

**T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METOTREKSAT (MTX) TOKSİSİTESİNİN SIÇAN TESTİSİNDE
YARATTIĞI HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERE C VİTAMİNİNİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aysun SAYILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ**

KONYA - 2015

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METOTREKSAT (MTX) TOKSİSİTESİNİN SIÇAN TESTİSİNDE
YARATTIĞI HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERE C VİTAMİNİNİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Aysun SAYILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 141318005 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA - 2015

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Aysun Sayılmaz'ın "Metotreksat (MTX) Toksisitesinin Sıçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere C Vitamini'nin Etkisinin Araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
14/10/2015

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aydın ÖZGÖRGÜLO

Meram Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İmzası



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hasan CÜCE

Histoloji Embriyoloji A.B.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Histoloji Embriyoloji A.B.D.

İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 07/10/2015 tarih ve 22/05 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled MTX toxicity caused histopatological changes in rat testis to investigate the effect of vitamin C by Aysun Sayılmaz that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of sciences in the Department of Department of Histology Embryology, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

14/10/2015

Principal Advisor

Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ

Department of Histology Embryology

Signature

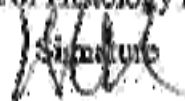


Examination Committee Member

Prof. Dr. Hasan CÜCE

Department of Histology Embryology

Signature



Examination Committee Member

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Department of Histology Embryology

Signature



This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences:

Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature



BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

14/10/2015

Öğrencinin Adı : Aysun Sayılmaz

Soyadı İmzası :

TEŞEKKÜR

Lisansüstü Eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Aydan Özgörgülü'ye

Yüksek Lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, öğretim üyesi hocalarım, Prof. Dr. Serpil Kalkan'a, Prof. Dr. Selçuk Duman'a, Prof. Dr. Murat Aktan'a ve Yrd. Doç. Dr. Gökhan Cüce'ye,

Laboratuvar aşamasında patoloji çalışmalarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Yrd. Doç. Dr. Yasemin Yuyucu Karabulut'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın başından sonuna kadar her aşamada yanımda olan sevgili dostlarım, Araş. Gör. Dr. Enes Sözen'e, Araş. Gör. Dr. Tuba Canbaz' a ve Uzm. Dr. Rasim Akçimen'e,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
APPROVAL.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BEYANAT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLOLAR LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ.....	3
2.2. TESTİS ANATOMİSİ	6
2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ	8
2.3.1. Testisi Saran Yapılar	9
2.3.1.1. Skrotum	9
2.3.1.2. Testiküler Kapsül	9
2.3.2. Testisin Histolojik Yapısı.....	10
2.3.2.1. Seminifer Tübüller	10
2.3.2.1.1. Sertoli Hücreleri	10
2.3.2.1.2. Spermatogenik Hücreler.....	12
2.3.2.2. İnterstisyel Doku	14
2.4. OLGUN SPERMİN FİZYOLOJİSİ	15
2.5. TESTİS BOŞALTIM KANALLARI	17
2.5.1. Tübülü Rekti.....	17
2.5.2. Rete Testis	18
2.5.3. Duktus Efferentes	18
2.5.4. Duktus Epididimis.....	18
2.5.5. Duktus Deferens	19
2.5.6. Duktus Ejakulatoryus	19
2.6. TESTİS FONKSİYONLARI VE FONKSİYONLARININ HORMONAL DENETİMİ.....	20
2.7. YARDIMCI GENİTAL BEZLER	22

2.7.1. Seminal Vezikül	22
2.7.2. Prostat	24
2.7.3. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezi).....	25
2.8. KEMOTERAPOTİKLER	25
2.8.1. Kemoterapi	25
2.8.2. Hücre Siklusu	27
2.8.3. Metotreksat.....	30
2.8.3.1. Metotreksatın Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	30
2.8.3.2. Etki Mekanizması.....	32
2.8.3.3. Metotreksatın Yan Etkileri	33
2.9. OKSİDATİF STRES	35
2.9.1. Serbest Radikaller	36
2.9.2. Antioksidanlar	41
2.10. C VİTAMİNİ.....	45
2.10.1. C Vitaminin Tarihçesi	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği	47
3.2. Deney Hayvanları.....	47
3.3. Deney Hayvan Grupları.....	47
4. BULGULAR.....	50
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	50
4.1.1. Kontrol Grubu	50
4.1.2. Metotreksat (MTX) Grubu	53
4.1.3. Metotreksat + C vit. Grubu	55
4.1.4. C vit. + Metotreksat Grubu	58
4.2. Histopatolojik Bulgular	60
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. ÖZET.....	71
8. SUMMARY	72
9. KAYNAKLAR	73
10. ÖZGEÇMİŞ	92
11. EKLER.....	93

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABP	Androjen Bağlayıcı Hormon
AICAR-transforminaz	Aminoimidazol-Karboksamidribodittransforminaz
AMH	Anti-Mülleriyen Hormon
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
BMP-4	Kemik Morfogenetik Protein-4
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHFR	Dihidrofolat Redüktaz
DHT	Dihidrotosteron
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dTG	Timidin Glikol
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
ETZ	Elektron Taşıma Zinciri
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FH₂	Dihidrofolat
FH₄	Tetrahidrofolat
FHGSHPx	Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
FSH-R	Folikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü
G6FD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GiS	Gastrointestinal Sistem
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Rd	Glutasyon Redüktaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
iNOS	İndüklenebilen nitrik oksit sentetaz
LH	Lüteinleştirici Hormon

LHRH-Like Peptit	Lüteinleştirici Hormonu Salgılatan Hormona Benzeyen Peptit
LPO	Lipit peroksidasyonu
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MDA	Malandialdehid
MİM	Müllerian İnhibitör Madde
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTX	Methotreksat
NADPH	Nicotinamid Adenine Dinükleotit Fosfat
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
PDGF	Trombositten Türeyen Büyüme Faktörü
PG	Prostaglandin
PGC	Primordiyal Germ Hücreleri
PSA	Prostat Spesifik Antijen
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Bileşikleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRY	Y Kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölge
TDF	Testis Belirleyici Faktör
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Erkek üreme sisteminin anatomisi (Campell ve Reece 2006).....	6
Şekil 2.2. Testisi saran yapılar.....	10
Şekil 2.3. Seminifer tübülün içeriği (Hill 2015).....	12
Şekil 2.4. Spermatogenezis (Cheng ve Mruk 2010).....	14
Şekil 2.5. Olgun sperm hücresi.....	17
Şekil 2.6. Yardımcı Üretral Bezler.....	23
Şekil 2.7. Hücre döngüsünün evreleri.....	27
Şekil 2.8. Metotreksat'ın kimyasal yapısı (Padmanabhan ve ark 2009).....	31
Şekil 2.9. Folik asit'in kimyasal yapısı (Padmanabhan ve ark 2009).....	31
Şekil 2.10. Folik asitin tetrahidrofolata inhibisyonu (Aşcı 2010).....	31
Şekil 2.11. Basitleştirilmiş metotreksat aktivitesinin mekanizması (Yelamos ve Puig 2015).....	33
Şekil 2.12. Reaktif Oksijen Türleri (Halliwell ve Gutteridge 2000).....	39
Şekil 2.13. Askorbik Asit'in kimyasal yapısı.....	45
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x40).....	51
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100).....	51
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200).....	52
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x100).....	52
Şekil 4.5. MTX grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x40).....	53
Şekil 4.6. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100).....	54
Şekil 4.7. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200).....	54
Şekil 4.8. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x200).....	55
Şekil 4.9. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x40).....	56

Şekil 4.10. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100)	56
Şekil 4.11. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200)	57
Şekil 4.12. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x200).	57
Şekil 4.13. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x40)	58
Şekil 4.14. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100)	59
Şekil 4.15. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200)	59
Şekil 4.16. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x200).	60
Şekil 4.17. Grup 2 ve grup 3 birbirine benzer ortalamalara sahip ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır. Grup 1; Grup 2 - Grup 3 ve Grup 4'ten, Grup 2-Grup 3; Grup 1 ve Grup 4'ten; Grup 4; Grup 1 ve Grup2-grup3'ten istatistiksel olarak anlamlı farklıdır. Grup 2'de MTX'in testislere verdiği zarar, Grup 4'te C vit + MTX uygulaması ile anlamlı olarak azalmıştır.....	61

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Antineoplastik ilaçlar (Can 2005).	30
Tablo 3.1. Deney grupları.....	48
Tablo 3.2. Johnson skorlaması	49
Tablo 4.1. Gruplar arası Jonhson skor ortalamaların One Way Anova, Tukey Testi ile karşılaştırılması, her bir sütundaki farklı harfler diğer gruplar ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir, $p < 0,05$ (Ortalama+ Standart Sapma).	60

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde yaşam kalitesini ve süresini etkileyen birçok farklı kanser çeşiti bulunmakta ve giderek daha fazla kişiyi etkilemektedir. Son zamanlarda kanser alanında yapılan erken tanı, etyolojisine, patogeneze ve yeni tedavi yöntemlerine yönelik çalışmalar artmıştır (Atal 2014). Kanser, kötü huylu tümör veya kötü huylu neoplazi olarak da bilinen anormal hücre büyümesi ve kontrolsüz çoğalarak vücudun diğer kısımlarına da yayılma potansiyeli olan hastalıklar grubudur. Kemoterapi, hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeden, hiç veya çok az toksik etki yapan tedavi şekli olup doğal, sentetik, biyokimyasal ajanlar veya hormonların kullanıldığı bir biyokimyasal madde ile hastalık etkeni üzerine ve özellikle çoğalan hücrelere karşı yeteri kadar toksik veya letal etki oluşturmaktadır. Ancak kemoterapide kullanılan bu ilaçlar, sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki benzerlikler, kanserli hücrelerin çoğalmasını ve gelişmesini önledikleri gibi normal hücreler (testisin germinatif epitel, kıl folikülü hücreleri v.b.) üzerinde de etkili olurlar ve antineoplastik ilaçların seçiciliğini olumsuz yönde etkilerler (Kayaalp 2009; Türk 2013).

Folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX), kemoterapötik amaçlarla malign tümörlerde kullanılan bir ajandır (Yuluğ ve ark. 2013). Uzun zamandır kullanılan bir kemoteropatik olan MTX, hücre siklusunun S döneminde sitotoksik etki yaparak, hücre bölünmesini inhibe eder. Testisin germinatif epitel, kıl folikülü hücreleri v.b. hızlı bölünen hücreler MTX'in etkisine duyarlıdır. MTX, akut lenfoblastik lösemi, osteosarcoma, koriokarsinoma, non-Hodgkin's ve lenfoma, göğüs kanseri, mesane kanseri, baş ve boyun kanseri gibi birçok neoplazinin ve neoplazi olmayan romatoid artrit, sedef hastalığı tedavilerinde kullanılmaktadır (Cole ve ark. 2006; Nouri ve ark. 2009). MTX'in testiste bulunan seminifer tübüllerdeki hasarı sperm sayısını azalttığı ve MTX kullanıldıktan sonra sperm DNA'sının da hasarlandığı gösterilmiştir (Işık ve ark. 1997).

Yapılan çalışmalar MTX'in hücreler üzerine etkisi, hücrelerin antioksidan etkinliğini azaltarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerine açık hale gelmelerini ve böylece testis dokusu ve germ hücrelerinde hasara neden olduklarını göstermektedir. Seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerde de apoptoza neden olduğu görülmüştür (Vardı ve ark. 2004; Yuluğ ve ark. 2013). Antioksidan

materyallerin metotreksatın toksik etkilerini azaltmaktaki rolleri yoğun olarak çalışılmıştır (Yuluğ ve ark. 2013).

C vitamini, seminal plazmadaki antioksidan kapasitesinin kırılmasında önemli bir zincirdir. C vitamini spermatogenezi desteklemektedir (Al-Asadi 2011).

Vijayprasad ve ark. (2014)'lerinin yaptığı çalışmalarda Vitamin C ve Vitamin E'nin eksikliğinin oksidatif stresi başlatarak testosteron üretimini azalttığı belirtilmiş ve Vitamin C'nin hücrenin membran bütünlüğünü ve hücresel fonksiyonları koruyarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, C vitamininin MTX'ın testis dokusu üzerinde yaptığı olumsuz etkiyi azaltıp azaltmadığının araştırılması ve elde edilen sonuçların toplum sağlığı açısından önemli olabileceği, literatüre katkı sağlayacağı ve bu konudaki araştırmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

İnsan erken fetal gelişiminde, testisler (baskın endokrin bezler), karın boşluğu içerisinde yer almaktadır (Bannister ve Dyson 1995). Fetal büyüme sırasında testisler karın boşluğundan skrotuma doğru göç ederler; bu göç hormonal (gonadotrophin, androjen) ve mekanik faktörler (gubernakulumun gelişimi, genitofemoral sinir, kremasterik kas ve epididimis) sayesinde gerçekleşir (Moore ve Persaud 1993; Kiely 1994; Bannister ve Dyson 1995; Rozanski ve Bloom 1995). Memelilerde, genetik cinsiyet fertilizasyon sırasında XX veya XY cinsiyet kromozomlarının varlığı ile tanımlanır. Ancak, fetal gonadal ve genital gelişimin ilk evresi cinsiyete özgü değildir: XX ve XY fetüsleri için gonadal besleme benzerdir ve iki cinsiyet içinde genital organ primordiasi iki çift kanal ve ürogenital sinüsten oluşmaktadır. Gebeliğin 7. haftasında insan fetüsü, Mülleriyan (paramezonefrik) ve Wolffian (Mezonefrik) kanallara sahiptir (Rey ve Picard 1998).

Gonadlar embriyoda bulunan birbirinden çok farklı iki hücre türünden kaynaklanırlar:

- Primordiyal Germ Hücreleri (PGC) gametleri (sperm hücreleri ve oositler) oluştururlar. Bu hücreler ektodermden gelirler ama gelişimin erken evrelerinde birbirlerinden ayrılırlar.
- Besleyici fonksiyonları olan somatik hücreler primordiyal hücreleri çevrelerler ve somatik gonadal blastoma oluştururlar. Testislere destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve interstisyel hücreler olan Leydig hücreleri katılır.

Kökenleri hala tartışmalı olan bu hücreler için 3 olası kaynak gündeme gelmektedir:

- Posterior Abdominal Duvarı Döşeyen Mezotel (Mezodermal Epitel)
- Mezenşim (Mezotelyum Altındaki Embriyonik Bağ Dokusu)
- Primordiyal Germ Hücreleri

İnsanda vitellus kesesi duvarında bulunan endodermal primordiyal germ hücrelerinin 3. haftada allantois'i aşarak bağırsağın arka kısmındaki mezenter kökü (radix mesenterii)'nin sağında ve solunda mezonefrozun medialinde mezoteldeki

gonadal kabartı (plica genitalis) içine girmesi ve burada bulunan hücreleri indüklemesi (5. Hafta başı) ile gonad taslakları gelişmeye başlar (Kayalı, Şatiroğlu, ve Taşyürekli, 1992). Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşan farklanmamış gonadın korteksi overe differansiye olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse medulla testise farklanır, korteks birtakım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur(Kayalı ve ark1992,Taylor ve ark 1999, Sadler 2000).

Primordiyal Germ Hücreleri (PGC) epiblastta gastrulasyonun 6. evresinde görülür (Bendel-Stenzel ve ark. 1998; Braat ve ark. 1999) ve embriyodan çıkıp yolk kesesi duvarının içine göçü tamamlarlar. Üç faktörün birlikteliği sayesinde (embriyonun katlanması, kemotaktik faktörler ve ameboid hareketler) primordiyal germ hücreleri gelişmekte olan bağırsak dorsal mezenterinden geçerek gelişmekte olan ilkel gonadlara göç ederler. 4.-6. hafta arasında gerçekleşen bu göç sırasında mitoz bölünmeyle çoğalırlar. 6. haftaya kadar olan erkek ve dişi gonadları ayırtedilemez, gonadal kordlar ve PGC kortikal yüzeylerinin yanısıra geleceğin gonadlarının medullar bölgesinde de gözlemlenebilir.

XY fetüste, testisler 7. haftanın sonunda farklılaşmaya başlarlar. Cinsiyet kordu gelecekte Sertoli hücreleri olarak adlandırılacak olan somatik hücreler tarafından oluşturulup, ilkel gonositlerle birleşirler. Sertoli hücreleri, Mülleriyan İnhibe Edici Madde (MIS) veya Faktör (MIF) olarak da bilinen, Mülleriyan kanalların regresyonundan sorumlu bir glikoprotein olan Anti-Mülleriyan Hormon (AMH) salgılamaya başlar (Josso ve ark. 1993; Lee ve Donahoe 1993). AMH, Mülleriyan kanalları çevreleyen mezankimal hücre membranlarında bulunmaktadır (Baarends ve ark. 1994; di Clemente ve ark. 1994) ve apikalden kaudal yönüne doğru iç içe katlanarak uterusun beslenmesine neden olur. AMH testis gelişirken en erken eksprese olan Sertoli hücrelerine spesifik biyo belirteçtir ve kronolojik ekspresyonu 8. haftanın sonuna kadar Mülleriyan kanalları cevap yeteneğini kaybedene kadar büyük önem taşımaktadır (Josso ve ark. 1977; Taguchi ve ark. 1984).

