umbilikal ven endotel hücrelerinde monositik hücre adezyonunu azaltılması, polimorfonükleer granülosit kemotaksisini azaltılması, enflamasyon-aracılı kıkırdak hasarının inhibisyonu sayılabilir. Doddo ve diğ. yaptıkları çalışmada Aposinin'in koyun akciğerlerinde vasküler permeabilite artışıyla oluşan iskemi ve hasarı önlediği görülmüştür (Doddo ve diğ. 2004).

Tang vediğ. farelerde aposininin farklı dozlarda etkilerini araştırdıkları çalışmada Aposinin deneysel inmelerde olumlu etkilerinin olabilmesi için dar bir terapötik alan kullanılmalıdır (Tang 2007).

Zhang GL ve diğ. testis iskemisinde Aposinin'in koruyucu etkisi hakkında yapmış oldukları çalışmada sıçanları 17 gün ve günlük 8 saat/gün iskemiye maruz bırakmışlardır. Rat testislerinde Aposinin ve raisanberine verilen grupta diğer gruplara göre seminifer tübüller ve sperm üretinindeki hasarın daha az olduğunu belirlemişlerdir (Zhang ve diğ. 2013).

Aposinin oral kullanıldığında nonsteroid anti-inflamatuar olan ibuprofenle benzer COX inhibitör etkisi vardır. Böylece, Aposinin osteoartrit veya romatizmal artrit gibi kronik enflamatuvar eklem hastalıkları tedavisinde kullanılabilir (Riganti ve diğ. 2006).

Aposinin aktivasyonunda $H_2 O_2$ konsantrasyonun artışı, hücre içi GSH / glutation disülfit oranının azalmasında önemlidir. Aposinin ile pentoz fosfat yolu ve trikarboksilik asit döngüsü uyarılır (Kudo ve ark.1996). Heumuller ve arkadaşları Aposinin'in radikal

tutucu olduğunu ve damar hücrelerinde ROS bağlı sinyalleri direk inhibe ettiğini göstermişlerdir (Heumuller ve diğ. 2006).

Tang ve diğ. Aposinin'in antiinflamatuar etkisinin ne dimer ne trimer nede tiyol bileşikleriyle olmadığını, GSH ile konjuge olduktan sonra etkinleştiğini doğrulamışlardır (Tang ve diğ. 2008). Aposinin'in koruyucu etkisi NOX inhibisyonu ile sınırlı değildir. Aposinin akciğerlerde I/R hasarından sorumlu tutulan tromboksan sitokrom P450 ve tromboksan sentazıda inhibe ettiği gösterilmiştir (Stoll ve diğ. 1994).

Chiang ve diğ. ise yaptıkları çalışmada sıçan akciğerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon modelinde aposinin'in hücre ölümünün önemli nedenlerinden biri olan apoptozisi azalttığını göstermişlerdir (Chiang ve diğ. 2011).

Engels ve diğ. tarafından yapılan çalışmada Aposinin' in iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesine katkı sağlayabilecek inflamasyonu azaltıcı özellikleri de gösterilmiştir. Aposinin araşidonik asit metabolizması üzerine etki ederek inflamasyon ve iskemi reperfüzyon hasarı sırasında açığa çıkan tromboksanı azaltıcı prostoglandin E_2 ve $F_{2\alpha}$ düzeylerini ise arttırıcı yönde etki yapmaktadır (Engels ve diğ. 1992). Yapılan bu çalışmada ayrıca maddenin tromboksan oluşumunu inhibe etmesi sebebiyle platelet agregasyonunu azalttığı belirtilmiştir.

2.AMAÇ

Kemoterapi için kullanılan birçok ilacın toksik yan etkiler yaptığı bilinmektedir (Prahalathan ve diğ. 2005). Bu ilaçlar, sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki benzerlikler nedeniyle kanserli hücrelerin proliferasyonunu ve gelişmesini önlemesine rağmen testisin germinatif epiteli, GIS mukozası gibi hücreleri üzerinde de etkilidirler (Türk ve diğ. 2013).

MTX folik asit antogonistidir ve malign tümörlerde kullanılan bir ajandır (Yuluğ ve ark. 2013). Hücre siklusunun S döneminde sitotoksik etki yaparak, hücre bölünmesini inhibe eder. Yapılan çalışmalar metotreksatın, antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltarak, hücreleri ROS'a karşı hassas duruma getirip hasara neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres testis seminifer tübüllerinde hasara ve germ hücrelerinde azalmaya yol açmaktadır (Isık ve diğ. 1997). Bundan dolayı antioksidanlar oksidatif strese karsı testis dokusunun korunmasına yardım edebilir.

Aposinin, *Apocynum cannabinum* bitkisinin köklerinden elde edilen NADPH oksidaz (NOX) inhibisyonu etkisi olan bir maddedir. En çok bilinen NOX inhibitörlerinden birisidir (Xian ve diğ. 2008). Aposinin, antioksidan savunma sistemini ve GSH arttırdığı için iskeminin tetiklediği hücresel stresi sınırladığı görülmüştür (Liu ve diğ. 2008).

Yapılan literatür taramasında testis dokusunda MTX tarafından oluşturulan toksisite üzerine, testislere olumlu etkilerinin bilinen Aposinin'in etkisini ortaya koyan bir çalımaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı; kanser ya da birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan Metotreksat'ın testis dokusu üzerinde oluşturduğu yan etkileri değerlendirmek ve bu etkilerin azaltılması ya da önlenmesine yönelik koruyucu bir faktör olarak antioksidan özellikte olan Aposinin uygulanmasının erkek fertilitesi üzerine etkilerini incelemektir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 09.07.2015 tarihli ve 8/8-2015 sayılı onay alındı, tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1.DENEY HAYVANLARI

Çalışmada Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen 50 adet, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, 8 haftalık Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, uygun kafesler içerisinde barındırılarak serbestçe beslenip su içmeleri sağlandı. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca normal pelet yem ve su ile beslendi. Tüm hayvanların çalışma başlangıcında ve sakrifiye edilmeden önce tartılarak ağırlıkları kayıt edildi. Her grupta 10 sıçan olacak şekilde 5 grup oluşturuldu.

3.2. GRUPLARIN OLUŞTURULMASI ve UYGULAMALAR

1) Kontrol Grubu (n=10): Metotreksat grubuna enjeksiyon yapıldığı zamanda kontrol grubu sıçanlara da %0.9 NaCl (1.25 ml) tek doz ve intraperitoneal (i.p) olarak verildi (Chirino ve diğ. 2007).

2) DMSO Grubu (n=10): Aposinin grubuna enjeksiyon yapıldığı zamanda DMSO grubundaki sıçanlara da %15 DMSO (0.2 ml) i.p. olarak verildi (Şener ve diğ. 2014).

3) Metotreksat Grubu (n=10): Metotreksat 20 mg/kg dozda i.p. ve tek doz olarak (Daggulli ve diğ. 2014) 24. gün verildi (El-Sheikh ve diğ. 2014).

4) Metotreksat+Aposinin(20mg/kg) Grubu (n=10): Sıçanlara i.p. enjeksiyon yolu ile Aposinin (20 mg/kg/gün) 4 hafta (28 gün) süreyle (Li ve diğ. 2013) ve deneylerin 24. Gününde (El-Sheikh ve diğ. 2014) Metotreksat 20 mg/kg dozda tek doz i.p. (Daggulli ve diğ. 2014) olarak verildi.

5) Metotreksat+Aposinin(50mg/kg) Grubu (n=10): Sıçanlara i.p. enjeksiyon yolu ile Aposinin (50 mg/kg/gün) 4 hafta (28 gün) süreyle ve deneylerin 24. gününde (El-Sheikh ve diğ. 2014) Metotreksat 20 mg/kg dozda tek doz ve i.p. (Daggulli ve diğ. 2014) olarak verildi.

Tüm hayvanlar 28. gün sonunda i.p. olarak uygulanan ketamin (90 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) anestezi uygulanarak sakrifiye edildi. Hayvanların testisleri komsu dokulardan temizlenerek tartıldı. Elde edilen doku örneklerinin bir kısmı ışık mikroskobik inceleme için %10'luk formaldehit fiksasyon solüsyonu içine atıldı.

Hayvanlardan elde edilen dokuların bir kısmı ise MDA, MPO ve GSH tayini için kullanıldı.

3.3. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER ve CİHAZLAR

3.3.1. Kimyasal Malzemeler

Metotreksat (Koçak Farma firmasının Methotrexate 50 mg/5 ml Enjektabl solüsyon içeren flakon)

Aposinin (Santa Cruz: sc-203321A)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Santa Cruz firmasına: sc-202581)

Alfazyne (50 ml)

Ketalar (500 mg)

Formaldehit (Tekkim)

Etanol Absolute (Merck)

Etil Alkol 96^{o} (Tekkim)

Entellan (Merck Milipore: 107961)

Toluen (Merck)

Metanol (Merck)

Ksilol (Tekkim)

Proteinaz K (Merck Millipore: 21627)

Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit (Millipore: S7101)

Metilen gren (TM of Trevigen)

MPO ELISA Kit (Bioassay: E0574Ra)

3.3.2.Cihazlar

Hassas terazi (Scaltec-STB31)

Vorteks (LMS)

Etüv (Elektro-mag)

Mikrotom (Leica SM 200R)

Mikrodalga (Regal)

Buzdolabı (Arçelik)

Işık mikroskobu (Leica DM 1000) ve Kamera (Leica DMC 2900)

3.4.VÜCUT AĞIRLIKLARININ ÖLÇÜMÜ

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde miktarlarını belirlemek için günlük olarak ve deney sonunda ağırlıkları tartılarak kaydedildi.

3.5.TESTİS AĞIRLIKLARININ ÖLÇÜMÜ

Testis, çevre dokulardan iyice temizlendikten sonra her biri de Scaltec-STB31 marka hassas terazi ile tartıldı. Her sıçan için sağ ve sol testis olmak üzere tartılarak kaydedildi. Sol testisler biyokimyasal analizler için salin ile yıkanarak paketlendi. Sağ testisler histolojik analizler için %10'luk formaldehit içerisine alındı.

3.6. BİYOKİMYASAL ANALİZ

Kardiyak ponksiyon ile alınan kan örnekleri pıhtılaşma amacıyla 10-20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

3.6.1.Doku Homojenizasyonu

Sıçan testis dokularında MDA, GSH, MPO, testosteron ve protein tayini için dokular tartılarak üzerine 1/10 (ağırlık/volüm) oranında PBS (0,1 M / pH 7,4) eklenip doku homojenizatörü ile homojenize edildi (Calkins ve diğ. 2001). Homojenatlar 15 dk 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı ve eppendorflara alınarak -40^{o}C'de analiz edilecek zamana kadar saklandı.

3.6.2.Doku Protein Tayini

Total protein tayini Lowry modifiye metodu ile yapıldı (Hartree 1972). Analiz edilecek parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak tayin edildi.

3.6.3.Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Tayini

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile raksiyona girerek 535 nm'de maksimum absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülerek, örnek içindeki MDA konsantrasyonu tayin edilir (Buege ve Aust 1978).

3.6.4.Glutatyon (GSH) Düzeylerinin Tayini

Non-protein sülfidril gruplarının tümü redükte glutatyon formundadır. 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) DTNB disülfid bir kromojendir ve sülfidril grubu içeren bileşiklerle kolayca redükte olarak koyu sarı renkli bir bileşik oluşturur. Bu redükte kromojenin 412 nm'de ölçülen absorbansı GSH konsantrasyonu ile direk orantılıdır (Ellman 1959).

3.6.5.Myeloperoksidaz (MPO) Düzeylerinin Tayini

Bioassay (Shanghai, China) ELISA kiti kullanılarak çalışıldı. Çalışma kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

3.6.6. Testosteron Ölçümü

Rutin biyokimya otoanalizörü ile ölçüldü.

3.7.IŞIK MİKROSKOBİ UYGULAMARI

Hayvanlardan alınan sağ testisler ışık mikroskop takibi uygulamak üzere %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonuna konularak fikse edildikten sonra yükselen etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24 saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 saat süreyle tutuldu. Toluol içinde 30 dakika sürede şeffaflandırma işlemi yapıldı. 60^{o}C'deki etüvde 15 dakika toluol+parafin karışımında daha sonra 30 dakika parafin içinde bekletilerek parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 4-5 µm kalınlığında mikrotom ile seri kesitler alındı. Her bir testisten 10'ar kesit atlanarak 5'er preparat hazırlandı (Yüncü ve diğ. 2015). Hazırlanan preparatlar hematoksilen–eozin (H&E), terminal dUTP nick end labelling (Tunel) boyaması ile boyanıp, Leıca DM 1000 model ışık mikroskobunda değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

Çizelge 3.1. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	%70 Alkol	24 saat
2	%90 Alkol	24 saat
3	%96 Alkol	24 saat
4	%100 Alkol	24 saat
5	%100 Alkol	2 saat
6	Toluol	30 dakika
7	Toluol+Parafin	15 dakika
8	Parafin	30 dakika
9	Gömme	

3.7.1. Hematoksilen&Eozin Boyaması

Parafin kesitler 2 saat boyunca 60°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün 2 saat toluol yardımı ile kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100°, 96°, 90°, 70°) geçirilerek deparafinize edildi ve saf suya kadar hidrate edildi. Ardından Mayer's hematoksilen'de 5 dakika bekletilerek hücre nukleusları boyandı. Fazla boyanmanın giderilmesi için 2 defa distile sudan geçirildi. 10-15 saniye mavileştirme solüsyonunda bekletildikten sonra 2 kere distile sudan geçirildi. 100° alkolden sonra sitoplazmayı boyamak için kesitler 2-3 dakika eozin boyasında bekletildi. 100° alkolden geçirilen kesitler toluolde ikişer kez 15'er dakika bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. Kapatılan kesitler Leıca DM 1000 ışık mikroskopu ile incelendi.

3.7.2. Tunel Boyaması

Parafin bloklardan alınan 4-5 µm'lik kesitler 2 saat 60 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından toluolde 2x20 dakika bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirildikten sonra 5 dk PBS'de yıkandı. Kesitler çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildi. Daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dakika oda ısısında proteinaz K solüsyonu uygulandı ve distile su ile yıkanan (2x2 dk) kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanol ile hazırlanan %3'lük H_2O_2'de 5 dakika bekletildi. Kesitlere 10 dakika oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de terminal deoksinükleotidil transferaz enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma tamponuyla oda ısısında 10 dakika bekletildi. PBS'de yıkanan (3x1 dk) kesitlere oda ısısında 30 dakika anti-digoksigenin-peroksidaz konjugatı uygulandı ve PBS (4x2 dk) yıkandı. Sonrasında 3-6 dakika DAB kromojen solüsyonu uygulamasından sonra distile su (3x1 dk) uygulandı.10 dakika %0.5 metilen green ile zıt boyama yapıldı. Ardından distile su (3x30 sn) ile N-butanolle 3 defa yıkandı. Daha sonra toluole alındı ve kesitler kapatma medyumu ile kapatıldı.

İşaretlenen hücrelerin toplam hücre sayısına bölünmesi ile her bir testisteki hücrelerin apoptotik indeksi hesaplandı (Yuluğ ve diğ. 2013).

3.8.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama +/- standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25. persantil - 75. persantil)

olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Kruskal Wallis Testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey, Dunnve Dunnett testleri kullanıldı. Tekrarlayan ölçümler arasındaki farklılıkları belirlerken normal dağılım varsayımı sağlandığı için eşleştirilmiş t-testi kullanıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.VÜCUT ve ORGAN AĞIRLIKLARI

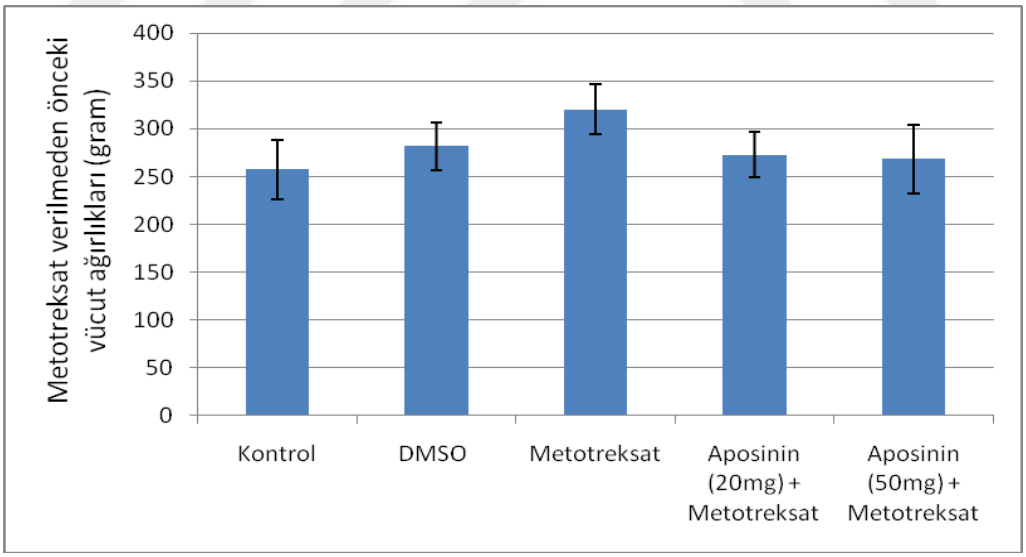
4.1.1. Metotreksat Verilmeden Önceki Vücut Ağırlıkları

Çalışmamızda hayvanların ilk ölçülen vücut ağırlıklarına ilişkin bulguları çizelge 4.1'da verilmiştir.

Hayvanların ilk ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında önemli bir fark saptanmamıştır (p=0,226).

Çizelge 4.1. Gruplara göre Metotreksat uygulanmadan önceki vücut ağırlıkları farkları (gram)

Gruplar	Medyan (25-75)	P değeri
Kontrol	255,50 (234,00-286,00)	0.226
DMSO	269,50 (227,00-300,00)	
Metotreksat	276,50 (245,00-305,00)	
Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat	260,00 (238,00-290,00)	
Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat	263,50 (247,00-284,00)	



Çizim 4.1. Sıçanların Metotreksat verilmeden önceki vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması

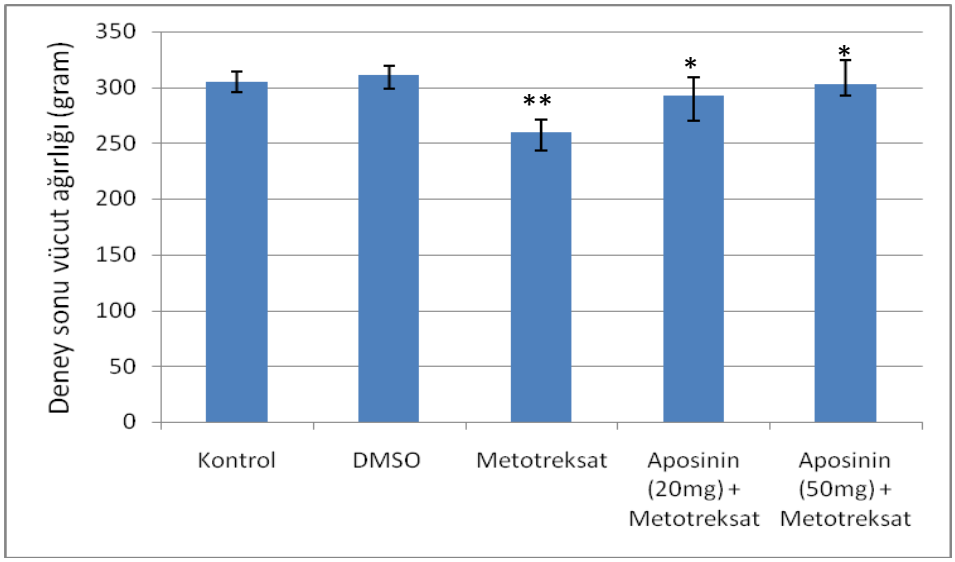
4.1.2.Deney Sonu Vücut Ağırlığı

Deney sonrası sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artış görülmüştür (Çizelge 4.2) ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$). Deney sonu vücut ağırlıkları kontrol grubu ile Metotreksat grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklılık belirlenmiştir ($p<0.001$). Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$).

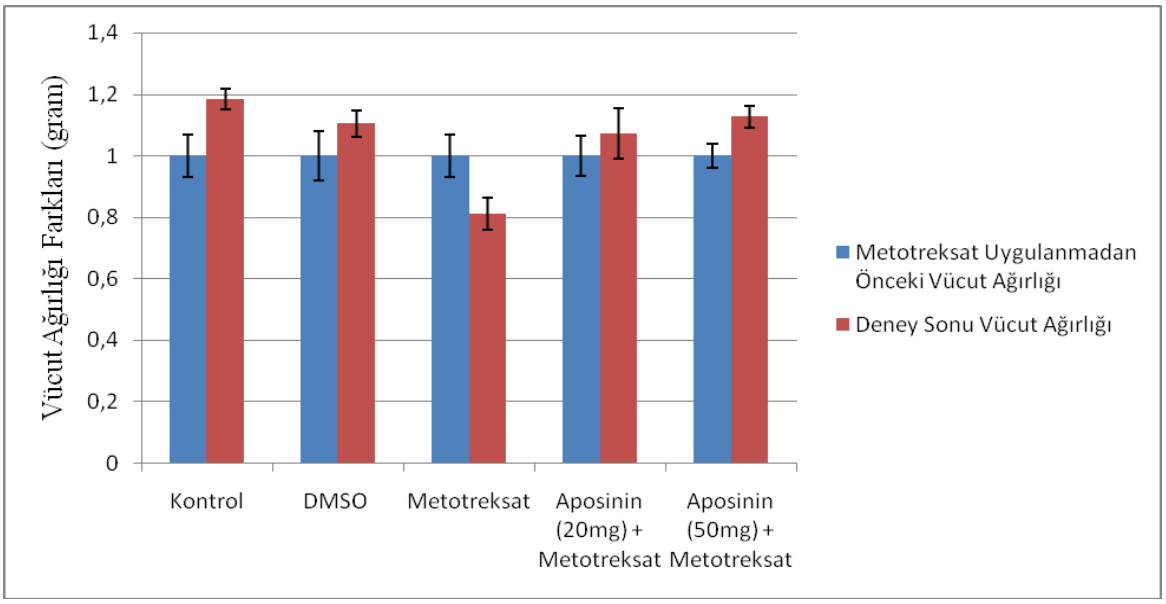
Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat kendi aralarında karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.559$).

Çizelge 4.2. Sıçanların gruplarına göre deney sonu vücut ağırlıkları (gram)

Gruplar	**Ortalama±Standart Sapma**	**P değeri**
Kontrol	304,50±8,54	0.000
DMSO	310,90±12,05	
Metotreksat	259,60±16,60	
Aposinin(20mg) + Metotreksat	292,33±22,18	
Aposinin(50mg) + Metotreksat	302,40±9,54	



Çizim 4.2. Sıçanların deney sonu vücut ağırlıklarının deney gruplarına göre karşılaştırılması. **p<0.001; Kontrol grubu ile kıyaslandığında, *p<0.001; Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.



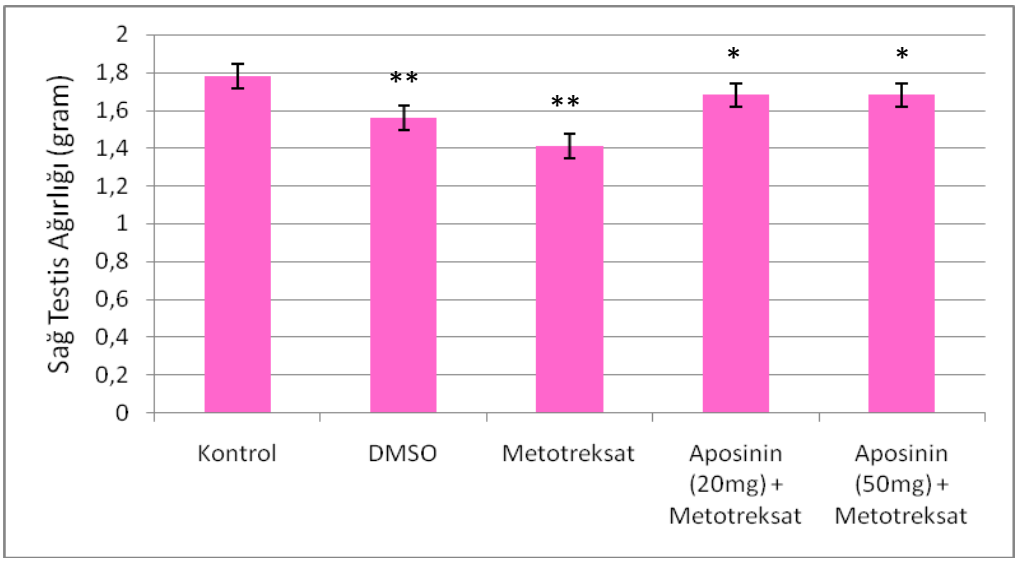
Çizim 4.3. Metotreksat uygulanmadan önceki ve deney sonu vücut ağırlıkları arasındaki farkların gruplara göre karşılaştırılması

4.1.3.Sağ Testis Ağırlığı

Gruplar arasında sağ testis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.001$). En yüksek sağ testis ağırlığı kontrol grubunda görülürken; en düşük sağ testis ağırlığı ise Metotreksat grubunda gözlendi (Çizelge 4.3). Gruplar arası ikili karşılaştırma kontrol grubu ile DMSO ve Metotreksat grupları arasında farklılık bulunurken ($p<0.001$); Aposininin 20mg/kg'lık dozunda ($p=0.081$) ve 50mg/kg'lık dozunda ($p=0.088$) arasında farklılık görülmemiştir. Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p<0.001$).

Çizelge 4.3. Sıçanların gruplarına göre sağ testis ağırlıkları (gram)

Gruplar	**Ortalama±Standart Sapma**	**P değeri**
Kontrol	1,78±0,09	0.000
DMSO	1,56±0,12	
Metotreksat	1,41±0,11	
Aposinin(20mg) + Metotreksat	1,68±0,07	
Aposinin(50mg) + Metotreksat	1,68±0,07	



Çizim 4.4. Sıçanların sağ testis ağırlıklarının deney gruplarına göre karşılaştırılması. **p<0.001 Kontrol grubu ile kıyaslandığında, *p<0.001; Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2.BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. Malondialdehit (MDA) Ölçüm Bulguları

MDA miktarları belirlenirken homojenize edilen testiste protein tayini yapılmıştır. Analiz edilen parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak dokuda nanomol/10 mg protein, serumda nanomol/mililitre cinsinden elde edilmiştir.