Kritik ekspresyon kronolojisi göz önüne alındığında, AMH geni transkripsiyonel mekanizmaların kontrolü altında olduğu düşünülmektedir. Cinsiyet belirleme paternini doğru olmasını sağlamak için erken fetal yaşamda AMH'nin sadece testislerde eksprese olması gerekmektedir. Testis belirleyen faktör (TDF) olan

Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölge (SRY), AMH ekspresyonunun ilk potansiyel regülatörü adaydır. Farklı gruplar farklı sonuçlara ulaşmışlardır ve AHM'nin doğrudan transkripsiyonel aktivatörü olarak SRY'nin etkin gerekliliği kanıtlanmamıştır (Haqq ve ark. 1994; Shen ve ark. 1994). Alternatif olarak SRY, DNA'nın bükülmesine katkıda bulunarak AMH promoterine bitişik bölgelere bağlanan diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimlerine izin verir (Lovell-Badge ve Hacker 1995) ve taslak gonadlar testislere farklılıklar. Nükleer reseptör SF-1 (Nükleer reseptör steroidogenik faktör 1) , AMH geninde bulunan fare, sıçan, sığır ve insanda yüksek derecede korunmuş, 20 baz çiftlik (bç) motife bağlanma yeteneğine sahiptir. Bu regülatör element AMH başlangıç kodonundan 110 bç yukarıda bulunur ve Sertoli hücrelerinde AMH transkripsiyonunu aktive eder (Shen ve ark. 1994; Giuili ve ark. 1997).

Erkeklerde Sertoli hücreleri tarafından salgılanan AMH ekspresyonu puberteye kadar devam eder, pubertede androjenlerin ve mayoza girişin sinerjistik negatif etkisi ile baskılanır (Al-Attar ve ark. 1997).

Sertoli hücrelerinin farklılaşması testis organogenezinde ilk adımdır. Gonadal beslemede, SRY tarafından aktive edilmiş genetik ürünlerin etkisiyle olur. Bu yolla hücreler arası membran bağlantıları oluşturulur, daha fazla primordiyal germ hücreleri ile sarılır, aynı zamanda medulla içerisinde de gonadal kord uzamaya devam eder. Ek olarak erkek embriyosunda, mezonefrik kökenli hücreler gonadal kordun şekillenmesinde rol alırlar. Gonadal kordlardan testiküler korda şekillenen ve sonrasında farklılaşarak kıvrık seminifer tübülleri (500-1000) ve olgunlaşmış testislerin düz seminifer tübülleri oluşturur.

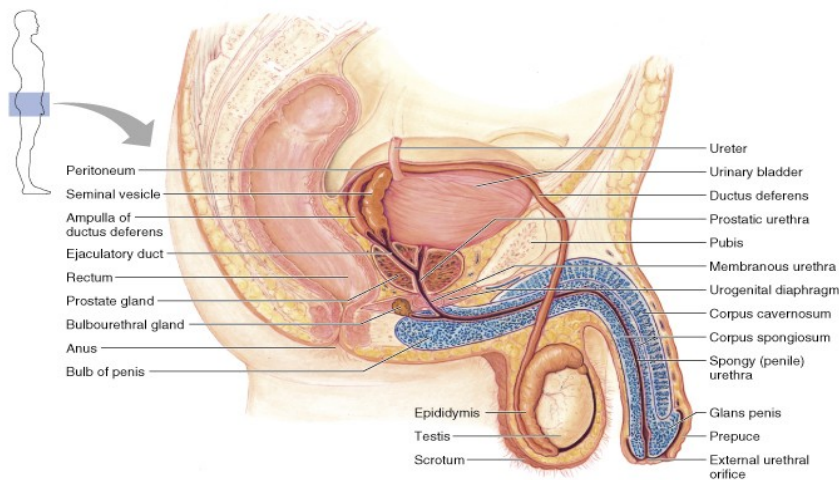
Puberteye kadar sarmal halindeki testiküler kordlar doludur. Puberte sırasında lümeni oluştururlar ve seminifer tübül olarak adlandırılırlar. Diğer tarafta germ hücreleri mitotik olarak bölünürler ama mayoz bölünme puberte ile başlar. Testiküler kordun septalarla sınırlandırılmış derin gergin kısımları düz seminifer tübül olarak adlandırılır. Tunika albuginea içerisinde küçük pasajlar halinde bir labirenti andıran rete testiste sonlanırlar. Kübik epitel ile kaplı ince duvarlara sahiptir. 9. hafta süresince mezonefrik tübüller 3. ayda rete testise bağlanan duktus efferentes şekillenirler.

Efferent kanallar, rete testis ve mezonefrik kanal arasındaki bağlantıyı oluşturur. 8. haftanın sonuna doğru testosteronun etkisi altında mezonefrik kanalın kranial parçası sıkıca sarılır ve epididimisin dışında bulunan duktus epididimisi oluşturur ve duktus deferense bağlanır.

8. haftadan sonra testiküler kordların arasındaki mezenkimal hücreler farklılaşarak, androjenik hormonları-testosteron ve androstenedione üreten interstisyel hücrelerini (Leydig) oluştururlar. Böylece, endokrin bez olarak görev alan testisler androjen üretirler (Jeays-Ward 2003). Salgıladıkları bu hormonların erkek seks karakterinin farklılaşmasında rolü vardır.

2.2. TESTİS ANATOMİSİ

Erkek üreme sisteminin merkezi elemanı olan testis (Yunanca “orchis” kelimesinden gelen) hem üreme (ekzokrin) hem de endokrin fonksiyonları olan önemli bir çift organdır (Gray 1918). Bu sistem üretilen spermlerin dışı üreme sistemine geçerek ovuma iletilmesini sağlayan boşaltım kanalları ve eklenti bezlerinden oluşur. Boşaltım kanallarının son bölümü, cinsel birleşmede erkeğin fonksiyonuna uygun olarak penis içinde yer alır. Boşaltım kanalları (viae genitales,genital yollar), duktus epididimisi, duktus deferens, duktus ejakulatoryus, duktus efferentes ve üretra’dan oluşur. Boşaltım kanalları, salgılarını genital yollara boşaltan, ejakulat oluşumuna katkı sağlayan ve işlevsel olarak testis’in ürettiği testosterona bağımlı bezlerdir. Bunlar seminal vezikül, prostat ve Bulboüretal bezler’dir (Yıldırım M, 2013).



Şekil 2.1. Erkek üreme sisteminin anatomisi (Campell ve Reece 2006).

Testis erkek üreme sisteminde skrotumun (testis torbası) içerisinde bulunan ve skrotal septum ile ayrılan ovoid şekilli bir çift organdır. Zeytin yada küçük erik büyüklüğünde olarak tarif edilen yetişkin testisleri yaklaşık olarak 25 ml hacminde ve 3.5-2.5-3 santimetre ölçülerindedir (Snell 2000). Spermatik kordla asılı olan testisler, uzun ekseninde tam vertikal olarak değil hafif öne ve yana eğimli olarak ve sol testis, sağ testise göre biraz daha aşağıda durmaktadır (Swartz 2006).

Tunika vaginalis testis, spermatik kord ve epididimisin testise bağlı olduğu üst ve arka sınırları haricinde testisi çift katmanlı bir zarf gibi sarar (Tintinalli ve ark. 2004).

Tunika vaginalisin visseral tabakası testis, epididimis ve duktus deferens ile yakından ilişkilidir. Testisin postlateral yüzeyinde tunika vaginalis epididimis ve testisin arasında yarık şeklinde bir boşluk oluşturur ve bu boşluk epididimisin sinüsü olarak adlandırılır (Moore 2006).

Tunika vaginalisin paryetal yüzeyi internal spermatik vene bitişiktir ve spermatik kordun distal kısmının üzerine doğru uzanır. Tunika vaginalisin derininde, tunika albuginea olarak adlandırılan sert, fibröz yapı ile testisin yüzeyi örtülür. Bu kapsül arka kenarından testis'in içerisine girerek mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis bezin superiyor kısmının yakınından inferiyora uzanır. Inferiyora doğru uzanırken genişliği daralır. Mediastinum testis, testise anterior ve lateral olarak girip çıkan damarlar ile rete testis'i 250-300 loba böler. Her bir lobta 3-4 tane olmak üzere tüm testiste 1000 kadar seminifer tübül (tubulus seminifer) bulunur. Seminifer kanallar spermatozoonların üretildiği yerlerdir (Yıldırım M. 2013). Mediastinum testis, kanalları ve damarları salgı bezlerinden geçerken desteklerler. Seminifer tübüller sperm testisin venöz drenajı kapiller ile başlar ve testis dışında 'plexus pampiniformis'i meydana getirirler. Çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde bu venler birleşerek testiküler veni oluştururlar. Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin dört-beş cm kadar altından vena kava inferiora, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır (Weingarten, Kellman, Middleton ve Gross, 1992).

Testis ve epididimin venöz drenajı, pampiniform venöz pleksus olarak adlandırılan duktus deferensin anterioru boyunca uzanan ve spermatik kordda testiküler arteri çevreleyen, 8-12 venden oluşan bir ağ tarafından yapılır. Derin iç kasık halkasına doğru geçtikten sonra, bu venler birleşerek testiküler veni

oluştururlar. Sağ testiküler ven inferiyor vena kava'ya, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır (MEB, 2011).

Testisin lenfatikleri, testiküler damarları (spermatik korddaki) takip ederek sağdan sol lombere (kaval/aortik) ve ikinci lomber seviyesindeki preaortik lenf nodlarına açılırlar (MEB 1992).

Testisin otonomik innervasyonları, vagal parasempatik ve visseral afferent lifleri ve omurilik T7 segmentindeki sempatik lifleri içeren testiküler arterdeki testiküler pleksus sinirleri ile olmaktadır (MEB 2011).

Temel fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri adına karın boşluğundan skrotuma inen testisler, inişleri esnasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklemektedirler (Arıncı ve Elhan 1999, Karataş 1998, Odar 1975, Şeftalioğlu 1998). Bundan dolayı testisler şu tabakalarla kaplıdır;

- 1) Deri skrotum
- 2) Tunika dartos
- 3) Fasia spermatika eksterna
- 4) Fasia kremasterika
- 5) Fasia spermatika interna
- 6) Tunika vaginalis testis

2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Erkek üreme sistemi, iki adet testis, genital kanallar, aksesuar bezler ve penisten oluşmaktadır. Bu sistem, embriyonik gelişimi, sperm yapımını, üreme fonksiyonlarını etkileyen hormonların üretimini ve erkek gamet hücrelerinin dışı üreme sistemine iletilmesi işlevlerini yerine getirir (Gray 2000; Gartner ve Hiatt 2006; Junqueira ve Carneiro 2006). Testislerde androjenlerin üretimi, embriyoda erkek fetüsün gelişimi için, pubertede testislerden testosteron salgısı ise sperm üretiminin başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi için önemlidir (Sharpe ve ark. 1992).

2.3.1. Testisi Saran Yapılar

2.3.1.1. Skrotum

Fibromüsküler yapıda ve bol melanin pigmenti içeren, kahverengi ve ince bir deriye sahip olan skrotum içerisinde testisler, spermatik kordonların ucunda asılı olarak bulunurlar (Moore ve Persaud 2009). Yağ ve ter bezlerinden zengin bir yapıya sahip olan skrotumun, yüksek ısıya dayanıksız olan spermelerin üretimi sırasında testislerin vücut ısısından 2-3°C daha düşük olmasında önemli rolü vardır (Campell ve Reece 2006).

2.3.1.2. Testiküler Kapsül

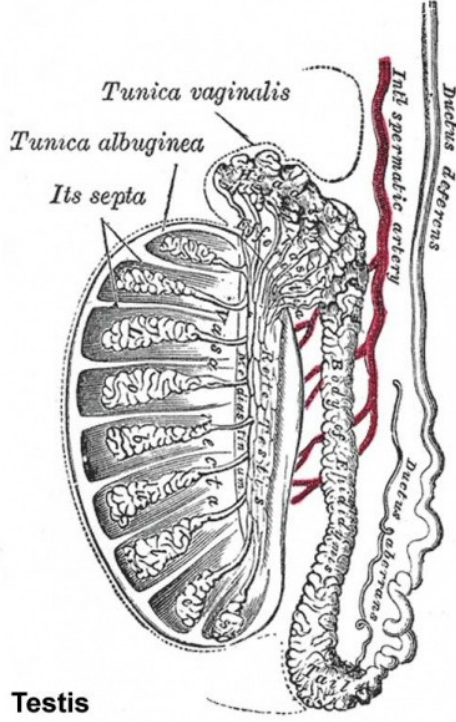
Skrotum ile testis arasında Tunika vaginalis ve Tunika albuginea adı verilen iki tabakalı kapsül bulunmaktadır.

Tunika vaginalis:

Testislerin karın boşluğundan skrotuma doğru göçleri sırasında, testisler, peritondan gelişmiş seröz kese ile sarılır. Bu kese, iki yapraklı, tek sıra mezotel hücrelerinden oluşmaktadır (Junqueira ve Carneiro 2006). Bu yapraklardan biri olan visseral yaprak tunika albuginea'yı örter, pariyetal yaprak ise skrotumun iç yüzüne tutunur, aralarında bulunan boşluk ise pelvis boşluğu ile ilişkidir. Testislerin skrotuma bu yolla inişinden bir süre sonra bağlantı yeri kapanır.

Tunika albuginea:

Testisi, fibroblastlar ve kollajenden yoğun ve düz kas liflerine sahip bir yapı olan Tunika albuginea, kalın, kompakt bağ dokusu ile testisi çevrelemiştir. Damardan zengin, gevşek bir bağ dokusu olan Tunika vaskulozanın, Tunika albuginea ile bağlantılı septumları, testisleri yaklaşık 250 adet koni biçimli lobüllere ayırır ve lobüller, içerisinde bulunan ve kıvrımlarından dolayı seminifer tübül olarak adlandırılan kanalcıklardan oluşturur (Lennox ve Ahmad 1970; Kuran 1983; Gray 2000; Gartner ve Hiatt 2006; Sancak ve Cumhuriyet 2008). Tunika albuginea, yapısında bulunan bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücrelerden ve düz kas liflerinden dolayı periyodik kasılmalar yapan dinamik bir membrandır.



Şekil 2.2. Testisi saran yapılar.

2.3.2. Testisin Histolojik Yapısı

2.3.2.1. Seminifer Tübüller

Her lobül, birbiri ile ilişkili, yaklaşık 30-70 cm uzunluğunda ve zengin bağ dokusuna sahip kılıfı, bazal lamina ve seminifer epitelden oluşan, 1-4 kadar seminifer tübül vardır. Seminifer tübüller spermatozoonların üretiminden sorumluyken, interstisyel hücreler de testiküler androjenlerin salgılanmasından sorumludur (Junqueira ve Carneiro 2006). Seminifer epitelde iki farklı hücre tipi vardır. Sertoli hücreleri, germ hücrelerine destek olur ve besler ve bir diğer grup olan spermatogenetik hücreler ise germ hücreleridir. Sertoli hücreleri ve Sertoli hücrelerinin uzantılarının oluşturduğu bölmelere yerleşen spermatogenetik hücreler arasındaki bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturur.

2.3.2.1.1. Sertoli Hücreleri

Seminifer tübülün bazal kısmından lümene uzanan, spermatogenik hücre serileri olan Sertoli hücrelerinin bölünme yeteneği yoktur. Seminifer tübülün hücresel yapısının %10-15'ini oluşturan Sertoli hücrelerinin içeriği birçok farklı

hücre gruplarından oluşur (Kayalı 1989). Çoğunlukla üçgen şeklinde görülen belirgin nükleusları sayesinde germ hücrelerinden ayrılırlar.

Puberte çağında Sertoli hücreleri arasında oluşan sıkı bağlantı kompleksleri tübül dışından lümen içerisine girmeye çalışan makromoleküllerin veya kanla taşınan maddelerin lümen içine geçişini engeller (Kayalı 1989; Junqueira ve Carneiro 2006). Sertoli hücreleri, gerekli kimyasal maddeler ve iyonların geçişinin sağlanabileceği gap junctionlara sahiptir. Sertoli hücreleri, destek, fagositoz, salgılama ve hareket gibi birçok farklı fonksiyona sahiptir.