Kontrol grubundaki MDA seviyeleri dokuda 5,08 (4,22-5,68) nanomol/10 mg protein ve serumda 1,70±0,32 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

DMSO grubundaki MDA seviyeleri dokuda 5,55 (4,63-6,50) nanomol/10 mg protein ve serumda 2,08±0,28nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

Metotreksat grubundaki MDA seviyeleri dokuda 8,23 (7,74-9,47) nanomol/10 mg protein ve serumda 6,54±0,72 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

Aposinin (20mg/kg)+Metotreksat grubundaki MDA seviyeleri dokuda 3,11 (2,50-3,68) nanomol/10 mg protein ve serumda 2,16±0,52nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

Aposinin (50mg/kg)+Metotreksat grubundaki MDA seviyeleri dokuda 5,17 (4,03-6,69) nanomol/10 mg protein ve serumda 1,71±0,32 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Gruplar arasında doku MDA değerleri istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0.001). En yüksek MDA değeri Metotreksat grubunda görülmüştür. Gruplar arası ikili karşılaştırma da kontrol grubunun DMSO (p=1.00),

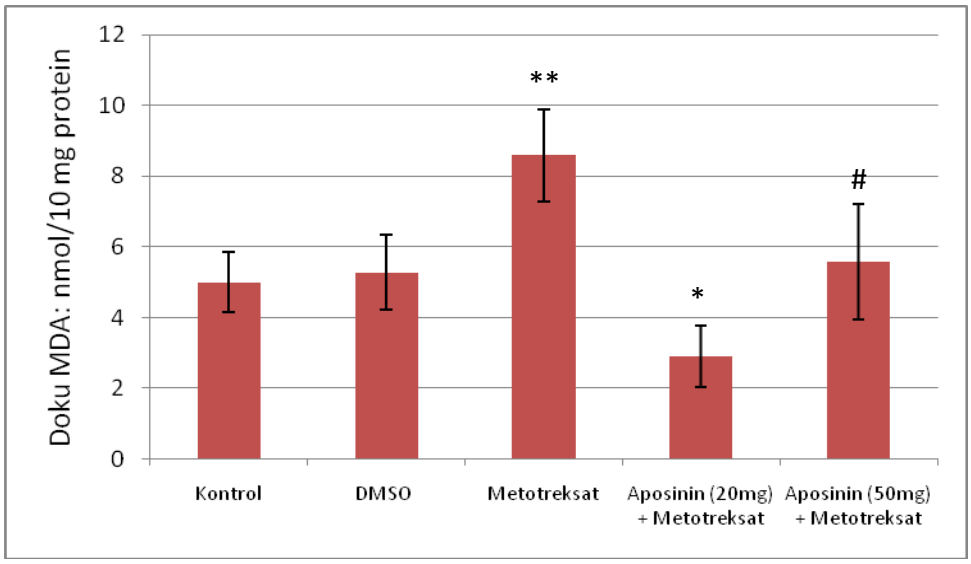
Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p=0.147) ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat (p=1.00) grupları ile arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken; Metotreksat grubu (p=0.017) ile anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p<0.001) ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat (p=0.029) grupları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grupları arasında farklılık görülmemiştir (p=0.093).

Gruplar arasında serum seviyelerindeki MDA istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0.001). Serumdaki en yüksek MDA seviyesi Metotreksat grubunda görülmüştür. Gruplar arası ikili karşılaştırma da kontrol grubunu DMSO grubu (p=0.262), Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p=0.141) ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat (p=1.00) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmazken; Metotreksat grubu (p<0.001) ile anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Metotreksat grubu ile DMSO, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat grupları arasında farklılık bulunmuştur (p<0.001). Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat arasında farklılık görülmemiştir (p=0.277).

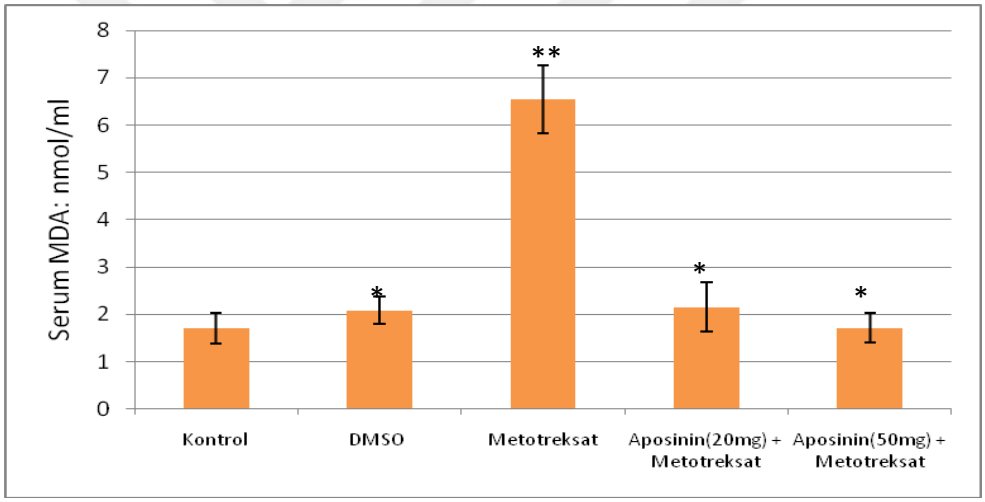
Doku ve serum seviyelerindeki MDA değerleri arasında farklı sonuçlar bulunmamıştır.

Çizelge 4.4. Sıçanların gruplarına göre doku MDA ve serum MDA değerleri

Gruplar	**MDA (Doku) Nanomol/10mg protein Medyan (25-75)**	**MDA(Serum) Nanomol/mililitre Ortalama±Standart Sapma**	**P değeri**
Kontrol	5,08 (4,22-5,68)	1,70±0,32	0.000
DMSO	5,55 (4,63-6,50)	2,08±0,28	
Metotreksat	8,23 (7,74-9,47)	6,54±0,72	
Aposinin(20mg)+Metotreksat	3,11 (2,50-3,68)	2,16±0,52	
Aposinin(50mg)+Metotreksat	5,17 (4,03-6,69)	1,71±0,32	



Çizim 4.5. Doku MDA düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması. **p<0.05; Kontrol grubu ile Metotreksat grubu kıyaslandığında, *p<0.001; Metotreksat ile Aposinin(20mg)+ Metotreksat grubu ile kıyaslandığında, #p<0.05; Metotreksat ile Aposinin(50mg)+Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.



Çizim 4.6. Serum MDA düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması. **p<0.001; Kontrol grubu ile Metotreksat grubu kıyaslandığında, *p<0.001; Metotreksat ile DMSO, Aposinin(20mg) +Metotreksat ve Aposinin(50mg)+Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)± standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2.2. Glutatyon (GSH) Ölçüm Bulguları

GSH miktarları belirlenirken homojenize edilen testiste protein tayini yapılmıştır. Analiz edilen parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak dokuda mg/g protein cinsinden elde edilmiştir.

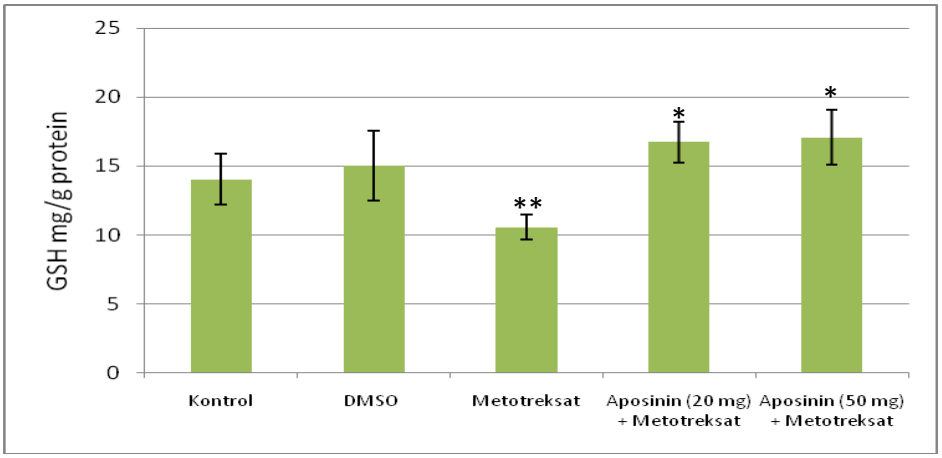
Kontrol grubundaki GSH seviyeleri dokuda 14,03±1,84 mg/g protein, DMSO grubundaki GSH seviyeleri 15,00±2,52 mg/g protein, Metotreksat grubundaki GSH seviyeleri 10,58±0,89 mg/g protein, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubundaki GSH

seviyeleri 16,74±1,50 mg/g protein, Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubundaki GSH seviyeleri 17,07±2,00 mg/g protein olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Gruplar arasında GSH değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.001$). En yüksek GSH değeri Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat (17,0711) ve Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (16,7400) görülürken; en düşük değeri Metotreksat grubunda (10,5800) görülmüştür. Gruplar arası ikili karşılaştırma da kontrol grubu ile Metotreksat grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.005$).Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ($p<0.001$) ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat ($p<0.001$) grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grupları arasında farklılık görülmemiştir ($p=0.995$).

Çizelge 4.5. Sıçanların gruplarına göre GSH değerleri

Gruplar	**Ortalama±Standart Sapma**	**P değeri**
Kontrol	14,03±1,84	0.000
DMSO	15,00±2,52	
Metotreksat	10,58±0,89	
Aposinin(20mg) + Metotreksat	16,74±1,50	
Aposinin(50mg) + Metotreksat	17,07±2,00	



Çizim 4.7. GSH düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması. **p<0.005; Kontrol grubu ile Metotreksat grubu kıyaslandığında, *p<0.001; Metotreksat ile Aposinin(20mg) +Metotreksat ve Aposinin(50mg)+Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2.3. Testosteron Ölçüm Bulguları

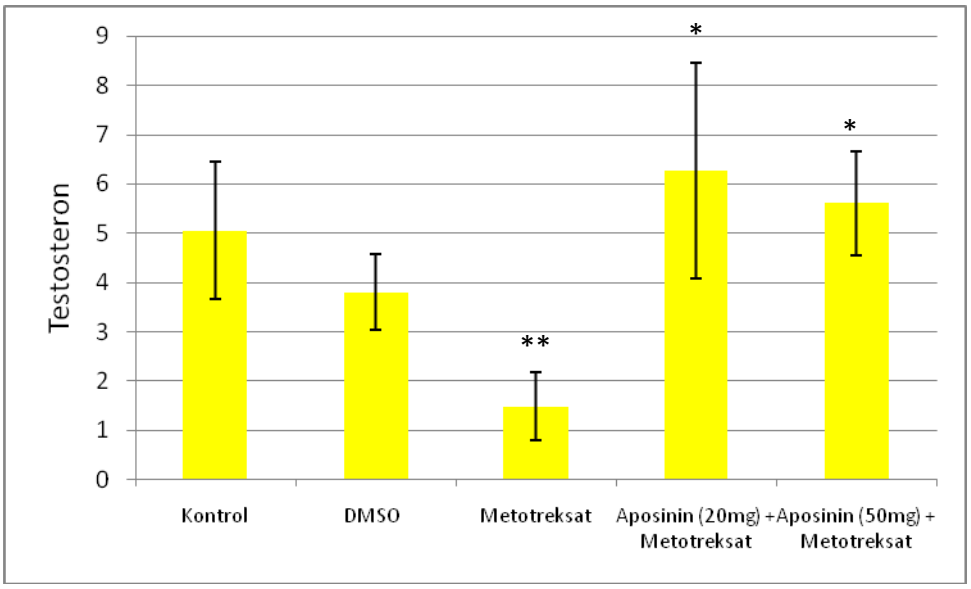
Testosteron değeri belirlenirken kalpten alınan kandan serum miktarı elde edilmiştir.

Kontrol grubundaki testosteron seviyeleri serumda 5,05±1,39, DMSO grubundaki testosteron seviyeleri 3,80±0,77, Metotreksat grubundaki testosteron seviyeleri 1,49±0,68, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubundaki testosteron seviyeleri 6,26±2,18, Aposinin (50mg/kg)+Metotreksat grubundaki testosteron seviyeleri 5,60±1,04 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Gruplar arasında testosteron ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.001$). En yüksek testosteron değeri Aposinin (50mg/kg)+Metotreksat (5,6067) ve Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (6,2656) görülürken; en düşük değeri Metotreksat grubunda (1,4944) görülmüştür. Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, DMSO ($p=0.165$), Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ($p=0.183$) ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grupları ($p=0.792$) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken; Metotreksat grubu ile anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.001$). Gruplar arası ikili karşılaştırma da Metotreksat grubunun Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ($p<0.001$) ve Aposinin (50mg/kg) + Metotreksat ($p<0.001$) ile arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Aposinin (20mg/kg)+Metotreksat ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grupları arasında farklılık görülmemiştir ($p=0.831$).

Çizelge 4.6. Sıçanların gruplarına göre testosteron değerleri

Gruplar	**Ortalama±Standart Sapma**	**P değeri**
Kontrol	5,05±1,39	0.000
DMSO	3,80±0,77	
Metotreksat	1,49±0,68	
Aposinin(20mg) + Metotreksat	6,26±2,18	
Aposinin(50mg) + Metotreksat	5,60±1,04	



Çizim 4.8. Testosteron düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması.**p<0.001; Kontrol grubu ile Metotreksat grubu kıyaslandığında, *p<0.001; Metotreksat ile Aposinin (20mg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg)+Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2.4. Myeloperoksidaz (MPO) Ölçüm Bulguları

MPO miktarları belirlenirken homojenize edilen testiste protein tayini yapılmıştır. Analiz edilen parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak dokuda nanogram/mg protein, serumda nanomol/mililitre cinsinden elde edilmiştir.