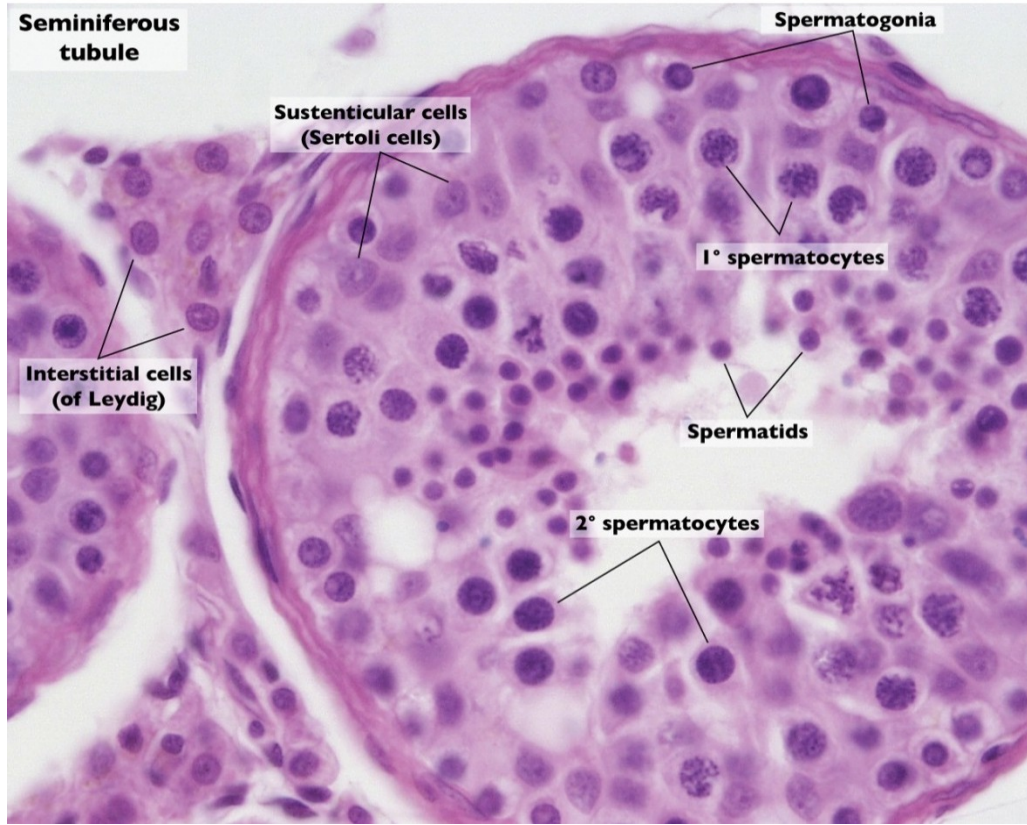
a. Destek; spermatozoonları desteklenmesi, korunması ve beslenmesi gibi önemli görevlere sahiptirler. Oluşturulan kan-testis bariyeri ile antijen, antikor geçişini engelleyerek, spermlerin oto-immun reaksiyonlardan korunmasına yardımcı olurlar.

b. Fagositoz; artık kısımları fagosite ederler.

c. Salgılama; endokrin ve ekzokrin salgılarıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP), steroid olmayan anti-Mülleryen hormon, luteinleştirici hormonu salgılatan hormona benzeyen peptit (LHRH-like peptit), transferrin, büyüme hormonu, seruloplazmin ve inhibin gibi pek çok madde) spermin ilerlemesini kolaylaştırır. Sertoli hücrelerinin salgıladığı başlıca maddeler ise ABP, inhibin, steroid olmayan anti-Mülleryen hormon, LHRH-like peptid'tir.

d. Hareket; filament ve mikrotübüller yardımıyla spermatogonik hücrelerin lümene salınmasını (spermiasyon) sağlar (Kayalı 1989; Junqueira ve Carneiro 2006).

e. Kontrol; Leydig hücrelerinin ve peritübüler hücrelerinin fonksiyonlarının ve spermatogenezin parakrin kontrolünü sağlar.



Şekil 2.3. Seminifer tübülün içeriği (Hill 2015).

2.3.2.1.2. Spermatogenik Hücreler

Seminifer tübülün bazal laminası ve lümeni arasında bulunan 4-8 epitel tabaka halinde düzenlenmiş hücrelerdir. Bu hücreler bölünerek farklılaşır ve spermatogonyumlardan spermatazoalar oluşana kadar görülen hücre tipleridir. Spermatogenez 3 evreden oluşur: spermatositogenez, mayoz, ve spermiyogenez (Gartner ve Hiatt 2006; Junqueira ve Carneiro 2006; Ross ve Pawlina 2006).

Spermatogonyum (Gonosit):

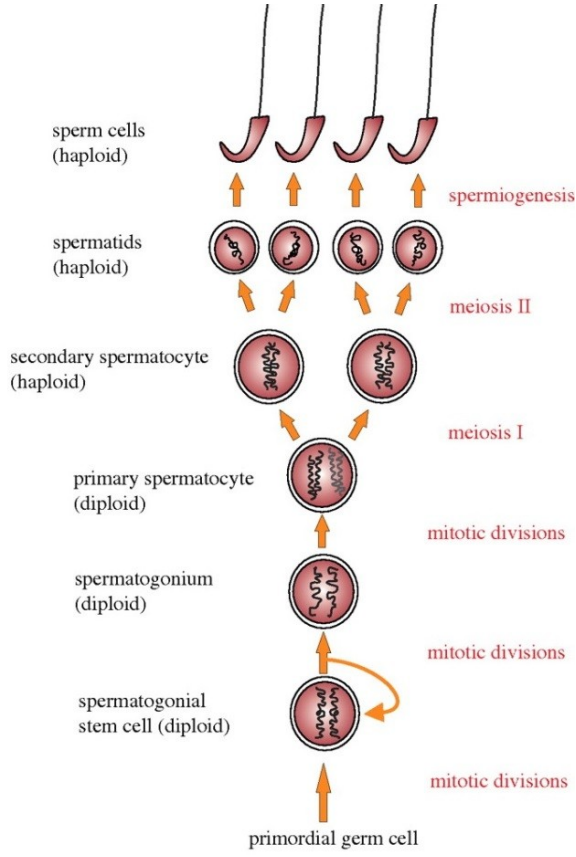
Fetal gelişimin 12-20. haftalarında testiste Leydig hücrelerinin işlevlerinin başlamasıyla testosteron salgılanır ve bu olay fetüsün erkek cinsiyeti yönünde farklılaşmaya başlaması ve erkek üreme sistemine özgü organların ve kanalların gelişebilmesi için gereklidir.

20. haftadan doğuma kadar ve sonrasında da puberteye kadar olan sürede hormon salgısı olmaz. Bu nedenle de seminifer tübüllerin kanalları kapalı olarak durmaktadır. Puberteye doğru seminifer tübülün bir kanalı açılır ve primordiyal germ hücrelerinde spermatositogenez başlar ve bu hücreler spermatogonyumlara dönüşür.

Seksüel olgunlaşmada bir seri mitoz bölünme geçiren spermatogonyumlar öncelikle A ve B tipi spermatogonyum olacak şekilde iki farklı tipe ayrılırlar. Koyu tip A spermatogonyumları kök hücre rezervi olarak görev yaparlar ve düzensiz aralıklarla mitoz bölünmelerle hem koyu tip A spermatogonyumlarını hem de soluk renkli boyanan açık A tipi spermatogonyumları oluştururlar. Oluşan açık A tipi spermatogonyumlarının koyu tip A spermatogonyumlarından soluk görümlü çekirdekleri dışında farklı özellikleri yoktur ve birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı kalırlar ve bu hücrelerinde bölünmesiyle oluşan yeni açık A tipi spermatogonyumlarda birbirlerine hep bağlı kalırlar ve böylece aynı ata hücreden çoğalan kardeş hücreler belirlenebilir hale gelirler. Ayrıca bu köprüler daha sonra söz edileceği gibi primer ve sekonder spermatositler arasında da iletişimi sağlarlar ve hücreler arası bilgi aktarımı bu köprüler sayesinde gerçekleşir ve koordinasyon için büyük önem taşırlar.

Açık A tipi spermatogonyumlar testosteronun etkisiyle bölünerek farklılaşırlar ve primer spermatositlere de farklılaşabilen öncül hücreler olan B tipi spermatogonyumları oluştururlar. Açık B tipi spermatogonyumlar yoğun kromatine sahip, yuvarlak çekirdekli hücrelerdir. Açık B tipi spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle bazal membrandan adlüminal kompartmana doğru göç ederler ve primer spermatositlere dönüşürler. Burada mayoz bölünme öncesi DNA'larını replike ederler ve primer spermatositler $4n$ DNA'ya ve 46 kromozoma sahip olmuş olur. Sekonder spermatositleri oluşturma için mayoz bölünme gerçekleşir. 1. mayoz bölünmeyle, mayozun profaz evresine girilmiş olur ve bu evre 20-22 gün sürer. 1. mayoz bölünme sonucunda 2 adet 23 kromozumlu ve $2n$ DNA'ya sahip olan sekonder spermatositler oluşmuş olur. 2. mayoz bölünme sonunda ise her bir spermatosit bölünerek 2 adet 23 kromozumlu ve n DNA'ya sahip spermatid oluşturur. Bundan sonra bölünme olmaz.

Spermatidler farklılaşarak ve olgunlaşarak, hareketli spermatozoonlara dönüşür. Bu evre spermiyogenez evresi olarak adlandırılır. Bu evrede spermatogonyumlar ve spermatositler arasındaki köprüler birbirlerinden ayrılırlar, yoğun transformasyon sonucu çekirdek karakteristik şeklini alır (Fawcett 1994; Sadler 1996; Gartner ve Hiatt 2006; Junqueira ve Carneiro 2006; Ross ve Pawlina 2006).



Şekil 2.4. Spermatogenezis (Cheng ve Mruk 2010).

2.3.2.2. İnterstisyel Doku

Gevşek ve vasküler bağ dokusundan oluşan ve seminifer tübüllerin arasındaki boşlukları dolduran dokudur. İnterstisyel doku, sinirler, fibroblastlar, mast hücreleri, kan ve lenf damarları, farklılaşmamış mezenkimal hücreler gibi farklı hücre gruplarından oluşmuştur. Bu hücre gruplarının arasına puberteden sonra Leydig hücreleri de katılır.

Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), testislerin hacminin %3'ünü oluştururlar. Kan damarlarının etrafında bulunan Leydig hücreleri, koryonik gonadotropinler (HCG) tarafından uyarılmasıyla testosteron hormonu üretiminde büyük rol oynarlar (Scott ve ark. 2009; Melmed ve ark. 2011). Fetal dönemin 12.-20. haftalarında erkek üreme sistemi organlarının embriyolojik farklılaşmasında etkindirler. 20. haftadan sonra dejenerasyona uğramaya başlarlar ve sayıları giderek azalır. Böylece testosteron seviyeside düşer. Fetal dönem sona erdikten sonra, Leydig hücrelerini uyan plasentada ortadan kalktığı için, bu hücreler puberteye kadar inaktif durumda olurlar. Pubertede hipofizden salgılanan lüteinizan hormon (LH)'un etkisiyle hücreler tekrar aktifleşirler.

Leydig hücreleri santral konumlu, belirgin, tek, polihedral şekilli bir çekirdeğe sahip olup, sekonder seks karakterlerinin oluşumundan sorumlu olan erkeklik hormonu testosteronun üretiminden sorumlu hücrelerdir. Testosteron, plazmada beta-globuline ve albumine bağlı olarak bulunur ve testosteronun salgılanmasının kontrolü ise LH'dedir. Golgi aygıtı ve çok sayıda mitokondriye sahip, küçük lipid taneciklerinden zengin hücre türleridir.

İdeal ısıları 35°C olan spermatogenik hücreler, yüksek ısıya dayanıksız oldukları için ısı düzeyleri birkaç mekanizmayla kontrol edilir. Terlemeyle ısı kaybı, kan dolaşımına karşı ısı akımı, yüksek vücut sıcaklıklarında vücuttan uzak tutulup, düşük ısılarda vücuda doğru çekilmesi bu mekanizmalardan bazılarıdır.

Leydig hücreleri ise ısıya dayanıklı hücreler oldukları için kısırlık durumunda sperm üretimi bozulmasına rağmen sekonder seks karakterleri ve libidoda bir bozulma gerçekleşmez (Kayalı 1989; Sternberg 1992; Ross ve ark. 2003; Junqueira ve Carneiro 2006; Ross ve Pawlina 2006).

2.4. OLGUN SPERMİN FİZYOLOJİSİ

Spermiyogenez, yuvarlak, haploid kromozomlu erkek germ hücrelerinin, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında gerçekleşen bir takım kapsamlı biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerden geçerek terminal farklılaşma işlemidir. Yeni oluşan spermatidler birbirlerine protoplazmik köprüler yardımıyla bağlanırlar ve bu bağlantılarla birlikte Sertoli hücre sitoplazmasına geçerler (Kierszenbaum ve Tres 2004; Battista ve ark. 2012). Burada bir değişiklikler geçirerek gelişim evresini tamamlarlar. Bu evreler 4 başlık altında incelenebilir:

Golgi Fazı:

Spermatid granüler endoplazmik retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler Golgi kompleksine gelirler. Golgi kompleksinde şekillenerek akrozomun öncülü kabul edilen küçük proakrozomal granüller oluşur ve Golginin trans yüzünden salınırlar. Bu küçük proakrozomal granüller daha sonra bir araya gelerek tek bir granüle dönüşürler ve bu granüllerde birleşerek akrozom veziküllerini oluştururlar. Bu vezikül çekirdeğin önünde ve çekirdeğe yapışık bir şekilde yer alır.

Akrozom Fazı:

Akrozom çekirdek yüzeyinde büyüyerek çekirdeği kısmen sarar. Oluşan bu yapıya akrozomal kep adı verilir. Akrozom granülleri içerisinde bulunan çeşitli hidrolitik enzimler (proteaz, asit fosfataz, nöraminidaz, asit peptidaz) spermiyumların yumurta hücresinin içine girebilmesini sağlar. Bu evrede akrozom yapımı tamamlanır. Çekirdek koyu renkli, küçük bir yapı halindedir.

Kuyruğun Formasyonu:

Akrozom çekirdeğin ön kutbunda oluşurken, sentriyoller arka kutbuna yönelir. Proksimal sentriyolden kuyruğun eksen fibrilleri gelişirken, distal sentriyollerden çıkan ve uzayan fibril demeti merkez fibrilleri oluşturur ve uzayarak kuyruk boyunca ilerler. Böylece flagellum şekillenmiş olur.

Maturasyon (Olgunlaşma) Evresi:

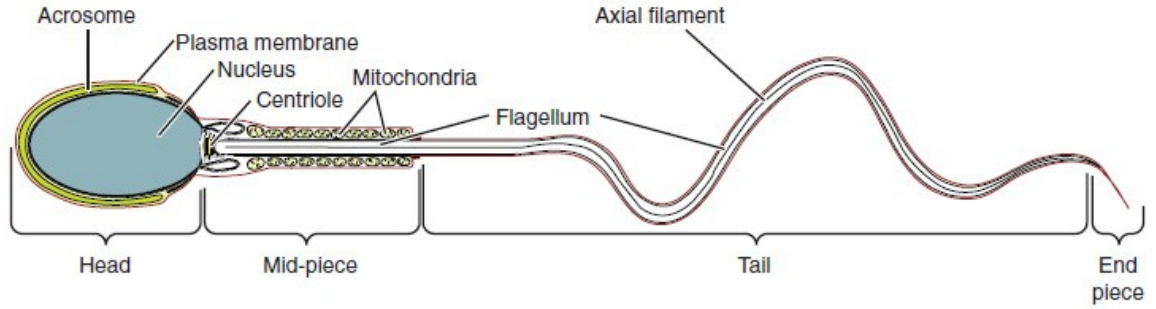
Spermatidler, birbirlerinden aralarındaki köprüleri kopararak ayrılırlar. Sitoplazmadan arta kalan parçalar boğumlanarak koparlar. Atık olan bu sitoplazma parçaları, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek uzaklaştırılır. Aynı zamanda bu evrede, mitokondriyumlar kuyruğun orta parçasından sentriyollerin arasında spiral oluşturacak şekilde yerleşirler ve kuyruğun bir kısmı böylece mitokondriyal bir kılıf ile kuşatılmış olur. Kuyruk hareketi için gerekli olan enerjiyi mitokondriden sağlar. Nükleusta ise kromatin yoğunlaşır ve çapı küçülür. Nükleus, akrozom ve kalan sitoplazma yardımıyla spermiyumun başını oluşturur. Böylece oluşan spermiyumlar morfolojik olarak olgundur.