Kontrol grubundaki MPO seviyeleri dokuda 1,31 (1,00-1,45) nanogram/mg proteinve serumda 6,26±1,29 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

DMSO grubundaki MPO seviyeleri dokuda 1,51 (1,19-1,89) nanogram/mg proteinve serumda 7,56±2,15 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

Metotreksat grubundaki MPO seviyeleri dokuda 4,38 (3,49-4,98) nanogram/mg proteinve serumda 8,95±1,45 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubundaki MPO seviyeleri dokuda 1,43 (0,63-1,70) nanogram/mg protein ve serumda 4,70±0,52 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur.

Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubundaki MPO seviyeleri dokuda 1,33 (1,18-1,79) nanogram/mg protein ve serumda 6,12±0,56 nanomol/mililitre olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Gruplar arasında doku seviyelerindeki MPO istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0.001). En yüksek doku seviyelerindeki MPO Metotreksat grubunda görülmüştür. Gruplar arası ikili karşılaştırma da kontrol grubu

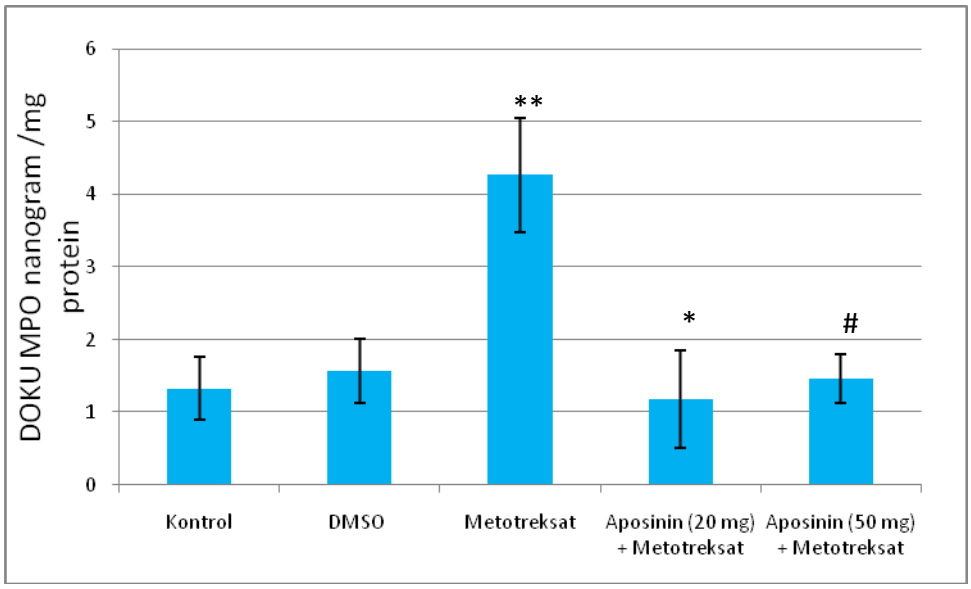
DMSO (p=1.000), Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p=0.100) ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat (p=1.00) ile arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken; Metotreksat grubu (p<0.001) ile anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p=0.001) ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat (p=0.006) grupları arasında farklılık bulunmuştur. Aposinin(20mg)+ Metotreksat ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grupları arasında farklılık görülmemiştir (p=1.000).

Gruplar arasında serum seviyelerindeki MPO istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0.001). En yüksek serum seviyelerindeki MPO Metotreksat grubunda görüldü. Gruplar arası ikili karşılaştırma da kontrol grubu DMSO (p=0.147), Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p=0.058) ve Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat (p=0.998) grupları ile arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken; Metotreksat grubu (p<0.001) ile anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p<0.001) ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat grupları arasında farklılık bulunmuştur (p=0.001). Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat ve Aposinin(50mg/)+Metotreksat grupları arasında farklılık görülmemiştir (p=0.183).

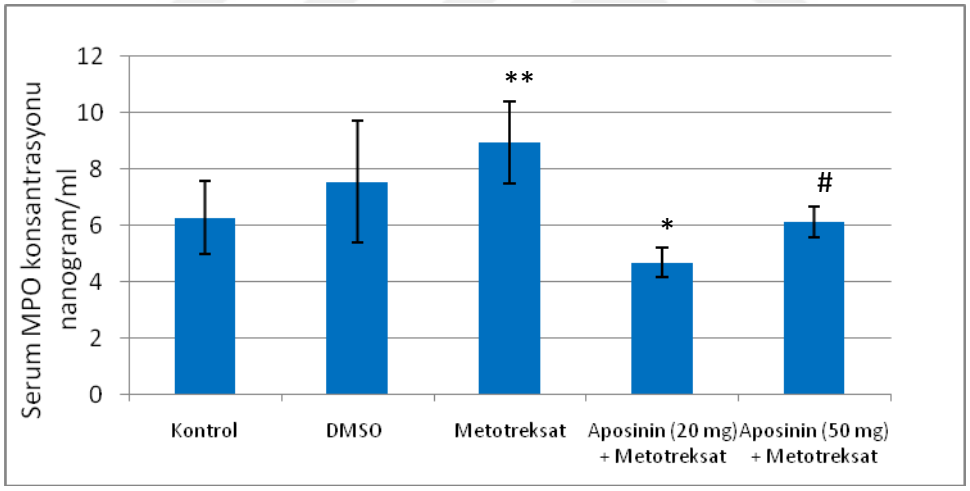
MPO doku ve serum seviyelerindeki değerler arasında farklı sonuçlar bulunmamıştır.

Çizelge 4.7. Sıçanların gruplarına göre doku MPO ve serum MPO değerleri

Gruplar	**MPO (Doku) Nanogram/mg protein Medyan (25-75)**	**MPO (Serum) Nanomol/mililitre Ortalama±Standart Sapma**	**P değeri**
Kontrol	1,31 (1,00-1,45)	6,26±1,29	0.000
DMSO	1,51 (1,19-1,89)	7,56±2,15	
Metotreksat	4,38 (3,49-4,98)	8,95±1,45	
Aposinin(20mg)+Metotreksat	1,43 (0,63-1,70)	4,70±0,52	
Aposinin(50mg)+Metotreksat	1,33 (1,18-1,79)	6,12±0,56	



Çizim 4.9. Doku MPO düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması.**p<0.01; Kontrol grubu ile kıyaslandığında, *p<0.005; Metotreksat ile Aposinin(20mg)+Metotreksat grubu ile kıyaslandığında, #p<0.05; Metotreksat ile Aposinin(50mg)+Metotreksat grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.



Çizim 4.10. Serum MPO düzeylerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması. **p<0.001; Kontrol grubu ile Metotreksat grubu kıyaslandığında,*p<0.001; Metotreksat ile Aposinin(20mg)+Metotreksat grubu kıyaslandığında, #p<0.005; Metotreksat grubu ile Aposinin(50mg)+Metotreksat grubu kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.HİSTOLOJİK BULGULAR

4.3.1. Işık Mikroskobik İnceleme

Işık mikroskobik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinin genel görünümü saptamak için Hematoksilin&Eozin (H&E) boyaları uygulanmıştır. Deney gruplarında değisik derecelerde histolojik yapıda bozukluklara rastlanmıştır. Gözlenen histolojik bozuklukların siddeti 0-3 arasında derecelendirildi. Bunlar; 0: hasar yok, 1: az hasar, 2: orta dereceli hasar, 3: aşırı hasar (Padmanabhan 2008).

Işık mikroskobik değerler istatistiksel olarak incelendiğinde; gruplar arası vakuolizasyon ($p=0.048$), konjesyon (0.006), bazal laminada ayrılma ve lümene dökülen germ hücreleri ($p<0.001$) anlamlı bir farklılık bulunmuştur.

Kontrol grubunu oluşturan sıçan testis örneklerinin interstisyel alan ve seminifer tübüller normal histolojiye sahiptir. Vakuolizasyon ve konjesyon ölçütleri gruplar arası karşılaştırıldığında kontrol grubu ile DMSO, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin (50mg/kg)+Metotreksat grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Bazal laminada ayrılma ve lümene dökülen germ hücreleri ölçütleri gruplar arasında karşılaştırılğında, kontrol grubu ve Metotreksat grubu arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p<0.001$) (Çizim 4.11).

DMSO grubunu oluşturan sıçan testis örneklerinde interstisyel alan ve seminifer tübüller normal histolojiye sahiptir. Vakuolizasyon ölçütü gruplar arası karşılaştırıldığında kontrol grubu ve DMSO, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. DMSO grubu Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında, konjesyon ($p=0.033$), bazal laminada ayrılma ($p=0.006$) ve lümene dökülen germ hücreleri ($p<0.001$) ölçütleri gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir (Çizim 4.12).

Metotreksat uygulanan grupta, düzenli bir interstisyel alan ve seminifer tübül histolojisine rastlanmamıştır. Ayrıca konjesyon ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Metotreksat ve kontrol grubu konjesyon ölçütü için karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p=0.022$). Metotreksat ile tedavi grupları karşılaştırıldığında, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu ($p=0.015$) ve Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat grubu ($p=0.027$) anlamlı farklılık belirlenmiştir. Metotreksat ve kontrol grubu vakuolizasyon ölçütü için karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p=0.006$). Seminifer tübüllerde bazal membranda ondülasyonu gözlenmiştir. Metotreksat ve kontrol grubu bu ölçüt için karşılaştırıldığında, anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p=0.006$). Tedavi grupları ile

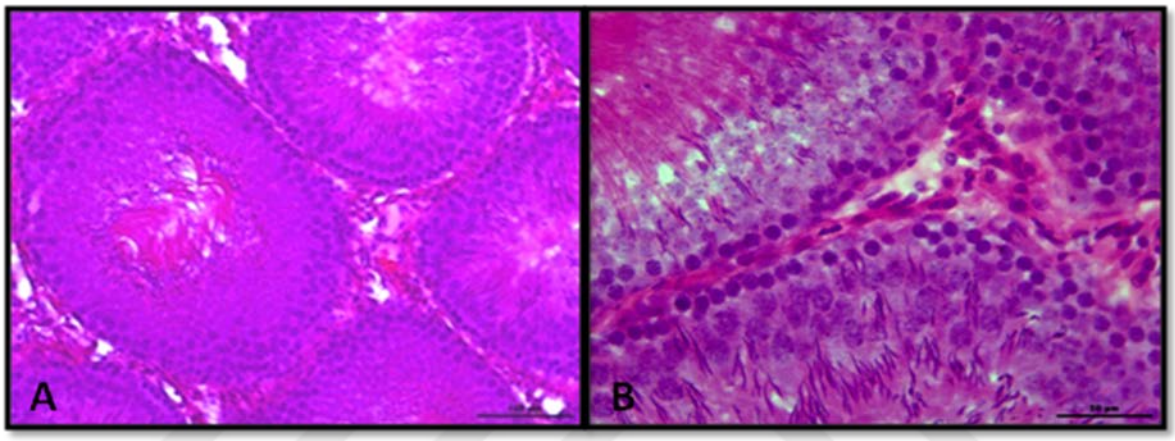
karşılaştırıldığında Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (p=0.001) ve Aposinin(50mg)+ Metotreksat (p=0.001) anlamlı farklılık gözlenmiştir. Ayrıca lümene dökülen germ hücrelerine rastlanmıştır. Metotreksat grubu ile kontrol grubu (p<0.001), Aposinin (20mg/kg)+Metotreksat (p<0.001) ve Aposinin(50mg)+Metotreksat (p<0.001) karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Çizim 4.13).

Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat birlikte verildiği grupların sıçan testis örnekleri üzerinde yapılan ışık mikroskobik incelemelerde, birkaç tübülde hasarın az da olsa devam ettiği görülmekle birlikte, azalmış tübüler hasar ve spermatogonyumlardaki değişimin metotreksat verilen gruptaki kadar yoğun olarak bulunmadıkları saptanmıştır. İnterstisyel alanda konjesyona rastlanmamıştır. Konjesyon ölçütü, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılğa rastlanmıştır (p=0.015). Vakuolizasyon ölçütü, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılığa rastlanmıştır (p=0.001). Bazal lamina ondülasyonu için, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılğa rastlanmıştır (p=0.001). Lümene dökülen epitel germ hücreleri için, Aposinin (20mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılğa rastlanmıştır (p<0.001) (Çizim 4.14).