Olgun hale gelen spermiyumlar seminifer tübül lümenine doğru ilerlerler. Olgun oldukları halde hareket ve dölleme yetenekleri yoktur. Hareket yeteneklerini duktus epididimiste yardımcı bezlerin salgıları ile kazanırlar.

Olgunlaşmanın son adımı olan kapasitasyon ise spermiyumların, dişi genital yollarında gerçekleşen bir dizi enzimatik aktivite ile dölleme yeteneğini kazanmasıdır. Dişi üreme sisteminde, spermiyumlardan en güçlüsü seçilerek ovumu döllemesi sağlanır. Akrozomun içerdiği enzimler bu noktada önem kazanarak ovumu delme işlemini gerçekleştirirler. Dolayısıyla akrozom ve içerdiği enzimler fertilizasyon için gereklidir (Junqueira ve Carneiro 2006; Ross ve Pawlina 2006;

Carrell ve ark. 2007; Miller ve ark. 2010; Gill-Sharma ve ark. 2011; Coward ve Wells 2013).

Olgun Spermium: 50–60 µm uzunluğunda hareketli bir hücredir. Baş, boyun, orta parça ve kuyruk (esas parça ve son parça) olmak üzere 4 bölümden oluşur.



Şekil 2.5. Olgun sperm hücresi.

2.5. TESTİS BOŞALTIM KANALLARI

Testis boşaltım kanalları, spermatozoaları taşıyan kanallar sistemidir. Tübüli rekti, rete testis, ductus epididimis, ductus deferens, ductus ejakulatoryus bu sistemi oluşturan kanallardır.

2.5.1. Tübüli Rekti

Tübüli rekti terimi, rete uzantılarıyla seminifer tübülleri bağlayan intratestikülere uzanan kanalının bir kısmını belirtmek için kullanılmıştır (Roosen-Runge 1961; Barack 1968). Bu kısım seminifer tübülün terminal segmenti olarak adlandırılır (Vitale-Calpe ve Aoki 1969; Dym 1974; Fawcett ve Dym 1974). Tübüli rekti terimi, giderek tübüler sistemin, terminal segmenti rete testise bağlayan boru şeklindeki bölümü için kullanılmaya başlanmıştır (Fawcett ve Dym 1974; Cavicchia ve Burgos 1977; Nogueira ve ark. 1977). MartinPadilla (1964) tübüli rektiye, rete testislerinin spesifik fonksiyonlar kazanmış hali olarak tanımlasa da, Bustos-Obregon ve Holstein, rete testisin tübüli rekti ve laküner boşluklar olmak üzere iki bölümden oluştuğu görüşündedir (Bustos-Obregon ve Holstein 1976).

Tübüli rekti kısa tübüller olup, seminifer tübülleri, mediastinal bölümü, hatta diğer seminifer tübüllere bağlayan, ve bazende testisin santral bölgesinde olan mediatonal rete'ye doğrudan bağlanabilir. Tübüli rekti, kübik epitel ile kaplıdır. Yaklaşık 1500 tübüli rekti (ya da seminifer tübül segmentlerinde benzerleri) vardır.

2.5.2. Rete Testis

Testislerin mediastinumunda bulunan rete testis, duktus efferentes ile seminifer túbülleri bağlayan kanal ve boşluklardan oluşan bir ağıdır. Kanal ve boşlukların boyut ve konfigürasyonundaki farklılıklardan dolayı rete testis üç bölüme ayrılır: septal (intralobuler), túbülü rektiden oluşan bölüm - mediastinal, birbirine bağlı kanallardan oluşan ağ; ve ekstratestiküler - bullae retis olarak adlandırılan dilate boşlukların oluşturduğu bölüm. Düzensiz boşluklar görünümünde olup kübik veya yassı epitel ile döşelidir.

Spermatozoonların rete testis ve túbülü rektide fazla görülmemeleri bu kanallardan çok hızlı geçip gittiklerini düşündürmektedir.

2.5.3. Duktus Efferentes

Duktus efferentes, rete testis ve epididimis arasındaki bağlantıyı ve sperm iletimini sağlayan küçük túbüller serisidir. Bu duktuslar, tunika albuginea yakınındaki rete testisten ayrı olarak ortaya çıkar (Orsi ve ark. 1983; Hess ve Bassily 1988). Her duktus yaklaşık 6-8 cm uzunluğundadır. Duktus efferentes düz kas hücreleri ve bağ dokusu ile desteklenen silindirik epitel tabakadan oluşan duvar tabakası ile çevrelenmiştir (Ilio Ky, Hess, 1994). Histolojik kesitlerde duktus efferentesin lümeni, terminal bölümü hariç, tipik olarak boştur veya az sayıda spermatozoa içermektedir (Talo, 1981). Dalgalı bir lümene sahip olan duktus efferentes, silyalı silindirik hücreler ve silyalı olmayan kübik hücrelerden oluşan epitelle sahiptir. Silyalı hücreler ve sıvı emilimi epididimise doğru sıvı akışını oluşturarak spermatozoaların hareketine yardımcı olur. Duktus efferentesin görünümündeki temel farklılıklar granül ve vakuol veya veziküllerin olup olmamasıdır (Ilio Ky, Hess, 1994). Rete testis, boğa, keçi ve köpekte testis içinde merkezi bir bölge olarak biçimlenmiştir, fakat insan, sıçan, fare, hamster ve kuşta rete testis, testis kenarında bulunan genellikle duktus efferentese bağlanan bir ekstratestiküler kısmı oluşturur (Reid ve Cleland 1957; Cooper ve Jackson 1972; Budras ve Sauer 1975; Amann 1977).

2.5.4. Duktus Epididimis

Duktus epididimis, erkek üreme sisteminde testislerden duktus deferense sperm taşıyan sıkı sarılmış yaklaşık 4-6 metre uzunluğundaki ince tüplerden oluşan

kitledir. Epididimisi geçerken sperm olgunlaşır, duktus deferense girdiği zaman ovumu döllemeye hazır hale gelir. Epididimis virgl şeklinde, 4 cm uzunluğunda bir organ olup, testislerin posterior sınırı boyunca uzanır. Bağ dokusu, kan damarları ve düz kas hücrelerini içeren duktus epididimisin kıvrımlı bir yapısı vardır ve testis kenarından aşağıya ince bir kuyruk şeklinde uzanır. Bazal ve silindirik hücrelerden oluşan bir epiteli vardır. Spermatozoonlar burada hareketlilik ve fertilizasyon yeteneklerini kazandıkları halde, kapasitasyonları dişi üreme sistemine ulaşıncaya kadar salgıladıkları bir glikoprotein sayesinde engellenir. Duktus epididimis baş (caput), kuyruk (corpus) ve gövde (cauda) olmak üzere üç ana bölgeye ayrılabilir. Baş kısmı, en geniş ve en üstün kısım olarak spermleri testisin efferent kanallarından alır. Gövde, baş kısmına göre biraz daha dar olup, testisin posterior kısmı boyunca iner. Son olarakta epididimisin dar alt kısmında olan kuyruk ise, burada duktus deferensle birleşir (Robaire ve Hermo 1988).

2.5.5. Duktus Deferens

Spermatozoayı, epididimisin alt ucundan yukarı duktus ejakulatoryusa iletmekle görevli, düz, kalın duvara ve dar lümene sahip, 40-50 cm uzunluğunda bir çift kanaldır. Yol boyunca skrotum, spermatik kord, inguinal kanal ve pelvik vücut boşluğundan geçerler. Epididimis içerisinde olgunlaşıp, dölleme yeteneğini kazanan spermler duktus deferens ile duktus ejakulatoryusa gnderilmezlerse, dejenerasyona uğrarlar. Prostata doğru ilerlerken sonlanmadan hemen önce genişleme yapar. Ampulla adı verilen bu genişlemiş kısım, spermlerin depolama yeri olarak görev yapar. Duktus deferens seminal vezikül kanalıyla birleşerek, spermleri taşıyan kanal olan duktus ejakulatoryusu oluşturur. Duktus deferens üç tabakalı yapıya sahiptir. Bu yapı, psdostratifliye örtü epiteli (stereosilyaya sahip uzun hücreler bulunur), düz kas tabakası ve fibröz bağ dokusundan oluşmaktadır. Duktus deferensin yeri ve işlevi, bu bölgeyi erkek doğum kontrol ameliyatları için önemli bir alan yapar (Marsh ve Alexander 1982; Aydın 2000).

2.5.6. Duktus Ejakulatoryus

Prostat bezi içerisinde yer alan spermiyumları üretraya ileten kısa, kıvrıntılı ve 2 cm uzunluğundaki ejakulator kanal, prostat bezinin içerisinde daralır ve spermiyumların ve seminal vezikül salgılarının fişkırtılarak ileriye atılmasını sağlar (Marsh ve Alexander 1982; Aydın 2000; Tortora ve Derrickson 2012). Prostat tabanı

üzerinde duktus deferens daha dar bir kanal haline gelir ve bu pozisyonda duktus deferense, duktus ejakülatoryus oluşturmak için gelen seminal vezikül kanal katılır ve duktus deferens prostat boyunca aşağı, öne ve mediale kısa yönlenmelerden sonra üretraya açılır (Cunningham, 1918).

2.6. TESTİS FONKSİYONLARI VE FONKSİYONLARININ HORMONAL DENETİMİ

Erkek üreme sistemi testis, epididimis, seminal vezikül, ejakülatör kanallar, bulboüretral bezler ve üretradan oluşur. Testis fonksiyonunun hormonal kontrolü, hipofiz bezinden salgılanan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve LH hormonları tarafından sağlanır. Spermilerin normal üretilmesi için bu iki hormonun seviyelerinin normal düzeylerde olması gerekmektedir (Junqueira ve Carneiro 2006).

LH, Leydig hücreleri üzerine etki ederek, spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını G-protein aracılı 7 transmembran reseptör aracılığıyla stimüle eder (Dufau 1998; Vierhapper ve ark. 2000).

Ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin hormon FSH, Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle eder, cAMP'nin artışına neden olur ve ABP üretiminin artmasını sağlar. ABP testosterona bağlanarak tübül lümenine salgılanır ve lümende biriken testosteron, sperm yapımını uyarır. Ayrıca, Sertoli hücrelerinden spermilerin yaşayabilmesi için ve epididimise taşınmasında rolü olan testiküler sıvılar salgılanmaktadır (Leeson ve ark. 1998; Junqueira ve Carneiro 2006).

Klasik görüşe göre, FSH hormonu Sertoli hücrelerinin uyararak spermatogenezi başlattığı ve LH hormonu ise Leydig hücrelerini uyararak testosteron sekresyonunu stimüle ettiği düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda hipofizektomili sıçanlarda ve gonadotropin releasing hormon (GnRH)'ye karşı immünize edilmiş sıçanlarda spermatogenez tek başına testosteron tarafından gerçekleşmiştir (Tapanainen ve ark. 1998). Ayrıca inaktive edici folikül stimüle edici hormon reseptörü (FSH-R) geninde mutasyon bulunan 5 erkekte, sperm sayısı azalmış olmasına rağmen, FSH genleri knockout olan farelerde yapılan çalışmalar, beklenenden daha fertil olduklarını göstermiştir. Bu bilgiler spermatogenez için

FSH'nin gerekli olmadığı hipotezini ortaya koymuştur (Kumar ve ark. 1997; Levallet ve ark. 1999; Shalet 2009).

Farklı genler tarafından kodlanan LH ve FSH hormonları, glikoprotein ailesi üyeleri, özdeş α -alt birimi ve özgün β -alt birimlerinden oluşan heterodimerlerdir. LH salınımının an-an ölçüm paterni, LH dolaşımının diurnal ritmi olduğunu göstermiştir. Testosteron seviyeleri de aynı şekilde puberte dönemindeki erkeklerde sabah erken saatlerde ve uyku sırasında artar (Boyar ve ark. 1974).

Testiküler fonksiyon anterior hipotalamusun kontrolü altındadır. GnRH, LH'nin ve FSH'nin sentezlerini ve salgılanmalarını anterior hipofiz bezinden harekete geçirir. LH ve FSH dolaşıma katıldıklarında Leydig ve Sertoli hücrelerindeki reseptörleri aktive ederler ve sırasıyla testosteron üretimini ve spermatogenezisi uyarırlar. Bu sistem, testiküler steroidlerin ve inhibin B'nin negatif feedback kontrol mekanizmalarıyla sıkıca kontrol edilir (Shale 2009).

Erkek üreme sisteminin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için endokrin ve ekzokrin fonksiyonları uyum içerisinde olmalıdır. Bu fonksiyonlar hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin kontrolündedir. Endokrin fonksiyonlar, Leydig hücreleri üzerinden yürütülmekte, ekzokrin fonksiyonlar ise seminifer tübüllerin spermatozoaları üretmesiyle gerçekleşmektedir (Kiserud ve ark. 2009).

Endokrin Fonksiyonu

Testislerde seminifer tübüller arasında bulunan Leydig hücreleri, testisin esas endokrin salgısı testosteron üretimini sağlamaktadır. Gonadotropin hormonlardan özellikle LH, Leydig hücrelerini, asetat ve kolesterolden testosteron elde etmek için uyarılırlar. Normal yetişkin erkeklerde, 24 saat içerisinde kanda üretilen testosteron üretim hızı 5-7,5 mg arasında değişmektedir (Vierhapper ve ark. 2000) ve normal erkeklerde total testosteron seviyesi 250 ila 1000 ng/dl (10-40 nmol/L)'dir. Testosteronun % 0,5-3'ü kanda serbest halde dolaşmaktadır. Kalan testosteronun %30'u globuline, %67'si ise albumin ve diğer serum proteinlerine bağlı olarak dolaşmaktadır. Yetişkin erkeklerde testosteron seviyesi, testislerin yokluğunda %95 oranında azalır. Kalan testosteron, adrenal kortekste androstenedion ve dehidroepiandrosteron (DHEA) üretiminde kullanılır. Testosteron düzeyiyle hipotalamus arasında hormon seviyelerini düzenleyici negatif feedback kontrol

mekanizması vardır, GnRH'nin düzenlenmesiyle hormon seviyeleri kontrol edilir. Yakın zamanda keşfedilen inhibin'in ve aktivin'in de GnRH'ye benzer etki göstererek FSH salgılanması üzerine önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir. Endokrin fonksiyonları seniliteye kadar devam eden testosteronun azalmasıyla, Leydig hücrelerinin sayısı ve androjenik fonksiyonları da giderek azalır (Hammond 1978; Leeson ve ark. 1988; Habert ve ark. 1989; Jensen ve ark. 1995; Freeman ve ark. 2001; Junqueira ve Carneiro 2006; Darly ve Granner 2009; Kiserud ve ark. 2009; Berman ve ark. 2012).

Ekzokrin Fonksiyonu

Erkek seks hücrelerinin yapımı testisin başlıca ekzokrin fonksiyonu olup, birçok faktör tarafından kontrol edilir. Prenatal dönemlerden gelişimi başlayan erkek seks hücrelerinin gelişimi, primordial germ hücrelerinden Sertoli hücreleriyle olan birlikteliğe kadar olan spermiyogenez evresini kapsamaktadır.

FSH'nin GnRH'den bağımsız olarak salgılanmasında bu proteinlerin önemli katkıları olduğu düşünülmektedir. Gonadlar üzerinde etkilerinin yanı sıra FSH ve LH, hücre içinde cAMP'yi arttıran adenilat siklazı aktive ederler (Witschi 1948; Habert ve ark. 1989).

2.7. YARDIMCI GENİTAL BEZLER

Testis boşaltım kanalları ile ilişkili olan bezlerdir. Seminal veziküller, prostat ve bulboüretal bezlerden oluşmaktadır.