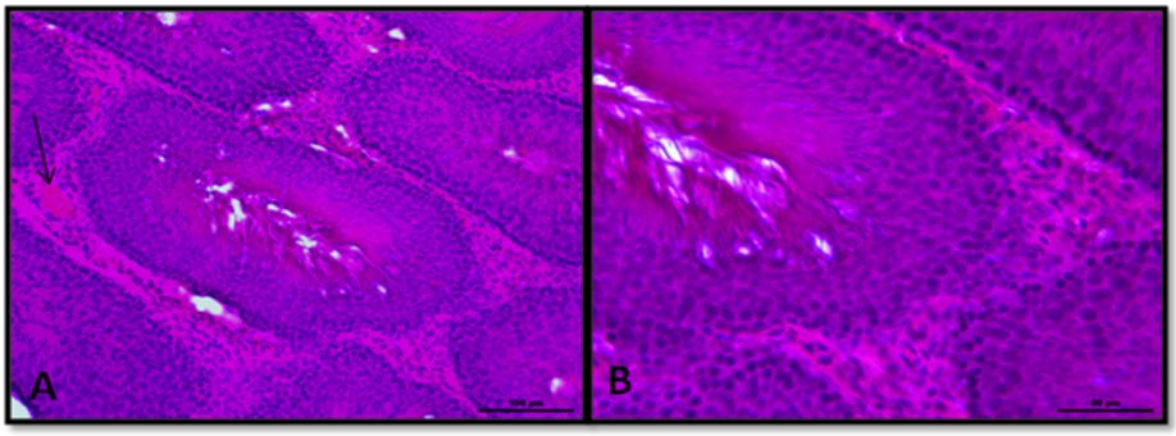
Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat birlikte verildiği grupların sıçan testis örnekleri üzerinde yapılan ışık mikroskobik incelemelerde, birkaç tübülde hasarın az da olsa devam ettiği görülmekle birlikte, azalmış tübüler hasar ve spermatogonyumlardaki değişimin Metotreksat verilen gruptaki kadar yoğun olarak bulunmadıkları saptandı. İnterstisyel alanda konjesyona rastlanmadı. Konjesyon ölçütü, Aposinin(50mg/kg) +Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılğa rastlanmıştır (p=0.027). Vakuolizasyon ölçütü, Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılığa rastlanmıştır (p=0.020). Bazal lamina ondülasyonu için, Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılğa rastlanmıştır (p=0.001). Lümene dökülen epitel germ hücreleri için,

Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (p=1.000); Metotreksat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılğa rastlanmıştır (p<0.001) (Çizim 4.15).

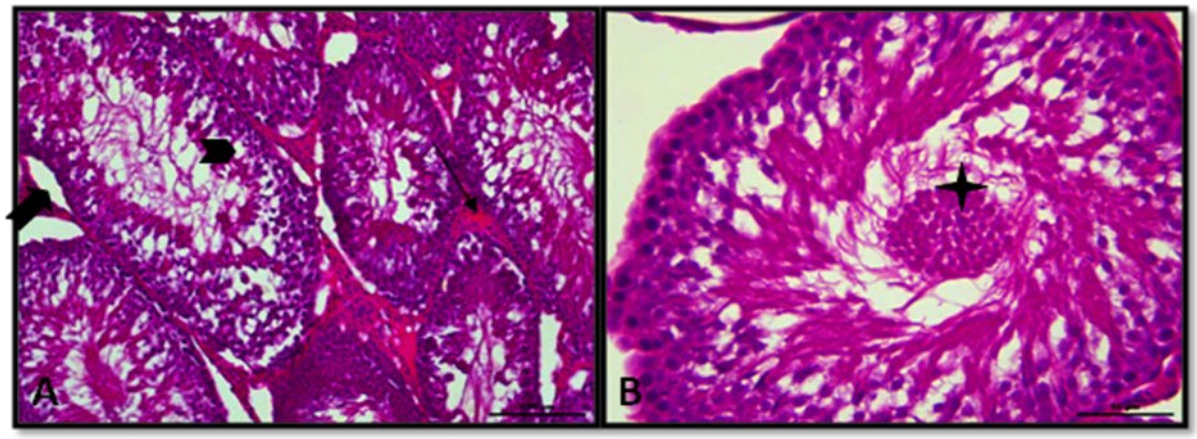
Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu karşılaştırıldığında çok fazla bir farklılık bulunmamıştır. Ancak Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat grubunun daha fazla koruyucu etkisi görülmüştür. Gruplar karşılaştırıldığında, vakuolizasyon (p=1.000), konjesyon (p=1.000), bazal lamina ondülasyonu (p=1.000) ve lümene dökülen germ hücreleri (p=1.000) için karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



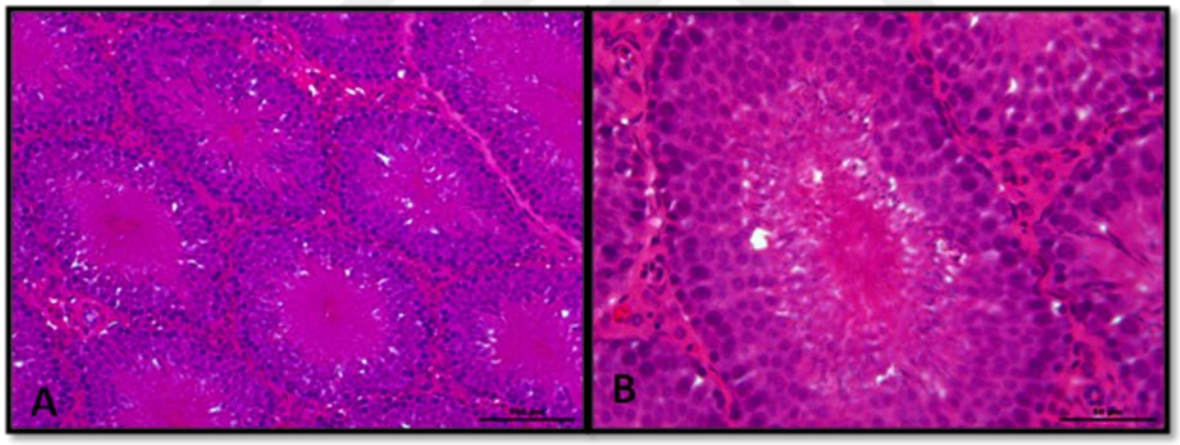
Çizim 4.11. Kontrol grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatojenik hücreler H&E boyamasıyla görülmektedir. [A)20X, B)40X]



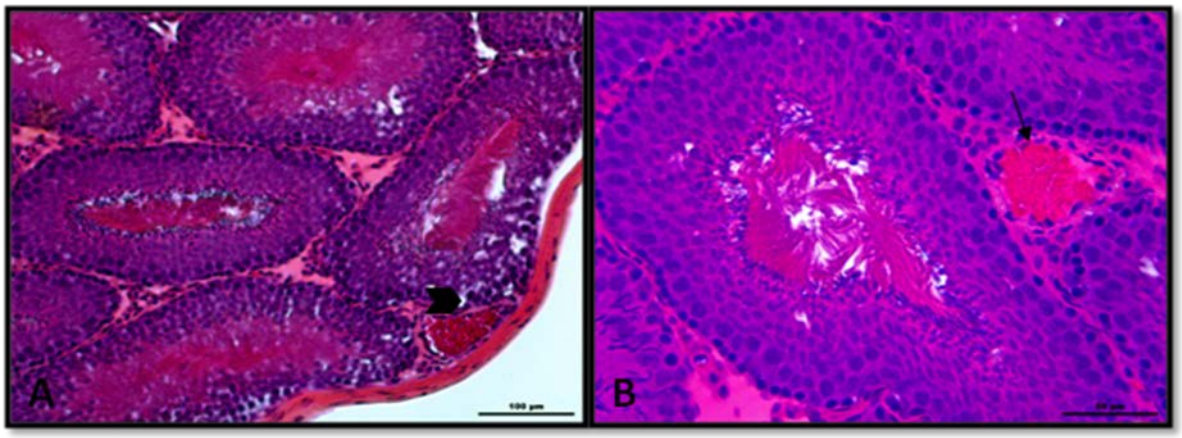
Çizim 4.12. DMSO grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatojenik hücreler, damarlarda konjesyon (⟶) H&E boyamasıyla görülmektedir. [A)20X, B)40X]



Çizim 4.13. Metotreksat grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. Damarlarda konjesyon (⟶), vakuolizasyon ( ), bazal lamina ondülasyonu ( ) ve lümene dökülen epitelyum germ hücreleri ( ) H&E boyamasıyla görülmektedir. [A)20X, B)40]



Çizim 4.14. Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. Normale yakın görünümlü seminifer tübül yapıları, korunmuş spermatojenik hücreler H&E boyamasıyla görülmektedir. [A)20X, B)40X]



Çizim 4.15. Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu sıçan testis dokusunun mikrofotografileri. Normale yakın görünümlü seminifer tübül yapıları, korunmuş spermatojenik hücreler, konjesyon (⟶) ile vakuolizasyon (➡) H&E boyamasıyla görülmektedir. [A)20X, B)40]

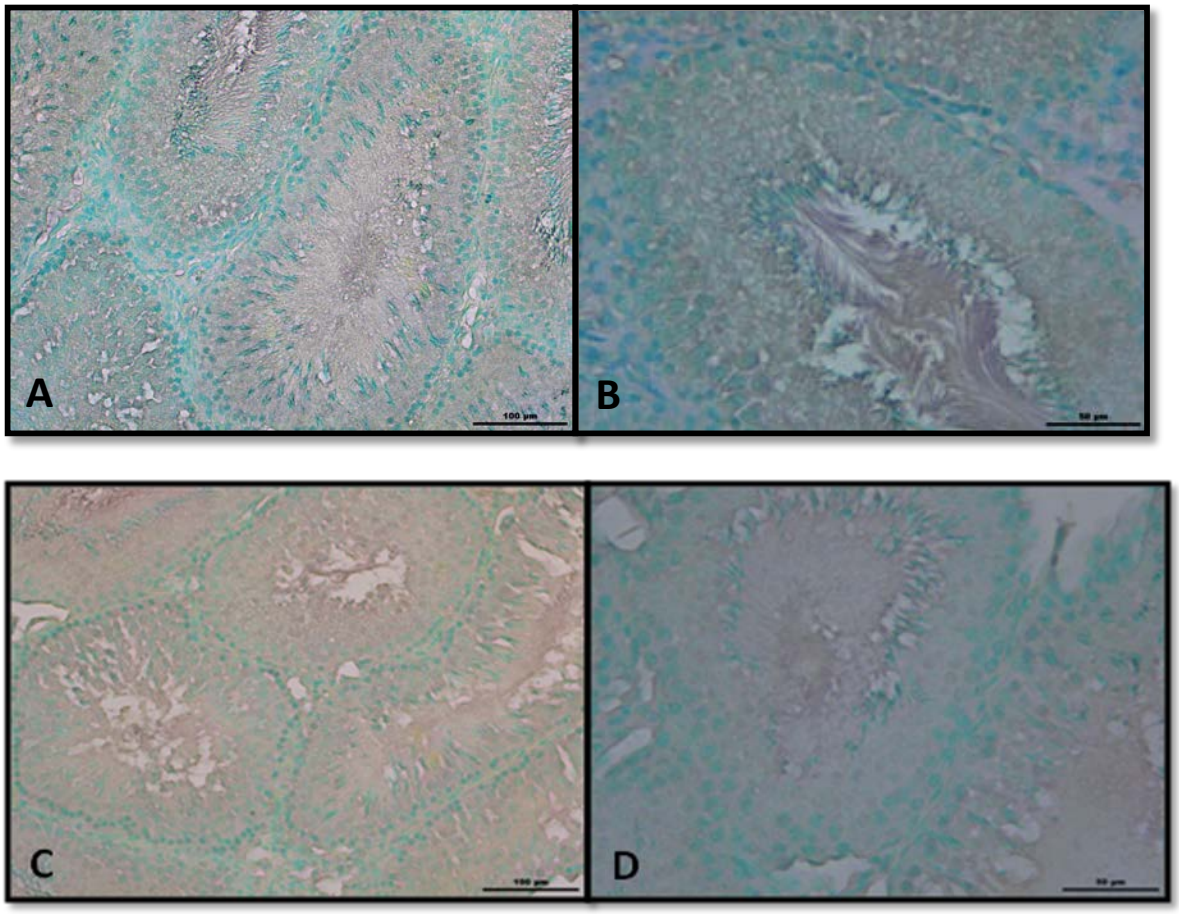
4.3.2. Tunel Boyaması Bulguları

Tunel (dUTP) boyama yöntemi hücre çekirdeğindeki DNA fragmantasyonu analiz etmeye yarayan bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde apoptoza giren hücreleri belirlemek münkündür. Tunel boyama yöntemiyle seminifer epitel başta olmak üzere apoptoza uğrayan hücrelerin analizi yapılmıştır. 200X objektif çekimlerinde bir örnek 30 seminifer tübül değerlendirilip apoptotik hücreler sayılmıştır ve toplam hücre sayısına bölünerek apoptotik indeksleri bulunmuştur (Padmanabhan 2008).

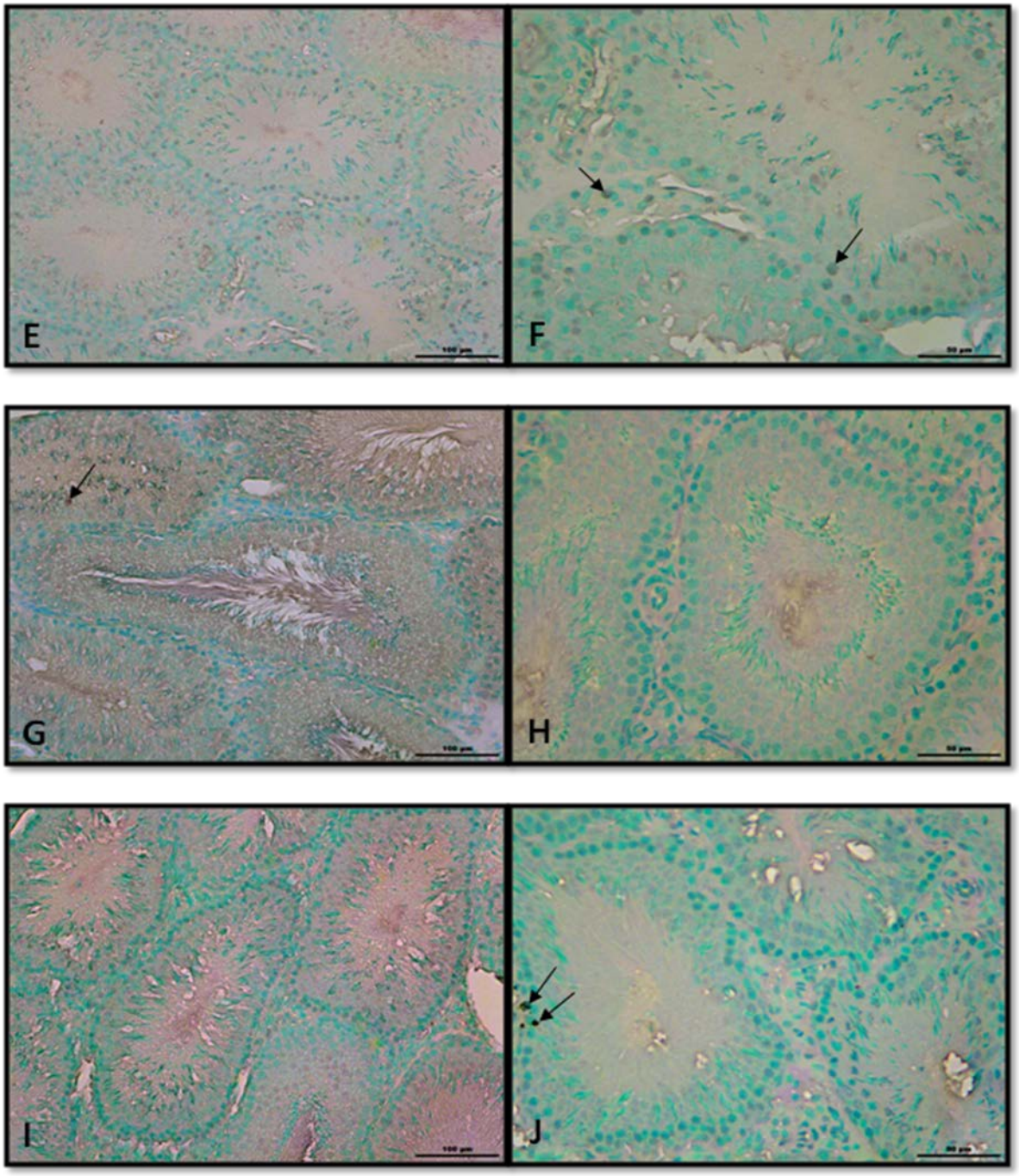
Gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0.002).Kontrol grubu ile Metotreksat grubu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık görülürken (p=0.011); DMSO, Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat ve Aposinin (50mg/kg)+Metotreksat grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p=1.000). Metotreksat grubu ile Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklılık bulunmuştur (p=0.002). Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat grubu ile Aposinin(50mg/kg)+Metotreksat grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında farklılığa rastlanmamıştır (p=1.000) (Çizim 4.16-4.17).

Çizelge 4.8. Gruplara göre apoptotik indeks

Gruplar	**Apoptotik İndeks Medyan (25-75)**	**P Değeri**
Kontrol	0.000 (0.000-0.023)	0.002
DMSO	0.008 (0.000-0.035)	
Metotreksat	0.161 (0.119-0.200)	
Aposinin(20mg)+Metotreksat	0.000 (0.000-0.005)	
Aposinin(50mg)+Metotreksat	0.009 (0.000-0.015)	



Çizim 4.16. Tunel boyaması ile boyanmış testis dokusu kesitlerinin mikrofotografileri. A. Kontrol grubu (20X), B. Kontrol grubu (40X), C. DMSO grubu (20X), D. DMSO grubu (40X).



Çizim 4.17. Tunel boyaması ile boyanmış testis dokusu kesitlerinin mikrofotografileri. Metotreksat grubunda apoptotik spermatogonialar ( ) görülmektedir.

E.Metotreksat grubu (20X), F. Metotreksat grubu (40X), G.Aposinin(20mg/kg)+ Metotreksat (20X), H.Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (40X), I.Aposinin (50mg/kg)+ Metotreksat (20X), J.Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat (40X).

5. TARTIŞMA

Çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biri kanserdir ve ülkemizde kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir. Tedavi yöntemleriyle kanser hastalarının yaşam sürelerinin uzatılması ve daha kaliteli hayat yaşamaları amaçlanmıştır (Dedeli ve diğ. 2008). Kemoterapi kanser tedavi yollarından birisidir. Bu tedavide kullanılan çoğu ilacın toksik yan etkiler ürettiği bilinmektedir (Prahalathan ve diğ. 2005).

Kemoterapötik ilaçların, kanserli olmayan normal doku ve hücrelerde farklı seviyelerde neden olduğu yan etkileri vardır. Üreme sisteminde meydana getirdiği etkilerden bir tanesi erkek infertilitesidir. Spermatogeneziste meydana gelen aksaklıklar, sperm kalite parametrelerindeki bozukluklar, hipotalamus, hipofiz ve gonad eksenindeki fonksiyon bozuklukları yan etkiler arasında sayılmaktadır. Testis dokusunda bulunan Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen bu ilaçlara dirençli iken, germinal epitelyum bu ilaçlara karşı çok hassastır. Ancak germinal epitelyumdaki kök hücrelerin sağlam kalma durumuna göre tedavinin sonlanmasıyla birlikte spermatogenezis geri gelebilmektedir (Türk 2013). Erkek sıçanlara cisplatin ve adriamisin gibi kemoterapötik ilaçların uygulanması, eşey hücrelerinin dökülmesine ve dejenerasyonuna neden olmaktadır (Kim ve diğ. 1999). Bizim çalışmamızda metabolik yolakları bozarak antitümör etki gösterdiğini bildiğimizmetotreksat da benzer etki göstererek seminifer epitelde germ hücrelerinin hasarlanmasına, vakolizasyonuna ve döklümesine neden olduğu görülmüştür.

Metotreksat bir folik asit antimetabolitidir ve hücre siklusunun "S" fazındaki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar. Kemik iliği, gastrointestinal mukoza, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler ilacın etkisine çok duyarlıdırlar. Metotreksat'ın bu hücreler üzerine olan yan etkilerini engellemek için Metotreksat ile birlikte bazı ilaçlarında tedaviye eklenmesi gerekmektedir. Literatürde Metotreksat toksisitesine karşı kullanılan E vitamini, resveratrol, β-karoten, kafeik asit gibi çok sayıda antioksidan maddelerle yapılan çalışmalar vardır (Yüncü ve Kanter 2006, Yuluğ ve diğ. 2013, Vardi ve diğ. 2008, Armağan ve diğ. 2008). Aposinin NOX ailesinin en selektif inhibitörlerinden biridir. NADPH oksidaz O^{-}_{2} oluşumunda rol alan bir enzimdir. Reaktif oksijen radikalleri birçok reaksiyonla toksik H_2O_2, ONOO, NO'e dönüşür. Aposinin'in antioksidan savunma sistemini, GSH'ı arttırdığı ve hücresel stresi sınırladığı belirtilmiştir (Liu ve diğ. 2008).

Literatür tarandığında testisin metotreksat ile indüklenmesiyle oluşan oksidatif stresin Aposinin'in koruyucu etkisi için yapılan hiçbir çalışma yoktur. Biz de çalışmamızda metotreksatın testiküler doku hasarına karşı Aposinin'in koruyucu etkisini araştırmayı

amaçladık. Bu çalışmada Metotreksat uygulanan grupta germinal epitelde vakuolizasyon, bazal lamina ondülasyonu, konjesyon ve lümene immatür germ hücrelerin döküldüğü seminifer tübüller gözlenmiştir. Seminifer tübül lümenine immatür germinal hücrelerin döküldüğü tübül sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bulgular germinal epitelde önemli derecede hasar oluşturduğunu göstermektedir.

Kemoterapi ilaçlarının eşey hücrelerinde apoptoza neden olduğu birçok çalışmada bildirmişlerdir. Apoptoz, kemoterapi ilaçlarının spermatogenetik hücrelerde oluşturduğu hasarın önemli bir göstergesidir (Prahalathan ve diğ. 2005, Amin ve diğ. 2008,Yuluğ ve diğ. 2013).

Fareler üzerinde yaptığı çalışmada, Metotreksat uygulanan grupta apoptoza uğrayan hücrelerin arttığını; Metotreksat'tan önce verilen doz-bağımlı folik asit ve Metotreksat'tan sonra verilen doz-bağımlı folinik asit gruplarında ise apoptotik hücrelerin azalmış olduğu bildirilmiştir. Metotreksat'ın germ hücreleri üzerine yaptığı toksik etkiyi folik asit ve folinik asitin en aza indirgediğini göstermiştir (Padmanabhan ve diğ. 2008).

Yine fareler üzerinde yaptıkları çalışmada Metotreksat uygulanan grupta apoptoza uğrayan hücrelerin arttığını; Timokinon+Metotreksat uygulanan grupta ise apoptotik hücrelerin azalmış olduğunu göstermişlerdir (Sheikhbahae ve diğ. 2016).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada Metotreksat uygulanan grupta apoptoza uğrayan hücrelerin arttığı; Resveratrol uygulanan grupta ise apoptotik hücrelerin azalmış olduğunu gösterilmiştir (Yuluğ ve diğ. 2013).

Bizim çalışmamızda ise Metotreksatın germ hücreleri DNA'sına verdiği zararı ve sitotoksisitesini belirlemek amacıyla Tunel metoduyla apoptoz belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler, Metotreksat grubundaki apoptotik indeksin diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığını, diğer gruplarda ise apoptotik etkiyi azalttığını göstermiştir. Buna göre, Metotreksat'ın germinal hücrelerin DNA'sına zarar vererek sitotoksisiteye neden olduğu sonucuna vardık (Jahovic ve diğ. 2003). Bulgularımız diğer çalışmalarla birbirlerini destekler niteliktedir.

Birçok araştırmada oksidatf stresin oluşturduğu testis hasarını belirlemek amacıyla oksidatif stres belirteci olan MDA ölçmüşlerdir (Gokce ve diğ.2010). MDA seviyeleri, LPO'nun artmasından dolayı serbest radikal üretilmesinde önemli bir belirteçtir (Draper ve Hadley 2010). Farklı çalışmalarda Metotreksat'ın uygulanmasıyla birlikte kan, karaciğer, testis ve böbrek MDA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Jahovic ve diğ. 2004, Armağan ve diğ. 2008).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada tek doz Metotreksat uygulanması sonucu, testis dokusunda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Armağan ve diğ. 2008). Başka bir çalışmada, Metotreksat uygulanan grupta MDA seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır (Yüncü ve diğ. 2015). Aynı şekilde Daggulli M. ve diğ. yapmış olduğu çalışmada da Metotreksat uygulanan grupta MDA seviyelerinin diğer gruplara göre artmış olduğunu göstermişlerdir (Daggulli ve diğ. 2014).

Metotreksat ile uyarılan testis hasarına karşı beta-karoten'in antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Metotreksat grubundaki MDA seviyesinin β-karoten+Metotreksat grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir (Vardi ve diğ. 2008).

Metotreksat ile uyarılan testis hasarlanmasında Resveratrol'ün etkileri ile ilgili bir çalışmada, Metotreksat grubundaki MDA seviyesinin Resveratrol+Metotreksat grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir (Yuluğ ve diğ. 2013).

Takhtfooladi M.A. ve diğ. yaptıkları çalışmada da iskemi-reperfüzyon ile indüklenmiş sıçan testislerinin Kurkumin ile koruyucu etkisine bakmışlar ve iskemi-reperfüzyon grubundaki MDA değerinin diğer gruplara göre daha yüksek çıktığını göstermişlerdir (Takhtfooladi ve diğ. 2015). Özbek Ö. ve diğ. yaptıkları çalışmada ise MDA değerleri iskemi-reperfüzyon grubunda artarken, iskemi-reperfüzyon+Aposinin grubunda azalmıştır (Ozbek ve diğ. 2014). Bizim çalışmamızda ise MDA'yı hem testis dokusunda hem de serumda ölçülerek oksidatif stres belirlenmiştir. Her iki örnek için; kontrol grubu ile Metotreksat grubu arasında anlamlı olarak farklılık görülürken, diğer gruplar arasında ise bir farklılık belirlenmemiştir. Buradan yola çıkarak, Metotreksat'ın LPO'yu arttırarak oksidatif stres oluşturduğunu söyleyebiliriz.

MPO, NO metabolizmasında yer alan nitrit, nitrat ve peroksidasyon işlemlerinde rol alan bir enzimdir. Antioksidan kapasitedeki azalmanın yanı sıra oksidatif stres düzeyini gösteren bir belirteçtir. Altintaş R. ve diğ., sıçanlara böbrek iskemi-reperfüzyon ile oksidatif stres yaratıp aposinin üzerine yaptıkları bir çalışmada MDA ve MPO düzeyleri iskemi-reperfüzyon grubunda anlamlı olarak yüksek bulunurken; tedavi gruplarında ise anlamlı olarak azalmış bulunmuştur (Altintaş ve diğ. 2013). Özbek Ö. ve diğ.'nin yapmış oldukları iskemi-reperfüzyon ile indüklenmiş testis üzerine Aposinin koruyucu etkisi çalışmasında MPO, iskemi-reperfüzyon grubunda artarken; Aposinin grubunda ise azaldığı bulunmuştur (Ozbek ve diğ. 2014).Takhtfooladi M.A. ve diğ., yaptıkları çalışmada da iskemi-reperfüzyon ile indüklenmiş sıçan testislerinin kurkumin ile koruyucu etkisine bakmışlar ve iskemi-reperfüzyon grubundaki MPO değerinin diğer gruplara göre daha

yüksek çıktığını göstermişlerdir (Takhtfooladi ve diğ. 2015). Bizim çalışmamızda da Metotreksat uygulanan grupta MPO seviyeleri artarken; Aposinin gruplarındaki seviyeler azalmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında benzer çalışmalarla örtüşmektedir.