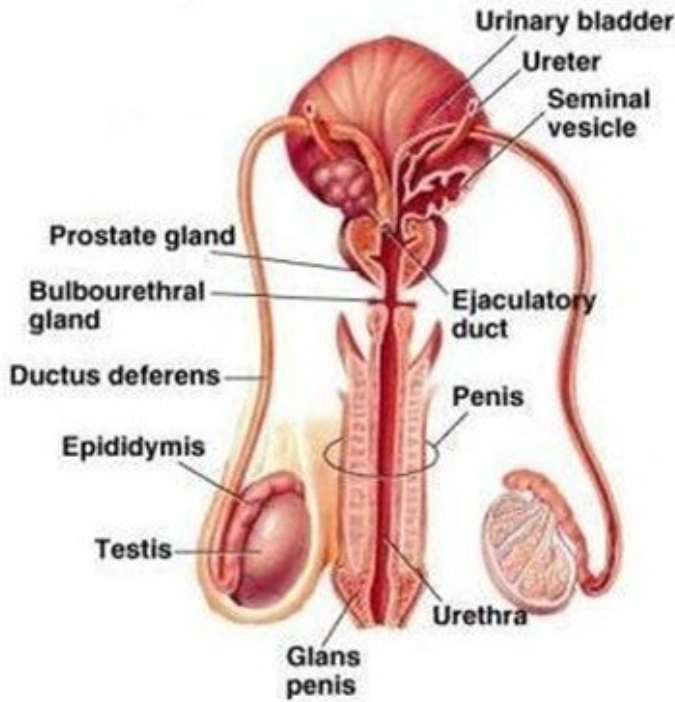
2.7.1. Seminal Vezikül

Seminal veziküller, veziküler bezler, ya da seminal bezler, mesanenin posteroinferiorunda yer alan basit tübüler bez çiftidir. Seminal veziküller pelvis içinde yer almaktadır (Wilke ve ark. 2009). Herbiri yaklaşık 5 cm boyunda, katlanmamış uzunluğu ise 10-15 cm uzunluğundadır ve ampulla duktus deferense paralel olup, duktus deferensin sonlarına doğru birleşerek, katlanarak duktus ejakulatoryus ile prostatın içine sokulur. Fonksiyonları:

1. Sekresyon: Seminal vezikülün temel görevi semen salgısı yapmaktır. Ölü epitel hücrelerinden oluşan lipofuscin granülleri sarımsı rengini sağlar. İnsanlardaki seminal sıvının yaklaşık %50-70'i seminal veziküller tarafından sağlanır. Seminal

vezikül sıvısının içeriği, bol miktarda su, fruktoz, prostaglandinler ve vitamin C olup, bazik bir salgısı vardır ve hafif alkali pH'ya sahiptir (Huggins ve ark. 1942). Spermatozoidler için, enerji kaynağı olarak, bol miktarda fruktoz içermektedir. Seminal vezikül sekresyonu testosteron tarafından uyarılmaktadır. Seminal veziküldeki çeşitli moleküller sperm motilitesini uyarırlar. Bunlar potasyum (Comhaire ve ark. 1983), bikarbonat (Okamura ve ark. 1985 ve 1986), magnezyum (Fabiani ve ark. 1995), 19-OH-prostaglandin (Gottlieb ve ark. 1988) ve prolaktin (Velsquez ve ark. 1980; Gonzales ve ark. 1989)'dir. Bikarbonat, cAMP üretimini artırarak adenilat siklaz sistemi üzerinden sperm hareketliliğini uyarır (Okamura ve ark. 1985 ve 1986). Prostaglandinler (PG), seminal veziküllerin salgıladığı moleküllerden biri olup, semende 15 farklı PG bulunmuştur.

2. Sperm motilitesi: Seminal vezikülün fonksiyonlarını yerine getirebilmesi sperm motilitesi için önemlidir. In vitro çalışmalar, seminal veziküler sıvıdan yoksun spermlerin, sperm motilitesinin ve sağkalımının zayıf olduğunu göstermişlerdir. Ancak hala seminal veziküler sıvının fizyolojik önemi anlaşılamamıştır. Spermatozoidler veziküler sıvıyla ve fruktozdan faydalandıktan sonra daha aktif olurlar (Robert ve Gagnon 1994).



Şekil 2.6. Yardımcı Üretral Bezler

2.7.2. Prostat

Prostat kestane büyüklüğünde bir genital bezdir ve yaklaşık 7-11 gr ağırlığındadır. Erkek üreme sisteminin bir parçasıdır ve mesane altında ve pelvik taban kaslarının üstünde yer almaktadır, düz kas hücreleri içeren fibromusküler kapsülden oluşmaktadır. İçeriğinde düz kas hücreleri ve yaygın damar yapısı bulunmaktadır. Ejakülasyon sırasında kas hücreleri kasılarak içeriğindeki sıvıyı üretraya doğru iletir (Schmidt ve ark. 2011; Menche 2012; Psychrembel 2014).

Prostat salgısı türler arası farklılık göstermektedir. Prostat salgısı kısmen asidik, sütümsü ve basit şekerleri içeren zengin bir sıvıdır. Prostat salgısı %1'den az protein içerir ve protein içeriğinde proteolitik enzimler, prostatik asit fosfataz, beta-mikroseminoprotein ve prostat spesifik antijen bulunmaktadır. Ayrıca kandaki çinkonun 500-1000 kere daha konsantre halini içermektedir (Poland ve ark. 1985; Singer ve ark. 1990).

3 tabaka şeklinde düzenlenmiştir.

- Mukozal bez
- Submukozal bez
- Periferal bez

Anatomik açıdan ise 4 kısımdan oluşur;

- Sentral (merkezi) zon
- Periferal zon
- Transizyonel zon
- Periüretal zon

Fonksiyonları:

1. Sekresyon: Prostat bezinin içeriğindeki salgılar, spermin hareketine yardımcı olur. Prostat salgısı içerisinde %1'den az protein içerir ve protein içeriğinde proteolitik enzimler, prostatik asit fosfataz, beta-mikroseminoprotein ve prostat spesifik antijen bulunmaktadır. Ayrıca kandaki çinkonun 500-1000 kere daha konsantre halini içermektedir. Devamlı kasılmalarla, prostatın içerisindeki salgılar, üretraya iletilir (Poland ve ark. 1985; Singer ve ark. 1990).

2. Sperm motilitesi: Prostat salınımı, sperm miktarını ve akışkanlığını kolaylaştırması, fertilité açısından önemlidir. Özellikle salgı içeriğinde bulunan çinko önemli rol oynar (Carreras ve Mendoza 1990).

2.7.3. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezi)

Dihidrotestosteron (DHT)'un kontrolü altındaki iki küçük ekzokrin bez olan bulboüretal bezler (Cowper Bezi olarakta bilinir) üretranın posteriyor ve lateral membranında ve sfinkter üretra kasının altında bulunur. Her bulboüretal bez, tübül-alveoler bezi ile bileşik ve bezelye büyüklüğündedir. Herbiri fibröz örtü ile bir arada tutulan birkaç lobülden oluşmaktadır. Her bir bez kanalı, yaklaşık 1 cm uzunluğunda olup, yaşla birlikte boyutu küçülmektedir.

Fonksiyonu :

Bulboüretal bezlerin birincil fonksiyonu ön ejakülat üretimidir. Bu cinsel uyarılma sırasında üretilen berrak, visköz salgıdır. Üretradan spermlerin geçmesine ve idrarın asidik izlerinin nötralize edilmesine yardımcı olur. Aynı zamanda bulboüretal bezler artmış miktarı prostat kanseri işaretçisi olan prostat spesifik antijen (PSA)'i üretirler (Alexander 1982; Jequiler ve Crich 1986).

2.8. KEMOTERAPOTİKLER

2.8.1. Kemoterapi

Kemoterapi kelimesi 19. yüzyılın sonlarında, Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmış bir terimdir. I. ve II. Dünya Savaşı sırasında İngilizler tarafından kimyasal silah olarak kullanılmış ve buna maruz kalan kişilerde ilik ve lenfoid hipoplazisi saptanmıştır. (Chu ve DeVita 2001; Kayaalp 2009)

Kemoterapinin ana ilkesi, kanser hastalarında hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeden, hiç veya çok az toksik etki yapan doğal, sentetik, biyokimyasal ajanlar veya hormonların kullanıldığı bir biyokimyasal madde ile hastalık etkeni üzerine ve özellikle çoğalan hücrelere karşı yeteri kadar toksik veya letal etki oluşturmaktır. Ancak kemoterapide kullanılan bu ilaçlar, sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki benzerlikler, kanserli hücrelerin çoğalmasını ve gelişmesini önledikleri gibi normal hücreler (testisin germinatif epiteli, kıl folikülü hücreleri v.b.) üzerinde de etkili olurlar ve antineoplastik ilaçların seçiciliğini olumsuz yönde

etkilerler (Ovayolu ve ark. 2003; Akyol 2004; Aslan ve ark. 2006; Kayaalp 2009). Kemoterapide kullanılan ilaçlar, yapıcı ve etki mekanizmaları farklı olduğu için aralarında çok çeşitlilik gösterirler (Pamir 2005).

Kanser tedavisindeki ana hedefler, hastanın yaşam süresinin uzatılabilmesi, tümör hücrelerinin yok edilmesi ve normal hücrelerin aktivitesinin minimal düzeyde zarar görmesini sağlayabilmektir. Tedavi sürecini etkileyen, çeşitli faktörler vardır; hastalığın tipi, evresi, yaygınlığı ve tedavi yöntemleri vardır (Akyol 2004).

Tümörler çok hızlı büyüme ve çoğalma yeteneğine sahip hücrelerdir ve kemoterapide amaç; hızlı bölünen kanser hücrelerini yok etmektir ve uygulanan tedavilerde de bu hedeflenmektedir. Maksimum düzeyde tümörlü hücre, ölümü sağlanırken, yüksek mitotik aktiviteye sahip normal hücrelerin (oral mukoza, saç folikülü, kemik iliği), minimum düzeyde etkilenmesi amaçlanmaktadır (Akyol 2004; Sadırlı 2008).

Kemoterapinin 4 temel ilkesi vardır:

1. Tedavi (Tam cevap)

2. Kontrol (Tedavi sağlanmadığında yaşam süresini uzatmak)

3. Semptomları hafifletmek

- Tedavi ya da kontrol sağlanmadığında, rahatlığı sağlamak

- Tümöre bağlı semptomları hafifleterek, tümörün etkisini azaltmak (ağrıyı azaltmak, etkilenen bölgede kan akımını arttırmak, organ tıkanıklığını önlemek ve yaşam kalitesini iyileştirmek).

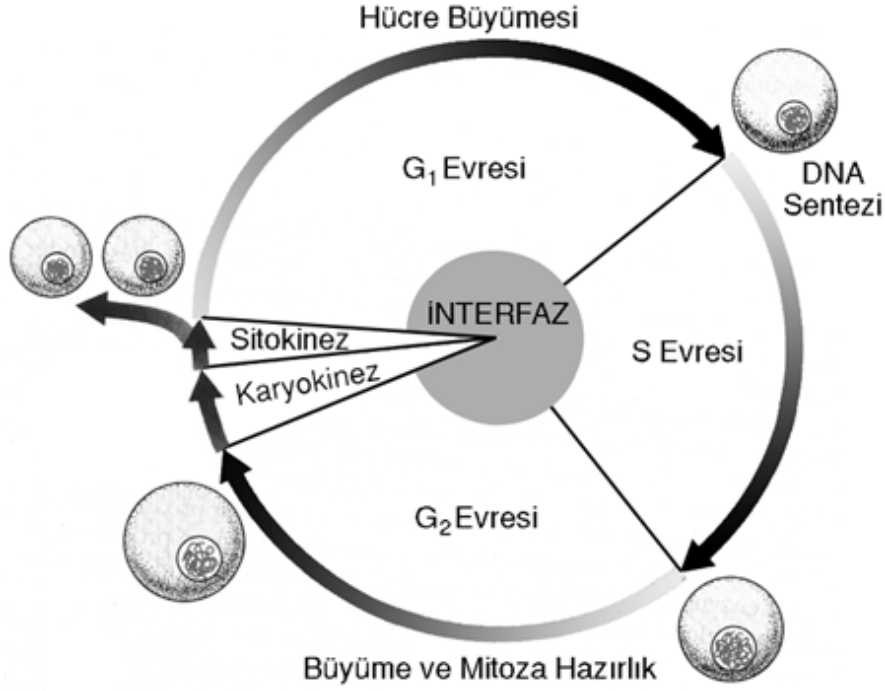
4. Profilaksi

- Adjuvan (nüks riski fazla olan tümörlerin cerrahi girişimle tam olarak çıkartılması veya radyoterapiyle kesin olarak tedavi edilmelerini takiben yapılan kemoterapidir ve cerrahi tedavi, radyoterapi tedavisi yanında kullanılır).

- Neoadjuvan (cerrahi tedaviden önce kemoterapi yapılmasıdır) (Kızılcı 1999; Dinçol 2000; Senler 2001; Can 2003; Akyol 2004; Sadırlı 2008).

2.8.2. Hücre Siklusu

Kemoterapinin prensiplerini ve etki sistemini anlayabilmek için öncelikle normal hücre siklusunun bilinmesi çok önemlidir. Hücre siklusu (hücre döngüsü), bir hücrenin bölünerek iki yeni hücre oluşturması, birbirini izleyen 4 evreyle gerçekleşir. Hücre döngüsü, mitoz bölünme safhaları arasında bir dizi olay ortaya koyar ve bu döngü kanser genetiği ile çok yakından alakalıdır.



Şekil 2.7. Hücre döngüsünün evreleri.

1. G0 (Dinlenme Evresi): Bölünme yeteneği olan hücrelerin döngü süresi devamlıdır. Oysa bölünme yeteneği olmayan hücreler (sinir hücreleri ve çizgili kas hücreleri gibi), G1 fazından çıkarak hiçbir bölünmenin olmadığı duruma geçerler. Bu faz G0 olarak bilinir. Bölünme yeteneğine sahip hücreler, G0 fazından çıkıp tekrar hücre döngüsüne girerek kendilerini yenileyebilirler. G0'a giren hücreler canlı ve metabolik olarak aktif kalırlar fakat çoğalamazlar. Kanser hücreleri, belirgin bir şekilde G0'a girmekten kaçınırlar ve burayı çok hızlı bir şekilde geçerler. Diğer hücreler, G0'a girerler ve hücre döngüsüne tekrar katılmazlar ve G0'da dinlenme halinde kalabilirler, fakat G1'e geri dönmek için uyarılabilirler ve döngüye tekrar girerler. Hücre G0 fazında hareketsiz olduğundan dolayı, kemateropik ilaçlar bu evrede hücreleri etkilemezler.

2. G1 (1. Evre): G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlar. S hücresine hazırlık olarak DNA zinciri sentezi ve kromozom oluşması için gerekli yapıtaşları olan enzimler (DNA polimeraz, timidin kinaz, dihidrofolat redüktaz vb.), histonlar, ribozomlar, membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılır. Hücre G1 boyunca metabolik olarak aktiftir ve DNA'sını kopyalamaksızın sürekli büyür. G1 evresini DNA replikasyonunun yer aldığı S evresi (sentez) izler. Tümör türleri arasında süresi en fazla değişiklik gösteren dönemdir. Tümör hücresinin çoğalma hızını belirleyen evredir. Yavaş çoğalan bazı tümörlerde tümör hücresi mitozdan sonra G0 evresine döner. Bu evre, hücrenin kemoterapiye hassas olduğu evredir.

G0 evresindeki bir hücrenin G1 evresine girmesi, büyüme faktörlerinin kimyasal uyarılarıyla olur. Büyüme faktörlerinin başlıcalarından epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombositten türeyen büyüme faktörü (PDGF). Büyüme faktörleri, kinazlarla ilişkili membran reseptörlerini ve membrandaki diğer reseptörlere kenetli (Ras proteini gibi), mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sistemini uyarır ve transkripsiyonu ve G1 evresi için gerekli yapıtaşlarının yapılması için hücrelerin çoğalmasını hızlandırır.

3. S (Sentez Evresi): İnterfaz sırasında her bir kromozomdaki DNA replike olur. Hücrenin mitozla girmeye hazırlanırken, DNA'nın sentezlendiği bu aşamaya S evresi denir. S fazında, DNA replikasyonu her kromozomun kopyasını yaparak, kromozom sayısının ikiye katlanmasını sağlar. Bu evre 4-24 saat sürer. Bu evrede kemoterapik ilaçlar etkilidir.

İnterfaz sırasında S'den önce ve sonra, DNA sentezinin olmadığı iki dönem vardır. Bu dönemler sırasıyla, G1 (Gap 1) ve G2 (Gap2) olarak gösterilir. Bu iki dönem süresince, S evresindeki gibi yoğun, metabolik aktivite, hücre büyümesi ve hücre başkalaşımı görülür.

4. G2 (2. Evre): DNA sentezinin tamamlanmasını takiben G2 fazı, büyümenin ve sentezin ikinci dönemi olarak mitozun başlamasına öncülük eder, mRNA ve protein sentezi hızlanır. Mitoz içcikleri oluşur. G2'nin sonuna kadar hücrenin hacmi iki katına çıkmış, DNA replike edilmiş ve mitoz başlatılmıştır. Tüm

hücrelerde bu evre yaklaşık 2 saat sürer. G1 evresinde olduğu gibi bu evrede de, hücreler kemoterapiye hassastır.

5. M (Mitoz) Evresi: Döngünün M evresi, genellikle sitokinez ile devam eden mitozdur. Hücre bu evrede bölünür ve çoğalır. Mitoz kendi içerisinde 6 evreden oluşur ve yaklaşık 1 saat sürer. G1 ve G2 evrelerinde olduğu gibi bu evrede de, hücreler, kemoterapiye hassastır.