Nouri HS. ve diğ., yaptıkları çalışmada testosteron seviyeleri kontrol grubu ile Metotreksat ve Metotreksat+büyüme faktörü karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmüştür (Nouri ve diğ. 2008). El-Sheikh AA. ve diğ. yaptıkları çalışmada metotreksat grubu ile kontrol grubunu karşılaştırdıklarında Metotreksat grubunda önemli derecede azalma görülürken, Resveratrol grubu ile karşılaştırdıklarında ise anlamlı bir artış gözlenmiştir (El-Sheikh ve diğ. 2014). Li M. ve diğ. yapmış oldukları diyabetik sıçanların testisleri üzerindeki oksidatif stresde Aposinin'in etkisi ile ilgili çalışmada testosteron seviyeleri diyabetik grupta önemli derecede azalırken, Aposinin grubunda ise önemli derecede artmıştır. Aynı çalışmada apoptotik hücreler için Aposinin uygulanan grupta diyabetli gruba göre daha azalmış olduğu belirtilmiştir (Li ve diğ. 2013).

GSH; tüm memeli canlı hücrelerinde bulunan hücreler, serbest radikal ve toksik metabolitlere karşı koruyan bir –SH bileşiğidir. GSH ve diğer –SH içeren bileşikler, kimyasal maddelerin oluşturduğu hücre ve doku hasarına karşı hücrenin canlılığını ve membran stabilitesini korumaktadırlar. GSH'ın –SH bileşiklerinin dokular üzerine koruyucu rolü çeşitli çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Özbek Ö. ve diğ. yapmış olduğu çalışmada GSH değerinin iskemi-reperfüzyon ile hasarlanmış grupta azaldığını Aposinin grubunda ise arttığını göstermiştir (Ozbek ve diğ. 2014). Bu çalışmada süperoksit radikallerindeki artışın GSH gibi antioksidan etkisi olan tiyollerin aşırı tüketimi ve azalmasıyla sonuçlandığını göstermiştir.

Liu X. ve diğ. çalışmasında sıçan testislerinde kadmiyum ile indüklenerek oluşturulan oksidatif hasarın β-kriptoksantin koruyucu etkisi çalışmalarında β-kriptoksantin grubu ile kadmiyum grubu apoptotik hücre bakımından karşılaştırıldığında β-kriptoksantin grubunda apoptotik hücrelerin azaldığı görülmüştür. MDA'nın ise kadmiyum grubunda anlamlı olarak arttığı, GSH'ın ise azaldığı belirtilmiştir (Liu ve diğ. 2016).

Şener TE. ve diğ. yapmış olduğu çalışmada ise, MDA seviyeleri için iskemi-reperfüzyon grubunda arttığını, Aposinin 20mg/kg ve Aposinin 50mg/kg dozlarında azaldığını fakat Aposinin 50mg/kg dozunda daha anlamlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca GSH parametresi için Aposininin her iki dozu içinde anlamlı fakat yüksek doz için daha efektif olduğu gösterilmiştir. Nötrofil infiltrasyon indikatörü olan MPO ise iskemi-reperfüzyon+Aposinin gruplarının her ikisinde de azalmasına rağmen 20mg/kg olan grupta daha enzim aktivitesi görülmektedir (Şener ve diğ. 2014). Bu çalışma doz bakımından

bizim çalışmamızla uyuşmasına rağmen sonuçları bakımından örtüşmemektedir. Biz her iki dozun etkilerinin görüldüğünü fakat Aposinin (20mg/kg) dozunun daha efektif olduğu sonuca vardık.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Radyoterapi ve kemoterapi ilaçları serbest radikal üretimine neden olarak hücre ölümü ile sonuçlanır. Metotreksat tedavisi alan erkeklerde, yeni spermatozoon oluşumunun hasarına bağlı oluşan infertilite önemli bir sorundur.

Metotreksat antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltır ve hücreleri reaktif oksijen partikülleri'ne karşı hassas hale getirir, bu da testiste hasara neden olur. Testis bu hasardan korunabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve ROS bulundurmaktadır. Aposinin antioksidan savunma sistemini, GSH'ı arttırdığı ve hücresel stresi sınırladığı bilinmektedir. Bu bilgilere dayanarak bizim çalışmamızda, Metotreksatın testiste oksidatif kaynaklı meydana getirdiği hasarın bir antioksidan ile koruyucu ve tedavi edici olarak uygulanmasının olumlu etkileri biyokimyasal ve histolojik olarak araştırılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçları şu şekilde açıklamak mümkündür:

1. Kontrol ve DMSO grubu interstisyel alan ve seminifer tübüller açısından normal bir histolojik yapıya sahiptir. Vakuolizasyon, lümene dökülen immatür germ hücreleri, bazal lamina ondülasyonu, konjesyona ve apoptoza rastlanmamıştır. Biyokimyasal olarak, MDA, GSH, MPO ve testosteron seviyeleri normal bulunmuştur.

2. Metotreksat uygulanan grupta, histolojik olarak vakuolizasyon, lümene dökülen immatür germ hücreleri, bazal lamina ondülasyon, konjesyona ve apoptoz diğer gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklılık bulunmuştur. Biyokimyasal olarak, MDA ve MPO seviyelerinde anlamlı olarak artmışken, GSH ve testosteron seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır. Aynı zamanda ilaç uygulanmadan önceki vücut ağırlığı ile uygulandıktan sonraki vücut ağırlığı arasında azalmış bir şekilde fark olduğu belirlenmiştir. Testis ağırlığı bakımından ise diğer gruplara oranla azalmıştır.

3. Aposinin(20mg/kg)+Metotreksat histolojik ve biyokimyasal olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık belirlenmemesine rağmen apoptotik hücreler az da olsa görülmüştür.

4. Aposinin(50mg/kg)+ Metotreksat grubunda ise vakuolizasyon, konjesyona ve apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Biyokimyasal olarak Aposinin(20mg/kg) dozuna yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Bu bulgular doğrultusunda Metotreksat'ın testiste oksidatif hasar oluşturarak yapısal bozukluklara neden olduğunu; Aposinin'in antioksidan etkisiyle, Metotreksat'ın testiste oluşturduğu bu oksidatif hasarı düzelttiğini ve tedavi grupları arasında bakıldığında, Aposinin(20mg/kg)'lık dozun daha faydalı olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abraham L. Üreme Sistemi, Histoloji ve Hücre Biyolojisi (1.Baskı). Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.

Ackermann U. Pdq fizyoloji. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2006.

Akkus I. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza, Konya, 1995.

Aktümsek A. Anatomi ve fizyoloji insan biyolojisi (3.Baskı), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006

Akyol H. Kemoterapinin temel ilkeleri, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi Hemşire Programı, 2004.

Altıntaş R, Polat A, Vardi N ve diğ. The protective effects of Apocynin on kidney damage caused by renal ıschemia/reperfusion. *J Endourol*. 2013; 27(5):617-24.

Amin A, Hamza AA, Kambal A ve diğ. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl*. 2008; 10: 291–297.

Anderson D, Costas I Cytochromes P450 Role in the metabolism and oxicity of drugs and other xenobiotics. *Royal Society of Chemistry*. 200; s.6–352.

Aran M Klinikte kanser kemoterapisi. Sermet matbaası, İstanbul, 1974.

Arıncı K, Elhan A Anatomi (4.Cilt). Güneş Kitapevi, Ankara, 2006.

Armagan A, Uzar E, Uz E ve diğ. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stres in testes of rat. *Human & Experimental Toxicology*. 2008; 27: 547–552.

Arora V, Kuhad A, Tiwari V ve diğ. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain—depression dyad: Behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36: 1570—1581.

Aslankara N, Aksel N, Çakan A ve diğ. Plevral tutulum gösteren bir romatoid artrit olgusu. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*. 2007; Cilt XXI, Sayı 3.

Aşcı H Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 2010.

Ata C Erişkin erkek sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş bor toksisitesi üzerinde E vitamininin rolü. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2009.

Berk M, Ng F, Dean O ve diğ. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008; 29-7.

Bilge N. Klinik Onkoloji Hekimler ve Tıp Öğrencilerine. İstanbul, 1981.

Bloom W, Fawcett DW A textbook of histology. Chapmann&Hall, London, 2002.

Borgen PI, Wong GY, Vlaims V ve diğ. Current management of male breast cancer. *Ann Syrg*. 1992; 215(5): 451-457.

Bozan E, Gürelik G. Proliferatif vitreoretinopati tedavisinde yeni deneysel ajanlar. Ret – Vit 2004; 12 : 214 - 223.

Bozdoğan S. Erişkin erkek sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi. Yüksek Lisans Tezi.Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.
Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52:302-10.

Burukoğlu D ve Bayçu C. Protective effects of zinc on testes of cadmium-treated rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008; 81(6):521-4.

Calkins CM, Bensard DD, Heimbach JK ve diğ. L-arginine attenuates lipopolysaccharşde induced lung chemokine production. *Am J Phusiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 280(3): L400-408.

Chiang CH, Chuang CH, Liu SL. Apocynin attenuates ischemia-reperfusion lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Trans Res.* 2011; 158: 17- 29.

Chirino YI, S´anchez-Gonz´alez DJ, Mart´ınez-Mart´ınez CM ve diğ. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology*. 2008; 245:18–23.

Choudhury RC, Ghosh SK, Palo AK. Potential transmission of the cytogenetic toxic effects of methotrexate in the male germline cells of Swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2001; 10/ 81 – 88.

Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS ve diğ. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol*. 2007; 33(5): 603-21.

Çeribaşı AO, Türk G, Sönmez M ve diğ. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology,testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2010; 107, 730–736.

Daggulli M, Dede O, Utangac MM ve diğ. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Int J Clin Exp Med* .2014;7(12):5511-5516.

Dean RT, Fu S, Stocker R ve diğ. Biochemistry and pathology of adical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997; 324 Pt 1:1-18.

Dedeli Ö, Fadıloğlu Ç,Uslu R. Kanserli bireylerin fonksiyonel durumları ve algıladıkları sosyal desteğin incelenmesi. 2008; 23(3): 132-139.

Dere F. Anatomi atlası ve ders kitabı, Nobel tıp kitabevleri, Adana, 1999.

Deveci HA. Mastitisli (meme iltihabı) ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerinin Arastırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı, 2007.

Doddo JM, Welsh LE, Salazar JD ve diğ. Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypassinduced lung injury. American Journal of Physiology. 2004; 287(2): H927–H936.

Dökmeci İ. Farmakoloji ilaçlar ve etkileri (1.Baskı), Alfa Yayınları, İstanbul, 2007.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 421–431.

El-Sheikh AAK, Morsy MA, Al-Taher AY Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life Sciences*. 2014; 119: 40–46.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Bio chem Biophys.* 1959; 82: 70-77.

Engels F, Renirie BF, Hart BA ve diğ. Effects of apocynin a drug isolated from the roots of Picrorhiza Kurroa, on arachidonic acid metabolism. *FEBS letters.* 1992; 305: 254-256.

Eray İC. Deneysel kolit modeli üzerine glutamin, N-asetil sistein ve intrarektal Metotreksat'ın etkilerinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı. 2009.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemitry of 4- ytdroxynoneal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* .1991; 11(1): 81-128

Fomenko DE, Koc A, Agisheva N ve diğ. Thiol peroxidases mediate specific genome- wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(7): 2729-34.

Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E ve diğ. Cancer and genomics. *Nature*. 2001; 409: 15.

Gartner LP ve Hiatt JL. Color Textbook of Histology (2. Baskı), 2003.

Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology (3.Baskı) 2007; p 489-511.

Gartner LP ve Hiatt JL. Color Textbook of Histology (2. Baskı), 2016.

Gokce A, Oktar S, Koc A ve diğ. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Human and Experimental Toxicology*. 2010; 000(00): 1-7.

Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid eroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*. 1990; 15(4): 129-35

Halliwell B, Gutteridge JM. The definition at measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 1995; 181: 125-6

Halliwell B, Gutteridge JMc. Free radical in biology and medicine (Third ed). Oxford: Oxford University Press, 2000.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. 2004: 142, 231-255.

Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 1972; 48 (2):422-427.

Isık A, Isılay L, Erdemli EA ve diğ. Sıçan testisinde Metotreksatın ısık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 1997; 50 (3): 125-129.

Jahovic N, Çevik H, Şehirli AÖ ve diğ. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of Pineal Research*. 2003; 34:282–287.

Jahovic N, Sener G, Çevik H ve diğ. Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct*. 2004; 22(3): 169-178.

Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (Çeviri: Aytekin Y., Solakoğlu S.) 10. Baskıdan Çeviri Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2009.

Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO ve diğ. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. J. Pineal Res. 2003; 34: 282-287.

Jahovic N, Sener G, Cevik H ve diğ. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct*. 2004; 22: 169–178, 32.