Bu evreler sonucunda; iyi, yeni hücre oluşmuş olur, bu evreden sonra ya hücreler tekrardan hücre siklusuna girer (G1) ya da G0 evresine geçerek dinlenme halinde kalırlar ki, yeni hücre oluşsun (Brachet ve Mirsky 1961; Prescott 1976; Swanson ve ark. 1981; Pardee 1989; Forsburg ve Nurse 1991; Norbury ve Nurse 1992; Akdemir ve Birol 2004; Hartwell ve Kastan 1994; Koshland 1994; Akyol 2004; Sadırlı 2008; Kayaalp 2009).

Kemoterapikler çeşitli yollarla uygulanabilir; oral, intravenöz (IV), intratekal, intraperitoneal, intraplevral, intraarteriyel.

Neoplastik tümör dokularının tedavisinde kullanılan antimetabolitler, DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre komponentlerinin sentez zincirinin değişik basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan çeşitli metabolitlerin analoglarıdır. Hücrenin normal metabolitleriyle benzerlik gösterdikleri için enzimlerin bağlanma noktalarına bağlanarak, reseptörleri bloke edebilirler (Akyol 2004). Bu substratları kullanan enzimlerle, bağlanma noktalarına karşı yarışır ve bağlanmalarını inhibe ederler. Antimetabolitler, sık kullanılan antineoplastik ilaçlardır. Kemik iliği ve bağırsak mukozasına toksik etkileri vardır ve tüm gebelik süresince fetüse zarar verebilirler. 3 alt grupta toplanırlar; folik asit antimetabolitleri, purin antimetabolitleri ve pirimidin antimetabolitleri (Kayaalp 2009).

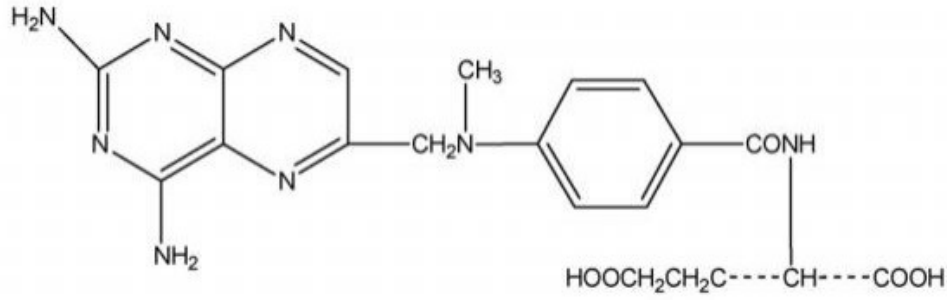
Tablo 2.1. Antineoplastik ilaçlar (Can 2005).

Sınıf/Etki Mekanizması	Kemoterapötik Ajanlar	Yan Etkiler
Alkilleyici Ajanlar Hücre siklüsüne özgü değiller; DNA'nın çift sarmalını parçalar; RNA, protein ve DNA sentezini baskılar.	Busulfan, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Cisplatin, Carboplatin, Ifosfamide, Melphalan, Mechlorethamine hidroklorid, Thiotepa	<ul style="list-style-type: none">• Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni)• Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit)• Reprodüktif• Renal (hemorajik sistit, nefrotoksisite)
Antimetabolitler Hücresin S fazına etkili; DNA sarmalını kırarak veya prematür zinciri sonlandırarak DNA sentezi için gerekli enzimlerin üretimini baskılar.	Cytarabine, Capecitabine, Gemcitabine, Methotrexate, 5-Azacytidine, 5-Fluorouracil, Floxuridine, 6-Mercaptopurine, 6-Thioguanine	<ul style="list-style-type: none">• Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi)• Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit, anoreksi, diyare)• Dermatolojik (kaşıntı, döküntü, venlerde koyulaşma, alopesi)
Antitümör Antibiyotikler Hücre siklüsüne özgü değiller; nükleik asid sentezini ve işlevini değiştirerek RNA ve DNA sentezini baskılar.	Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Mytomycin C, Mitoxantrone, Plicamycine	<ul style="list-style-type: none">• Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi)• Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit)• Kardiyak (kardiyotoksisite, aritmi, kardiyomyopati)• Dermatolojik (hiperpigmentasyon, alopesi)
Nitrosürealar Hücre siklüsüne özgü değiller; DNA replikasyonunu ve onarımını engellerler.	Carmustine, Lomustine, Semustine, Streptozocin	<ul style="list-style-type: none">• Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi)• Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit)• Reprodüktif (over veya spermlerin baskılanması)
Vinka (Bitki) Alkaloidleri Hücresin M fazına etkili; RNA ve protein sentezini baskılar.	Vinblastine, Vincristine, VP-16, VM-26, Vindesine, Topotecan, Irinotecan, Paclitaxel, Docetaxel	<ul style="list-style-type: none">• Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi)• Gastrointestinal (bulantı-kusma, anoreksi, konstipasyon)• Dermatolojik (lokal doku nekrozu, alopesi, paralizik ileus, çene ağrısı)• Nörolojik (nörotoksisite, periferik nöropati)• Reprodüktif
Hormonlar Tümörü doğrudan etkilerler ya da tümörü besleyen vücut hormonlarını baskılar.	Androjenler, östrojenler, kortikosteroidler, progestinler, östrojen antagonistleri	<ul style="list-style-type: none">• Reprodüktif (menstruel bozukluklar)• Hematopoetik (gizli enfeksiyonlar)• Gastrointestinal (mide iritasyonu)• Endokrin (jinekomasti, Cushing Sendromu)
Sınıflandırılmayanlar Hücresin S fazına etkili; RNA, DNA ve protein sentezini baskılar.	Amsacrine, Hydroxyurea, L-Asparaginase, Procarbazine	<ul style="list-style-type: none">• Hematopoetik• Gastrointestinal (bulantı-kusma, kabızlık, ishal)

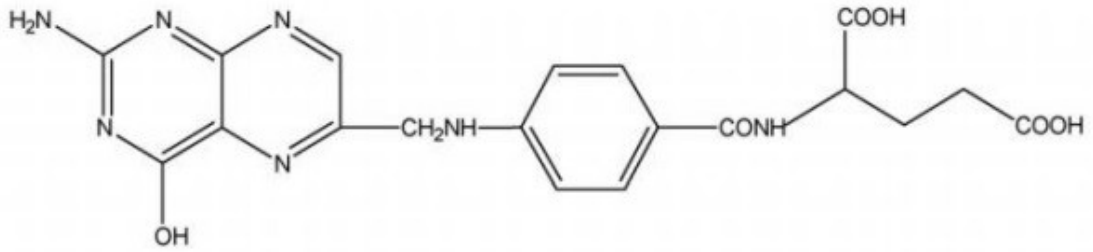
2.8.3. Metotreksat

2.8.3.1. Metotreksatın Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

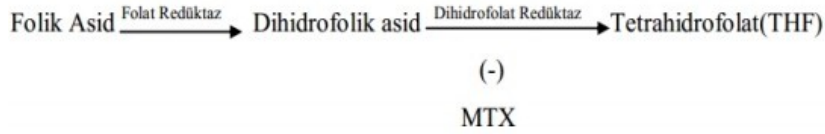
Metotreksat (4-amino-4-deoxy-10-N-methyl-pteroylglutamic acid, MTX), folik asidin 4-amino-N¹⁰-metil analogudur. Diyetle alınan folik asit, folat redüktaz enzimi ile dihidrofolikasite (FH₂), dihidrofolikasitte dihidrofolat redüktaz enzimi ile tetrahidrofolata (FH₄), indirgenir. Metotreksat, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine bağlanarak, enzimi geri dönüşümlü bir şekilde inhibe eder. Bu indirgenmiş folatlar, histidin metabolizmasında, pürin – pirimidin nükleotidlerinin sentezinde ve timidilat sentezinde rol alırlar. Pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezinin durması DNA ve RNA sentezlerini ve ATP üretimini inhibe eder (Kayaalp 2009).



Şekil 2.8. Metotreksat'ın kimyasal yapısı (Padmanabhan ve ark 2009).



Şekil 2.9. Folik asit'in kimyasal yapısı (Padmanabhan ve ark 2009).



Şekil 2.10. Folik asitin tetrahidrofolata inhibisyonu (Aşcı 2010).

Metotreksat, aktif transport ile yarışarak, folatın yerine hücre içine giriş yapar. Karaciğerde poliglutamilasyona uğrar, poliglutaminasyon sonrası intrasellüler olarak uzun süre kalabilir (Kayaalp 2009).

Plazma proteinlerine %50 oranında zayıf bir şekilde bağlanır. İlaçla birlikte alınan sulfonamidler ve salisilatlar, bağlanma oranını azaltır ve ilacın toksisitesini artırabilirler. MTX, tümör hücrelerine, uzun süre bağlı kalır, hücrelerde uzun süre bağlı kalan MTX, latent sitotoksik etkisi hücre bölünmeye başladığı zaman belirgin hale gelir ve hücreyi öldürür. MTX, kan-beyin bariyerini geçemez, ancak yüksek dozlarda BOS'ta tedavi edici konsantrasyonlara ulaşabilir. Böbrek yoluyla atılır ve yarılanma ömrü 6-8 saat kadardır (Kayaalp 2009).

MTX, akut lenfoblastik lösemi, osteosarcoma, koriokarsinoma, non-Hodgkin's ve lenfoma, göğüs kanseri, mesane kanseri, baş ve boyun kanseri gibi

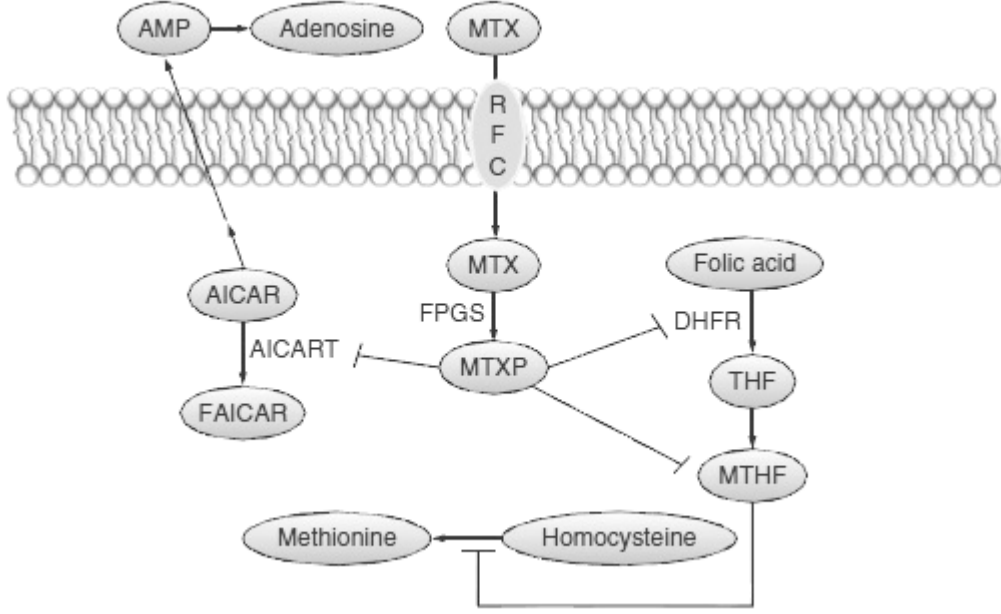
birçok neoplazinin ve neoplazi olmayan romatoid artrit, sedef hastalığı tedavilerinde de kullanılmaktadır (Cole ve ark. 2006; Nouri ve ark. 2009).

2.8.3.2. Etki Mekanizması

Yapılan araştırmalara rağmen, MTX kaynaklı toksisite, hala tam olarak anlaşılamamıştır. Folik asit antagonisti (Nouri ve ark. 2009) olan MTX, folik asite bağımlılık gösteren birçok metabolik yolağı, inhibe edebilme yeteneğine sahiptir. İnhibe etme yollarından biri de daha önce sözü edildiği gibi, DHFR enziminin inhibisyonu, folik asitin FH_2 ve FH_4 'e indirgenmesini önleyerek pürin ve pirimidin nükleotitlerinin sentezini engeller.

Pürin ve pirimidin sentezi için timidilat sentetaz ve aminoimidazol-karboksamidribodittransforminaz (AICAR-transforminaz) enzimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. MTX metabolizmasının toksisitesi de, bu enzimleri inhibe ettiği zaman ortaya çıkmaktadır. MTX'in etkisi ve yan etkileri pürin düzeyiyle ilgilidir (Van Ede ve ark. 2002).

MTX'in ilk dozundan sonra ilaç dolaşımında kısa bir süre kalarak organlara dağılarak etkisini hücre içinde sürdürmeye devam eder. AICAR'ın formil-AICAR'a dönüşmesini sağlayan AICAR-transforminaz enzimi MTX tarafından inhibe edildiği zaman, hücre içinde AICAR birikimi artar. Artan AICAR birikimi adenozin salınımını artırır. Bir takım enzim inhibisyonlarıyla fazla adenozin üretimine yol açar (Cronstein 1997).



Şekil 2.11. Basitleştirilmiş metotreksat aktivitesinin mekanizması (Yelamos ve Puig 2015).

Adenozin hücre yüzey reseptörlerine bağlanan güçlü bir endojen reseptörüdür (Herfindal ve ark. 1992). İnflamatuar hücre yüzeyinde bulunan adenozin reseptörlerinin bloke edilmesi, hücre fonksiyonlarının azalmasına da sebep olur. Nötrofil hücreleri üzerindeki reseptörlerin bloke edilmesi reaktif oksijen metabolitlerinin üretilmesine neden olur.

2.8.3.3. Metotreksatın Yan Etkileri

Metotreksat, gastrointestinal sistem, hematolojik ve santral sinir sistemi gibi birçok farklı sistemde toksisite oluşturduğu rapor edilmiştir (Ng ve ark. 2005; Widemann ve Adamson 2006; Belur ve ark. 2015). En çok rapor edilen bu sistemlerin dışında kutanöz, renal, neoplastik, akciğerler üzerinde, karaciğer üzerinde yan etkileri bildirilmiştir (Zachariae 1990; Sitzia ve Huggins 1998; Kim ve ark. 2009; Asvadi ve ark. 2011; Lee ve ark. 2011; Belur ve ark. 2015).

Renal Yan Etkiler:

MTX ile ilişkili akut tübüler nekroz, akut böbrek yetmezliği nadiren görülmektedir. Renal tübüllerde, MTX'in ya da metabolitlerinin presipite olmasıyla tıkanıklığa sebep olmaktadır (Jacobs ve ark. 1976; Lankelma ve ark. 1980; Smeland ve ark. 1996; Widemann ve Adamson 2006). Bazı hastalarda kusma, bulantı ve ishal gözlenebilir (Lawrenz-Wolf ve ark. 1994; Widemann ve ark. 1997).

Nöral Yan Etkileri:

MTX akut, subakut ve kronik nörotoksisiteye sebep olabilir. MTX'in intravenöz ve intratekal uygulanmasından sonra ortaya çıkmaktadır (Keime-Guibert ve ark. 1998; Shuper ve ark. 2002; Brugnoletti ve ark. 2009). Toksisitenin mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır ama nörotoksisiteyi açıklayabilmek için birçok hipotez ortaya atılmıştır. Protein, lipid ve miyelin formasyonu için önemli olan transmetilasyon reaksiyonlarına, MTX'in etkileşime geçmesiyle olmuş olabileceği yönündedir (Harila-Saari ve ark. 1998).

MTX'in intratekal uygulanmasından sonra baş ağrısı, bulantı, kusma ve aseptik menenjit görülebilir (Weiss ve ark. 1974; Bleyer 1978). MTX'in subakut uygulanmasından haftalar sonra Parapleji, serebellar disfonksiyon, nöbet gibi yan etkiler (Bleyer 1977 ve 1978) ortaya çıkmaktadır.

Hematolojik Yan Etkileri:

Hematolojik toksisite, MTX'in yüksek dozlarında ortaya çıkan ciddi bir komplikasyondur (Isacoff ve ark 1976). Bu komplikasyonda, trombositopeniyi takiben hızla ilerleyen lökonötropeni ortaya çıkmaktadır (Retenauer ve ark. 2009).

Kutanöz Yan Etkileri:

MTX'in kutanöz yan etkileri yüksek dozda kullanıldığında çeşitlilik göstermektedir. Genellikle tavsiye edilen miktarlar gözardı edildiğinde ya da renal atılım azaldığında ortaya çıkmaktadır (Gaies ve ark. 2012).

En sık karşılaşılan mukokutanöz reaksiyonlar, oral mukozada MTX'in neden olduğu ülserler, ciltte yanma hassasiyeti, fotohassasiyet, kulakta kızarıklık, çok çeşitli kızarıklık, kurdeşen ve vaskülitir (Del Pozo ve ark. 2001).