Kane D, Gogarty M, O'Leary J ve diğ. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with Methotrexate. *Arthrıtıs & Rheumatısm*. 2004; 50(10): 3286–3295.

Kantemir İ. Kanser ve tedavisi (Özellikle kemoterapi). Güzel İstanbul Matbaası, Ankara, 1969.

Karaaslan FJ. Erişkin erkek sıçanlarda etan dimetan sülfonat ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2009.

Karyağar EN. Uzun süreli Metotreksat tedavisi alan jüvenil idiyopatik artritli çocuklarda folik asit desteğinin plazma total homosistein düzeyine etkisi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, 2006.

Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji (13.Baskı). Pelikan Yayıncılık, Ankara,2012.

Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anti cancer agent, in rats. *Reproductive Toxicology*. 1999; 13(5): 391- 397.

Krakower GA, Kamen BA. In situ Methotrexate polyglutamate formation in rat tissues. *The Journal Of Pharmacology And Experımental Therapeutics*. 1983; 227(3).

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal Inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*. 1984; 87: 1344-50.

Kudo M, Nishikawa M, Ikeda H ve diğ. Involvement of superoxide anions in ozone-induced airway hyperresponsiveness in unanesthetized guinea pigs. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1996; 2(1): 25–30.

Kutluana U, Oruç N, Yılmaz M ve diğ. Ratlarda metotreksata bağlı oksidatif intestinal hasarda leflunomidinin koruyucu etkisinin araştırılması. Akademik gastroentroloji dergisi. 2011; 10 (1): 23-27 s.

Küçüksu MN, Ruacan ŞA. Klinik onkoloji. Ankara, 1978.

Li M, Lıu Z, Zhuan L ve diğ. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Molecular medıcıne reports*. 2013; 7: 47-52, 2013.

Liu PG, He SQ, Zhang YH ve diğ. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(18): 2832-2837

Liu XR, Wang YY, Fan HR ve diğ. Preventive effects of β-cryptoxanthin aganist cadmium-induced oxidative stres in the rat testis.*Asian Journal of Andrology*.2016; 18,1-5.

Meistrich ML. Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. Acta Pzediatr Suppl. 1999; 433: 19-22.

Maskar Ü.,Embryoloji, Sermet matbaası, İstanbul, 1969.

Mocan Kuzey G. Temel patoloji. Güneş Kitabevi, İstanbul-Ankara, 2007.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The Developing Human (9.Edition) Elsevier Saunders, Canada, 2013.

Naito Y, Lee MC, Kato Y ve diğ. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicin.* 2010; 7(5): 36–44.

Nauseef WM. Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited eficiency. *J Mol Med*. 1998; 76: 668-661. 50.

Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia*. 2009; 41: 105–110.

Oktar S, Gökçe A, Aydin M ve diğ. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice, Toxicology and Industrial Health. 2010; 26: 433.

Olah E. Basic concepts of cancer: genomic determination. *The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine*. 2005; 16(2).

Olgun N, Şimşek H. Kemoterapi hazırlayan ve uygulayan hemşirelerin güvenlik önlemlerini kullanma durumları ve önlem almalarını etkileyen faktörler. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi. 2010. s 13–23.

Ozbek O, Altintas R, Polat A ve diğ. The protective effect of Apocynin on testicular ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Urology*. 2015;193(4): 1417-22.

Özalp Dural EA. Farmakoloji (4. Baskı), Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, 2008.

Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A ve diğ. Methotrexate induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice:Intervention of folic and folinic acid. Mutation Research. 2008; 673/s 43–52.

Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A ve diğ. Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. Mutation Research. 2008; 655/59–67.

Pan MH, Huang TM, Lın AK. Biotransformation of Curcumin through reduction and glucuronidatıin in mice. *Drug Metabolism And Disposition*. 1998;27.

Patton H. Textbook of physiology. Nobel yayınları. İstanbul, 1989.

Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. Clin Chim Acta. 2005; 360: 160–166.

Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2010; 10: 92-102.

Riganti C, Costamagna A, Bosia G. The NADPH oxidase inhibitor Apocynin (acetovanillone) induces oxidative stres. *Toxicology and Applied Pharmacology*.2006; 212(3):179–187.

Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ ve diğ. Lipid Peroxidation products and antioxidants in human disease.*Environmental Health Perspectives*. 1998:106 (5).

Ross MH, Pawlina W.Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5. Edition, Lippincott W&W, Philadelphia. : Lippincott W&W. 2014, 784-829 p.

Sabanegh ES, Ragheb AM. Male fertility after cancer. Urology. 200973: (2) 225–231.

Sadler TW. Langman‘s medikal embriyoloji. Palme Yayıncılık. Ankara, 2004.

Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel anatomi baş-boyun ve iç organlar (2. Baskı) ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-METU Press, Ankara, 2002.

Sarıkaya M, Yıldırım M, Sarı F. Hemodiyaliz uygulanan hastalarda kemoterapi. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2013.

Savran M. Ratlarda Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında C vitamininin koruyucu etkisinin araştırılması.Tıpta Uzmanlık Tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. 2011.

Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S ve diğ. Effect of chronic low dose of Methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis ın rats. *Archives of Andrology*. 2004; 50:33–35.

Schrader M, Müller M, Straub B ve diğ.The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reproductive Toxicology*. 2001; 15-611–617.

Sener G, Eksioglu-Demiralp E, Çetiner M ve diğ. Beta glucan ameliorates methotrexate induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Europen Journal Pharmacology*. 2006; 542 (1-3):170-8.

Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological amples. *Drug Metab Rev*. 2000; 32 (3-4):307-26.

Sheikhbahaei F, Khazaei M, Rabzia A ve diğ. Protective effects of Thymoquinone against Methotrexate-induced germ cell apoptosis in male mice. *Int J Fertil Steril*. 2016; 9(4): 541-547.

Sierens J E, Sneddon SF, Collins F ve diğ. Estrogens in testis biology. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005; 1061:6576.

Sipahioğlu H. Onkoloji medikal onkolojide tedavi prensipleri ve protokollar. 1981;1034-1037.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflammation.* 2008; 2008:106507.

Sternberg SS. Histology for pathologist, Lippincott-Raven, New York. 1997.

Stolk J, Hiltermann TJN, Dijkman JH et al.Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted cathechol. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 11: 95-102.

Stoll J, Rossie W, Dijkman JH. Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.1994; 150(6): 1628–1631.

Stuppner H, Reinisch O, Wiederman CJ ve diğ. Acetophenones compounds from plant origin with inhibitory effects on neutrophil in vitro respiration burst activity. *Phytomedicine*. 1995; 4: 283- 286

Şahintürk V. Subfertil erkeklerin sperm morfolojilerinin ışık mikroskobik ve floresan yöntemlerle incelenmesi. Doktora Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2000.

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

Şener TE, Yüksel M, Özyılmaz-Yay N ve diğ. Apocynin attenuates testicular ischemia–reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014; 50 (8): 1382-7.

Şimşek E. Anatomi fizyoloji. Hacettepe taş kitapçılık, Ankara, 1992.

Takhtfooladi MA, Asghari A, Takhtfooladi HA ve diğ. The Protective role of curcumin on testicular tissue after hindlimb ischemia reperfusion in rats. *İnternational Urology and Nephrology*. 2015; 47-10: 1650-1610.

Tang LL, Ye K, Yang XF ve diğ. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *Journal of International Medical Research*. 2007; 35(4)-517–522.

Tang XN, Cairns B, Cairns N ve diğ. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neuroscience.* 2008; 154(2): 556–562.

Taşlı L, Kaçar N, Yıldız N ve diğ. Plak tip psoriazisde metotreksatın oral ve subkutanöz kullanımının kıyaslanması: 5 yıllık retrospektif inceleme. *Pamukkale Tıp Dergisi*. 2011; 4(3):131-135.

Tempest HG, Ko E, Chan P ve diğ. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Human Reproduction*. 2008; 23(2): 251–258.

Tian H, Cronstein BN. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis, Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases. 2007; 65(3):168-73.

Trottmann M, Becker AJ, Stadler T ve diğ. Quality in Men with Malignant Diseases before and after Therapy and the Role of Cryopreservation. *European Urology*. 2007; 52-355–367.

Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*.2013; 17: 73-92.

Uzar E. Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medülla spinalisinde oksidan /antioksidanların durumu: Kafeik asit fenetil ester'in antioksidan koruyucu etkisi. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı. 2006.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J ve diğ. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160;1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J ve diğ. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem cell Biol*. 2007;39;44-84.

Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg A ve diğ. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J. Pharm.* 2001;433: 225-230.

Vardi N, Parlakpinar H, Ates B ve diğ. Antiapoptotic and antioxidant effects of b-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertility and Sterility*.2008; doi:10.1016.

Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B ve diğ. Metotreksatın neden olduğu testiküler hasara karşı klorogenik asidin koruyucu etkileri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2010; 30(2):507-13.

Wang HQ, Tompkins KD, Simonyi A ve diğ. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. Brain Research. 2006; 1090(1): 182–189.

Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing Methotrexate nephrotoxicity. *The Oncologist.* 2006;11:694–703.

Worm E, Beukelman CJ, Berg AJJ ve diğ. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 433: 2-3, pp. 225–230.

Yarıktaş M, Döner F, Doğru H ve diğ. Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. 2003; 10:65

Yeter K. Kemoterapi alan hastalara verilen eğitimin yaşam kalitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2006.

Yılmaz O. Probiyotiklerin ratlarda Metotreksat toksisitesi üzerine olan etkileri. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı. 2008.

Yin H, Porter NA. News insides regarding the autooxidation of olyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7 (1-2): 170-84

Yuluğ E, Türedi S, Alver A ve diğ. Effects of resveratrol on Methotrexate-induced testicular damage in rats. *Hindawi Publishing Corporation The ScientificWorld Journal*. 2013; Article ID 489659.

Yüncü M, Kanter M. Farelerde metotreksatın ince barsak mukozasında yaptıgı hasara karsı e vitamininin koruyucu etkisi: Elektron mikroskobik çalışma. Tıp Araştırmaları Dergisi. 2006; 4 (2) 1-6.

Yüncü M, Bükücü N, Bayat N ve diğ. The effect of vitamin E and L-carnitine against methotrexate-induced injury in rat testis. Turk J Med Sci. 2015; 45: 517-525.

Zeng J, Fena RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 A esolution. *J Mol Biol.* 1992; 226: 185-207.

Zhang GL, Dai DZ, Zhang C ve diğ. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3β-HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. *Reprod Toxicol*. 2013; 36:60-70.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Kübra KAVRAM

Doğum Yeri ve Tarihi : Gölcük/ 08.05.1988

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

Çalıştığı Kurum :

İletişim Adresi ve telefonu : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji AD / 05376547502

Eğitimi

2002-2006/ Yarımca Yabancı Dil Ağırlıklı Lise

2007-2011/ Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

2014- /Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD.

Yabancı Dili : İngilizce

Unvanları

Mesleki Deneyimi

Makale:

1-Metaphors About Histology Education in Medical Students", Ayşegül AYTEKİN, Mehmet Hamdi AYTEKİN, Yusufhan YAZIR, Kübra KAVRAM, Rabia TAŞDEMİR, Hümeyra Selenay FURAT RENÇBER, Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, The Turkish Online Journal of Educational Technoloy (TOJET), August 2015, Special Issue for INTE 2015; ISSN: 214657242, 352-356,2015.

Bildiriler:

1-Ticagrelor Attenuates Apoptosis of Lung and ycardial Cells Induced By Abdominal Aorta Ischemia Reperfusion In A Rat Model."Orhan Fındık, Seda Güleç Yılmaz, Yusufhan Yazır, Melda Yardımoğlu, Ufuk Aydın, Selenay Furat Rençber, Kübra Kavram, Canan Balcı, Atike Tekeli Kunt, Turgay İşbir, 12th International Congress of Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery, March 10-12, www.uccvs2016.org, http://www.abstractagent .com.,2016.

2- Metaphors of Medical School Students About Histology", Ayşegül AYTEKİN, Mehmet Hamdi AYTEKİN, Yusufhan YAZIR, Kübra KAVRAM, Rabia TAŞDEMİR, Hümeyra Selenay FURAT RENÇBER, Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, Procedia Social and Behavioural Sciences (Proceeding Book). InternationalConference on New Horizons in Education" to be held at Barcelona, Spain on June 10-12,2015.

3-Comprarison of hyperbaric oxygen versus iloprost in experimental central retinal artery occlusion (P-090)", Süleyman KARAMAN, Berna ÖZKAN, Selenay FURAT RENÇBER, Yusufhan YAZIR, Melda YARDIMOĞLU, Özgür KARA, Özgül Altıntaş, Çiğdem VURAL, Salih Kaan EMEK, Kübra KAVRAM, An Intrenational Journal of Experimental and Clinical Anatomy, 13.Turkish Neuroscience Congress, 2015.

4- Immunohistochemical Analyses of Etanercept's Effects on Vascular Smooth Muscle eNOS Expression in Obese Rats", Yusufhan Yazır, Kübra Kavram, Selenay Furat Rençber, Tuğçe Demirtaş, Tijen Utkan, Cell & Tissue Biology Research,13th National Histology and Embryology Congress with International Participation, 2016.

EK 10. Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- ☑ Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- ☑ Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- ☑ Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program,yıl yazıldı.
- ☑ Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- ☑ Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- ☑ Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- ☑ Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- ☑ Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- ☑ Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- ☑ Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- ☑ Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- ☑ Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- ☑ Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- ☑ Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

25 / 07 / 2016

Danışman Prof. Dr. Mesut Yaşar Oğlu Yılmaz

İmza