Gastrointestinal Sisteme Yan Etkileri

MTX, birçok gastrointestinal sistem rahatsızlıklarına neden olabilir. MTX'in düşük ya da yüksek dozlarında ortaya çıkan karın ağrısı, kusma ve ishal gibi yan etkiler en çok rapor edilen etkilerdendir. (Olsen 1991).

Üreme Sistemi Üzerine Etkileri:

MTX'in, testiküler toksisitesi üzerinde, infertiliteyi açıklayabilecek önemli yan etkileri vardır. Spermatogenezis sırasında, anti-kanser ilaç kullanımının, hücresel ve moleküler yönden gonadal hasarı değerlendirebilmek için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Jordan ve ark. 1977; Saxena ve Singh 1990; Jahuson ve ark. 1993; Kim ve ark. 1999). Birçok yetişkin erkek, MTX ile başarılı bir şekilde tedavi olduktan sonra, bu kişilerde oligospermi görülmüştür (Schilsky ve ark. 1980; Sussman ve Leonard 1980; Morris ve ark. 1993; Kim ve ark. 1999; Nouri ve ark. 2009). Birincil ve ikincil spermatozoid boyutlarında değişiklik, spermatid ve Leydig hücre büyüklüklerinde farklılığa neden olmaktadır (Saxena ve ark. 2014). Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere, MTX'in, testiste bulunan seminifer tübüllerdeki hasarın, sperm sayısını azalttığı ve MTX kullanıldıktan sonra sperm DNA'sının da hasarlandığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, MTX'in hücreler üzerine etkisi, hücrelerin antioksidan etkinliğini azaltarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerine açık hale gelmelerini ve böylece testis dokusu ve germ hücrelerinde hasara neden olduklarını göstermektedir. Seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerde de apoptoza neden olduğu görülmüştür (Vardı ve ark. 2004).

Farelerde ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda, MTX'in testis ağırlığında azalmaya, sperm sayısında azalmaya, sperm başında anormalliklerin artışına, seminifer tübül ve sperm DNA'sında hasara sebep olduğu gösterilmiştir (Johnson ve ark. 1994; Can 2005; Padmanabhan ve ark. 2009).

2.9. OKSİDATİF STRES

Tanım olarak oksidatif stres, normal durumlarda dengede olan prooksidan-antioksidan dengesinin bozularak, prooksidanlar yönüne kayması durumudur (Valko ve ark. 2007).

Tüm organizmalarda oksidatif strese karşı gerekli enzimlerin, moleküler şaperonların, ve antioksidan moleküllerin üretiminin artmasıyla sonuçlanan adaptif yanıtlar bulunmaktadır (Fomenko ve ark. 2011). Bu detoksifikasyon mekanizmalarındaki bozukluk ve yükselen ROS düzeyleri sonucu artan oksidatif stres hücresel hasara yol açmaktadır.

Özetle, organizmada bulunan elektron alıcı moleküller olarak bilinen serbest radikallerin, aktif oksijen türevlerinden oksidanlar, DNA, RNA ve enzimatik aktiveleri etkileyerek hücre hasarlarına neden olurlar. Bu serbest radikaller, normal şartlarda antioksidanlar tarafından yıkılırlar. Ancak savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu moleküller arasındaki dengenin bozulup oksidanlar yönüne kaymasıyla hücreler oksidatif hasara duyarlı hale gelirler ve oluşan bu hasarlar hücrede birçok hastalığa neden olurlar (Romero ve ark. 1998; Halliwell ve Whiteman 2004; Valko ve ark. 2006; Berk ve ark. 2008).

2.9.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde tek ve paylaşılmamış elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Paylaşılmamış olan elektron molekülü, stabilitesini bozar ve stabilize olabilmek için proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve inorganik maddelerle tepkimeye girer ve bunun sonucunda enerji açığa çıkar.

Serbest radikaller hücreSEL ya da biyolojik kaynaklı olabilir.

Biyolojik Kaynaklar: Aktive olmuş fagositler, antineoplastik ilaçlar ve pestisitler, endüstriyel solventler, radyasyon, alkol ve uyuşturucu maddeler, sigara dumanı, çevresel kirlenmeler, stres (Kappus 1987; Akkus 1995; Abdollahi 2004; Ebadi 2001; Lobo ve ark. 2010).

HücreSEL Kaynaklar: Ksantin oksidaz, peroksizomlar, mitokondrial elektron transport zinciri, iskemi/reperfüzyon hasarları, plazma membranı (Kappus 1987; Akkus 1995; Abdollahi 2004; Ebadi 2001; Lobo ve ark. 2010).

Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar:

Serbest radikaller, stabilize olabilmek için proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve inorganik maddelerle tepkimeye girer ve tepkimeye girdiği hücrelerin DNA, RNA ve enzimatik aktiveleri etkileyerek hücre hasarlarına neden olurlar. Bu etkiler toksik, mutajenik ve karsinojenik olabilir (Nordberg ve Arnér 2001).

Membran Lipidlerine Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu:

Membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri ve kolesterol, membran lipidlerini serbest radikaller için hedef haline getirmektedir ve serbest radikallerle

reaksiyona girerek peroksidasyona neden olurlar. Lipid yapısı değişen hücrelerin, hücre geçirgenliği de değişir ve fonksiyonlarında bozulma olur (Freeman ve Crapo 1982; Weiss ve LoBuglio 1982; Porter ve ark. 1985; Cheeseman ve Slater 1993; Halliwell ve Gutteridge 1999). Üç aşaması vardır: Başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma.

Güçlü bir oksitleyici radikalın, membran yapısında bulunan metilen grubundan (α -metilen) hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar ve lipid radikali oluşmuş olur ve sonrasında dien konjugatlar oluşur. Oksijen ilavesiyle oluşan yüksek reaktiviteye sahip peroksil radikali, diğer yağ asitlerinede saldırarak lipid hidroperoksiti (LOOH) oluşturur. Böylece lipid peroksidasyonu yayılır. Lipid peroksidasyonu sonucunda yeni bileşikler oluşturulur; alkanlar, malondialdehid (MDA) ve isoprostanlar. Lipid peroksidasyonunun belirteci olarak kullanılan bu bileşikler nörodeneratif hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarlanması ve diabetle ilişkisi gösterilmiştir (Ohkawa ve ark. 1979, Southorn and Powis 1988; Sinclair ve ark. 1990; Lovell ve ark. 1995; Girotti 1998). MDA, lipid peroksit düzeyinin ölçülmesinde kullanılan hedef moleküldür.

Lipid peroksidasyonu sonucunda; membrandaki iyon dengeleri, membran transport sistemleri bozulur, organeller hasarlanır.

Proteinlere Etkileri:

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu üç yolla gerçekleşir:

- Spesifik amino asitlerin oksidatif modifikasyonu,
- Proteinlerin fragmantasyonu
- Lipid peroksidasyonu ürünleriyle reaktive olan çapraz bağlanmalar.

Metionin, sistein, arjinin ve histidin gibi amino asitleri içeren proteinler, oksidasyonun etkilerinden kolaylıkla etkilenirler (Freeman ve Crapo 1982). Serbest radikal aracılı protein modifikasyonları, enzim proteolizisi yatkınlığını artırmaktadır. Protein ürünlerinin, oksidatif hasara uğraması enzim, reseptör ve membran geçiş aktivitelerini etkilemektedir. Oksidatif hasarlı protein ürünlerinin içeriğindeki fazla olan reaktif gruplar, membran hasarı oluşturabilir ve hücre fonksiyonlarını etkileyebilir. Peroksil radikalının, genellikle protein oksidasyonu için kullanılan serbest radikal türü olduğu düşünülmektedir. Protein oksidasyonları, enzim

aktivitesinde azalmaya, protein agregasyonuna, fonksiyon kaybına, gen transkripsiyonunda değişimlere neden olur. (Shacter 2000; Nordberg ve Arnér 2001; Netto ve ark. 2002; Lobo ve ark. 2010)

Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri:

Yapılan deneyler, DNA ve RNA'nın oksidatif strese duyarlı olduğunu göstermiştir. Özellikle kanser ve yaşlanma zamanında DNA ana hedeflerden biri haline gelmektedir (Woo ve ark. 1998). Glikol, dTG ve 8-hidroksi-deoksiguanozin gibi oksidatif nükleotidlerin, serbest radikal hasarı ya da UV radyasyonu altında DNA'daki oksidatif hasarı artırdığı görülmüştür. Mitokondriyal DNA'nın, oksidatif hasara daha çok yatkınlığı olduğu gösterilmiştir. 8-hidroksi-deoksiguanozin oksidatif stresin, biyolojik belirteci olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Hattori ve ark. 1997).

Karbonhidratlara Etkileri:

Serbest radikallerin etkisiyle, monosakkaritlerden hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehid yapısında ürünler oluşur ve oluşan bu ürünler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu da kanser ve yaşlanma gibi olaylarda etkili olabileceklerini düşündürmektedir (Thornaley ve Vasak, 1985).

Reaktif Oksijen Türleri (ROS):

ROS'un kısaca tanımı, başka moleküllerle çok kolay elektron alışverişine girebilen moleküllerdir (Halliwell, 1991). ROS, (i) redoks-aktif metaller ve oksijen türleri arasındaki doğrudan etkileşimi veya (ii) nitrik oksit sentaz (NOS) veya NADPH oksidazlar gibi çeşitli enzimlerin aktivasyonu ile dolaylı olarak üretilmektedir. Bu mekanizmaların işleyişindeki temel kural, serbest radikallerin kimyasal kaynağı olan moleküler, oksijenin aktivasyonunun gerekliliğidir (Smith ve ark. 2007).

Yüksek düzeyde reaktif olan süperoksit anyonu ve hidroksil radikali çoğunlukla, ETZ 'deki mitokondriyal kompleks I ve III tarafından üretilip mitokondri iç membranını kolaylıkla geçer ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir (Muller, Liu

et al. 2004). Mitokondriyal üretimi dışında H_2O_2 ayrıca peroksizomlarda da üretilir. Katalaz içeren peroksizomlarda H_2O_2 , suya yıkılarak H_2O_2 birikimi önlenmiş olur.

Peroksizomal hasar oluştuğunda ve katalaz enziminin üretimi azaldığında H_2O_2 sitozole salınır ve oksidatif stres indüklenir. İndirgenmiş metallerin de sitozolde bulunmasıyla H_2O_2 , çok reaktif ve biyolojik sistemlerde hasara sebep olan reaktif hidroksil radikaline dönüşür (Valko ve ark. 2007). H_2O_2 membranlardan çok kolay geçerek, fizyolojik roller kazanabilir. Bir molekülün radikal sayılabilmesi için, çiftlenmiş elektrona sahip olması gerekmektedir. Reaktif oksijen türleri terimi, reaktif olmayan ve reaktif olan molekülleri kapsayan bir terimdir (Çavdar ve ark. 1997).

Radikaller	Non- radikaller
Süperoksit, O_2^-	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, OH^\cdot	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, RO_2	Ozon, O_3
Alkoksil, RO	Singlet oksijen, O^1
Hidroperoksit, HO_2	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Nitrik oksit, NO	Hidroperoksid, $L(R)OOH$

Şekil 2.12. Reaktif Oksijen Türleri (Halliwell ve Gutteridge 2000).

Süperoksit Anyon Radikali: Moleküler oksijen, dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron bulundurmaktadır. Süperoksit anyonu çok reaktif olmayan bir radikaldir.

Hidrojen Peroksit: Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden, iki elektron alması veya süperoksit anyonunun bir elektron alması sonucu peroksit molekülü meydana gelir. H_2O_2 , serbest radikal olmadığı halde yapısında bulunan su yardımıyla, biyolojik membranlardan geçebildiği için çok önemli bir moleküldür.

Hidroksil Radikali: Yarılanma ömrü çok kısa olan, bütün molekülleri hemen okside edebilecek kadar toksik ve çok güçlü bir oksidandır (Fantel 1996).

Singlet Oksijen: Ortaklanmamış elektronu bulunmadığı için radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Normal oksijenden çok daha hızlı olan bir moleküldür. Doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunun oluşumuna sebep olur (Halliwell, 1991).

Nitrik Oksit (NO):

Nitrik oksit, yarılanma ömrü kısa, suda ve yağda çözünebilir serbest bir radikaldir (Lowenstein 1994). Paylaşılmamış elektronunu üzerinde bulundurmayan NO radikali, bu özelliği sayesinde hızlı diffüze olur ve kendi stabilitesini artırır.

Çok yönlü, biyolojik haberci olan NO, farklı biyolojik etkilere sahiptir. Nörotransmisyon, penil ereksiyon, düz kas hücrelerinin proliferasyonu, platelet agregasyonunun inhibisyonu, immün sistemin düzenlenmesi gibi, birçok farklı etkisi vardır (Radomski ve ark. 1987; Garg ve Hassid 1989).

Süperoksitin, nitrik okside (NO) dönüşmesi ile oluşan reaktif azot bileşikleri (RNS), oksidatif stresin bir türü olan, nitrosatif strese yol açar (Malkus ve ark. 2009). RNS üretimi sırasında fazla miktarda potent bir peroksidasyon ajanı olan, peroksinitrit oluşmaktadır. DNA fragmanlarının oluşmasını ve lipid peroksidasyonunu indüklenmesi peroksinitrit tarafından gerçekleştirilir (Carr ve ark. 2000; Szabó ve ark.2007).

NO sentaz tarafından üretilen NO, hücrelerde ve hücreler arası boşluklarda bulunur ve üç formu vardır:

Endotelial NOS (eNOS), vasküler epitel hücrelerde bulunur. eNOS testislerde Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri, spermatosit ve spermatid tarafından sentezlenir. Kan basıncı, kan akış hızı, ve kalp kasılmalarını organize eder (Drexler ve ark. 1991; Bassenge 1994). Vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkileri vardır.

Nöronal NOS (nNOS), ilk olarak merkezi sinir sisteminde gösterilmiş olup, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde, nöromodülatör ve nörotransmitter olarak görev yapar (Olesen ve ark. 1994). Periferik sinir sisteminde solunum fonksiyonlarında, gastrointestinal sistemde, penil ereksiyonunda, kan basıncı ve kan akım hızının düzenlenmesinde rol alır (Burnett ve ark.1992; Stark ve Szurszewski 1992; Bachmann ve Mundel 1994; Afshari ve ark. 2011). Testislerde, Leydig hücrelerinde bulunur ve vazodilatasyonda rol alır (Shiraishi ve ark. 2001).

Gliyalarda bulunan indüklenabilen NOS (iNOS), sitokinler ve lipopolisakkaritlerle uyarılarak sentezi sağlanır (Murphy ve ark. 1993; Vincent ve ark. 1998; Hirsch ve ark. 2003; Tieu ve ark. 2003).

Artan NO mitokondriyal kompleks I ve IV'teki enzimleri inhibe eder ve ROS üretimini tetikler. Aynı zamanda artan NO proteinlerle etkileşime girerek S-nitrosotiol yapısını oluşturarak protein fonksiyonlarını değiştirir ve lipidlerle etkileşime girerek, lipid peroksidasyonuna neden olur (Carr ve ark. 2000). Yüksek düzeyde ROS üretiminde proteinler hasarlanır veya inaktif hale gelerek hücre içi sinyal yollarının modülasyonu ile hücre sel dejenerasyon veya ölüme yönlendirir.

2.9.2. Antioksidanlar

Hücreler, serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarları önleyen, oluşan ürünlerin seviyesini kontrol eden ve serbest radikalleri yakalayıp stabilize edebilen antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler sayesinde serbest radikallerden ve lipid peroksidasyonunun etkilerinden korunmak mümkündür (Thomas 1995; Deaton ve Marlin 2003; Urso ve Clarkson 2003; Valavanidis ve ark. 2006).

Antioksidanlar, serbest radikallere saldıran elektronlar göndererek serbest radikalleri etkisiz hale getirirler ve zarar verici etkilerini azaltan stabil moleküllerdir. Antioksidanlar, serbest radikal süpürücü özelliği ile hücre sel hasarı inhibe eder veya geciktirirler (Halliwell 1995). Düşük moleküler ağırlıktaki antioksidanlar, güvenli bir şekilde serbest radikallerle etkileşirler ve hayati moleküller hasarlanmadan önce, zincir reaksiyonunu durdururlar. Glutatyon, ubiquinol, ürik asit gibi antioksidanların bazıları, vücudun normal metabolizması sırasında üretilir (Shi ve ark. 1999). Hafif antioksidanlar diyetimizde de bulunur. Serbest radikallerden vücudu arındırmak için farklı enzim sistemleri olduğu halde, vücutta üretilmeyen vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbik asit), B-karoten gibi tamamlayıcı vitamin antioksidanlar bulunmaktadır ve diyetle alınmalıdır (Levine ve ark. 1991).

Hücreler bu sayede serbest radikallerden ve lipid peroksidasyonundan korunurlar (Thomas, 1995; Gutteridge ve Halliwell, 2000; Mates, 2000; Urso ve Clarkson, 2003; Deaton ve Marlin, 2003; Valavanidis ve ark, 2006).

Antioksidan Savunma Sistemi:

Antioksidanlar, radikal temizleyici, hidrojen verici, elektron verici, peroksit parçalayıcı, singlet oksijen yakalayıcı, enzim inhibitörü, metal şelatlayıcı ajanlardır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücre içi ve hücre dışı ortamı ROS'tan arındırırlar (Frie ve ark. 1988).

Antioksidan Etki Mekanizması:

Antioksidanlar, etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (Rice-Evans ve Diplock 1993). Birincisi zincir kırıcı etkisini, birincil antioksidan, serbest radikal sistemine elektron sunar ve oluşan serbest radikalleri kendine bağlayarak etkisiz hale getirmesine dayanır. İkincisi ise, ROS/RNS'lerin başlatıcıları olan zincir başlatıcı katalizörlerinin yakalanıp uzaklaştırılmasına ve böylece serbest radikal oluşumunun engellenmesi sağlanır. (Winston 1991; Murray ve ark. 1993; Hermes-Lima ve ark. 2001). Antioksidanlar biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini elektrik donörü olarak davranmaları, metal iyon şelatörü görevi görmesi, ko-antioksidan veya gen ekspresyonu regülasyonu olarak gösterebilirler (Krinsky 1992).

1. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi.

A- Toplayıcı etkisi: ROS'ları etkileyerek onları tutmaya ve daha zayıf reaktivitesi olan başka moleküllere çevirme etkisi (enzimler ve küçük moleküllerin) (Reiter 1995; Karihtala ve Soini 2007).

B- Bastırıcı etkisi: ROS'lara bir proton sunarak aktivite kaybına neden olan etki (flavinoidler, vitaminler) (Cherubini ve ark. 2008).

C - Onarıcı etkisi: ROS'lar tarafından oluşturulan hasarın, oluşturulma etkisi (Mickle ve Weisel 1993).

D- Zincir kırıcı etkisi: ROS'ları ve zincirleme reaksiyon başlatacak maddeleri kendine bağlayıp, reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (hemoglobin, seroplazmin, mineraller, vitaminler) (Virág ve Szabó 2002).

2. Serbest radikal oluşumunun engellenmesi

A- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırarak

B- Oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak

C- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak

Antioksidan Etki Seviyeleri:

Savunmada ilk sırada, serbest radikal formasyonunu baskılayıcı, koruyucu antioksidanlar gelir. Bazı antioksidanlar, reaksiyonları baskılayabilmek için, hiperoksitler ve hidrojen peroksitten önce sırasıyla alkolü ve suyu azaltır, böylece serbest radikaller ve proteinler, metal iyonlarına ulaşamaz. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon-s-transferaz, fosfolipid hidroperoksit, glutasyon peroksidaz (FHGSH-Px) ve peroksidaz birincil antioksidanlardandır.

İkincil savunma antioksidanları ise, zincir reaksiyonların başlamasını baskılamak ve/veya zincir yayılma reaksiyonlarını kırmak için, aktif radikallerin temizlenmesini sağlarlar. Çeşitli endojen radikal-süpürücü antioksidanların bir kısmının, hidrofilik ve diğer kısmının da lipofilik olduğu bilinmektedir. Sitozol ve ekstrasellüler sıvıda bulunan radikal-süpürücü antioksidanlardan Vitamin C, ürik asit, bilirubin, albümin, ve tiyoller, hidrofilik membranda ve lipoproteinlerde bulunan lipofilik radikal-süpürücü antioksidanların ise vitamin E ve ubiquinol olduğu bilinmektedir (Niki 1993; Blokhina ve ark. 2003). Glutasyon redüktaz (GSH-Rd) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6FD) enzimleri gibi dolaylı olarak etkisi olan enzimlere de ikincil antioksidan enzimler denilmektedir. Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak ikiye ayrılmaktadır.

Enzimatik Antioksidanlar:

Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksitin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir (Banniste ve ark. 1987; Zelko ve ark. 2002). SOD enzimi neredeyse bütün aerobik hücrelerde ve ekstrasellüler sıvılarda bulunmaktadır (Johnson ve Giulivi 2005). Süperoksit dismutazlar, merkezlerinde bulunan geçiş metallerine göre, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD / Fe-SOD ve Ni-SOD olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Wuerges ve ark. 2004).

İnsanlarda, SOD'un üç formu görülmektedir. SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride ve SOD3 ise ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır (Cao ve ark. 2008).

Katalaz: Yaşayan tüm organizmalarda bulunan bir enzim olan katalaz, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri H_2O_2 'nin zararlarına karşı korurlar (Gaetani ve ark. 1996; Chelikani ve ark. 2004). Katalazın bütün organlarda aktivitesi olduğu bilinmekte ancak enziminin aktivitesinin dokular ve hücreler arasında farklılıklar gösterdiği, özellikle böbreklerde yüksek konsantrasyonda olduğu belirtilmektedir (Murray ve ark. 1993; Eisner ve Aneshansley 1999; Orbea ve ark. 2000)

Glutasyon Sistemi: Glutasyon sistemi glutasyon, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon S-transferazları kapsar. Hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur (Meister ve Anderson 1983). Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve organik hiperoksitin indirgenmesinde rol oynar. Mitokondride sitozol ve hücre membranında bulunur (Deaton ve Marlin 2003).

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:

Askorbik Asit: Askorbik asit veya Vitamin C suda çözünebilen, monosakkarit bir antioksidandır. İnsanlarda sentezlenemeyen bir vitamindir, diyetle alınması gerekmektedir (Smirnoff 2001). Bir çok enzimin kofaktörüdür. Çok güçlü indirgeyici ajan olan askorbik asit reaktif oksijen olan hidrojen peroksiti nötralize edebilir (Padayatty ve ark. 2003). Direk antioksidan etkisine ek olarak, bitkilerde stres rezistansı olarakta görev yapmaktadır (Shigeoka ve ark. 2002). Hidrojen peroksit varlığında demir ve bakır iyonlarıyla reaksiyona giren Vitamin C, oksidan özellikler gösterebilmektedir (Çavdar ve ark. 1997).

Glutasyon (GSH): Aerobik yaşamdaki her canlıda sistein içeren peptid olan Glutasyon bulunmaktadır (Meister ve ark. 1983). Diyetle alınması gerekmemektedir ve hücrelerden amino asit senteziyle üretilmektedir. GSH'a antioksidan özelliğini tiyol grubu sağlar. Hücre içi glutasyonun büyük bir kısmı indirgenmiş olarak (tiyol), bir kısmı da okside glutasyon (GSSG) formunda bulunur (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Dickinson ve Forman, 2002; Mytilineou ve ark., 2002). Glutasyon ortamdaki hidroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini temizler, aynı zamanda serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur.

Melatonin: Güçlü bir antioksidan olan melatonin hücrelerde çeşitli ROS'ların temizlenmesini üstlenir. Hücre membranlarından ve kan-beyin bariyerinden kolaylıkla geçebilir (Reiter ve ark. 1997). Diğer antioksidanlardan farklı olarak redox döngüsüne girmez.

Tokoferol (E Vitamini): Vitamin E tokoferoller ve tokotrienoller için toparlayıcı bir isimlendirmedir. Vitamin E antioksidan özelliğinde, yağda çözünebilen bir moleküldür (Herrera ve Barbas 2001). α -tokoferol en çok araştırma yapılmış olan, dağılımı ve biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır (Brigelius-Flohe ve Traber 1999). Membranı lipid peroksidasyonuna karşı korur (Traber ve Atkinson 2007).

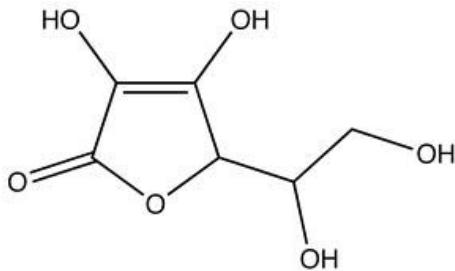
2.10. C VİTAMİNİ

2.10.1. C Vitaminin Tarihçesi

Askorbik asit üzerine araştırmalar yapılmaya Holst ve Frolich 1900'lü yılların başında başlamıştır. 1912'de antiskorbutik vitamin adı verilmiş ve 1920 yılında C vitamini adı kullanılmaya başlanmıştır. Vitamin C (L-askorbik asit) 1921 yılında izole edilmiş ve 1933 yılında ise limondan sentezi tamamlanmıştır.

Geçtiğimiz dört yüzyıl boyunca diyetisyenler ve hekimler C vitamini alımının sadece rhinovirüsler ve influenza tedavisinde, besinlerin sindirimine yardımcı, kemik ve bağlantılı dokularda stabiliteyi sürdüreceğini düşünüyorlardı (Morgan 2010). Antioksidan olarak Vitamin C, birçok yabancı ajanın vücuda yayılmasını engellemektedir.

Askorbik asit (L-askorbik asit, L-ksilo askorbik asit, L-treo-heks-2-enoik asit- γ -lakton) biyokimyasal isimlendirmeleridir. Birçok canlı türünde geniş dağılım göstermektedir (Jacob 1999). Suda çözünebilen, monosakkarit bir antioksidandır.



Şekil 2.13. Askorbik Asit'in kimyasal yapısı.

İnsan vücudunda, sentezi sırasında kullanılan L-gluno- γ -lakton oksidaz enzimi olmadığı sentezlenemeyen C vitamininin, dışarıdan diyetle alınması gerekmektedir (Bates 1981; Başpınar ve Kurtoğlu 2003). Bütün taze sebze, meyve ve etler bir miktar C vitamini içerir (Duyff 2002) ancak ısıyla bozulacağı için, pişirme sırasında hızla kaybedilir (Pauling 2007).

Biyolojik Sistemlerde C Vitaminin Rolü:

Kuvvetli bir indirgeyici ajan askorbik asit tipik peroksil radikalleriyle suda tepkimeye girer. Bazı biyolojik sistemlerde askorbik asitin antioksidan koruma sağlayarak lipid peroksidasyonuna karşı koyduğu gösterilmiştir (Dündar ve Aslan 1999). Süperoksit ve hidroksil gibi oksidanlarla hızlıca tepkimeye girerek hücreleri bu radikallerin hasarlarından korur. Antioksidan etkisinin yanında oksidan etkiye de sahip olan C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyebilen süperoksit radikali dışındaki tek hücreli ajandır (Niki 1987). Proteinlerin yapısındaki demir atomlarını inhibe ederek hidrojen peroksitin etkilerine uygun hale getirerek, süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliği, C vitaminini serbest radikal reaksiyonlarının bir katalizörü yapar ve prooksidan olarak değerlendirilmesine yol açar. (Akkus 1995).

Bunlara ek olarak, içeriğinde yağ molekülleri olan bitkisel ve hayvansal yağları, balık, margarin süt gibi besinleri oksidatif bozulmaya karşı korumaktadır.

C vitamininin, doymuş bir bileşik olması lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etkilerinin olması gebelik, süt verme dönemi, enfeksiyonlar ve zehirlenmeler gibi oksidatif stresin arttığı dönemlerde koruyucu etki göstermesi açısından önemlidir (Dawson ve ark. 1999). Kanseri ve kalp hastalıklarında da benzer bir koruma mekanizması göstermektedir.

C vitamini gastrointestinal sistemde enerji bağımlı sodyum kapılı kanallarla aktif transport yapılarak absorbe edilir. Dokulara taşınan C vitamininin fazlası böbreklerden idrarla atılır.

Yapılan araştırmalar C vitamininin bağ dokudaki kollejenin sentezinde görevli olduğu gösterilmiştir (Levine ve ark. 1992; Peel ve ark. 2006). Eksikliğinde kan damarları zayıflar ve küçük darbelerde bile kanamalar gözlenebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışma planı oluşturulduktan sonra Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alındı (Karar no: 2014-065). Çalışma bütçesi Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 141318005 proje no'lu kararı gereğince karşılandı. Çalışma için belirlenen optimum hayvan sayısı etik kurul tarafından onaylandı.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezinde ağırlıkları 300-550 gr arasında değişen 10-12 haftalık 31 adet erkek rat kullanılarak gerçekleştirildi. 22 ± 2 C oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritim sağlandı. Kullanılan deney hayvanlarında seçim kriteri olarak literatürde rat modeli kullanılmasının yanında deney hayvanlarına yapılmış olan tüm deneysel ve cerrahi işlemler Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun belirlemiş olduğu kurallara uyularak çalışılmıştır.

3.3. Deney Hayvan Grupları

Ratlar; 1. Grup (n=7) Kontrol, II. Grup (n=8) MTX tedavisi alan, III. Grup (n=8) MTX ve ardından C vitamini alan, IV. Grup (n=8) C vitamini alıp ardından MTX alan grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu): Bu gruptaki sıçanlara, 30 gün boyunca izotonik salin solüsyonu 2 mg/kg/gün intraperitoneal (ip.) olarak uygulandı.

Grup II (MTX grubu): Bu gruptaki sıçanlara 2 hafta süresince haftada 1 gün tek doz MTX, 10mg/kg/gün intraperitoneal (i.p) uygulandı.

Grup III (MTX + C vit grubu): Bu gruptaki sıçanlara, önce 2 hafta süresince haftada 1 gün tek doz MTX, 10 mg/kg/gün intraperitoneal (i.p) uygulandıktan sonra 10 gün boyunca günlük C vitamini, tek doz 100 mg/kg/gün intraperitoneal (ip.) uygulandı.

Grup IV (C vit + MTX grubu): Bu gruptaki sıçanlara ise ilk 10 gün süresince günlük tek doz C vitamini 100mg/kg/gün intraperitoneal (i.p) uygulandıktan sonra 2 hafta boyunca haftada 1 gün tek doz MTX, 10 mg/kg/gün intraperitoneal (ip.) uygulandı.

Deneyin sonunda %10'luk ketamin 20 mg/kg ve %2'lik ksilazin 3 mg/kg intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Anestezi altında testisler çıkarıldı.

Tablo 3.1. Deney grupları

Deney grupları	Sıçan sayısı	Tedavi	Doz	Süre
Grup I	7	Serum fizyolojik	2mg/kg/gün	4 hafta
Grup II	8	MTX	10mg/kg/gün	2 hafta
Grup III	8	MTX + C vit	10mg/kg/gün+100mg/kg/gün	4 hafta
Grup IV	8	C vit + MTX	100mg/kg/gün+10mg/kg/gün	4 hafta

Alınan dokular %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Daha sonra uygun doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde alınarak akan çeşme suyu altında yıkandı. Yıkanan dokular artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96) geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflandırıldı. Şeffaflandırılan testis dokuları, parafinde bekletildikten sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan HM 325 MİKRON marka mikrotom ile 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler elde edilerek, lam üzerine alındı. Alınan kesitler Hemotoksilen & Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Shift (PAS) boya ile boyandı. Entellan ile kapatılarak, üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlardan 10'ar adet seminifer tübül gelişimi güzel seçilerek, Olympus CX31 marka mikroskopta X400'lük büyütmede, germinal epitelin düzenli olup olmadığına, spermatogenetik faaliyetlerin aşamasına ve seminifer tübül çaplarına bakıldı. Bunun için Johnson skor'u kullanıldı.

Tablo 3.2. Johnson skorlaması

Skor 1	Seminifer túbüllerde hücre yok.
Skor 2	Germ hücreleri yok, yalnızca sertoli hücreleri görülüyor.
Skor 3	Var olan tek germ hücreleri spermatogonyumlardır.
Skor 4	Spermatazoa veya spermatid yok, 5'ten az spermatosit var.
Skor 5	Spermatazoa veya spermatid yok, ancak spermatositler var.
Skor 6	Spermatazoa yok, 10'dan az spermatid mevcut.
Skor 7	Bol spermatid mevcut, ancak spermatazoa yok.
Skor 8	Germinal epitelyum çok sıralı, ancak lümende 10'dan az sayıda spermatazoa var.
Skor 9	Germinal epitelde çok sıralı, ancak disorganize görünüm, lümende obliterasyona yol açan hücre dökülmesi var.
Skor 10	Çok sıralı, bol spermatazoa ve santralde açık lümen içeren túbüller var.

Her grupta rastgele 10 seminifer túbül için ayrı bir skor verildi ve bunların hesaplanan ortalamaları ile grupların Johnson skorları belirlendi. Deney grupları için hesaplanan ortalamalar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı, farklılığın hangi gruplar arasında olduğu Tukey karşılaştırma testi uygulanarak tespit edildi. Veriler ortalama, artı, eksi standart hata olarak verilmiştir (Johnson, 1970).

4. BULGULAR

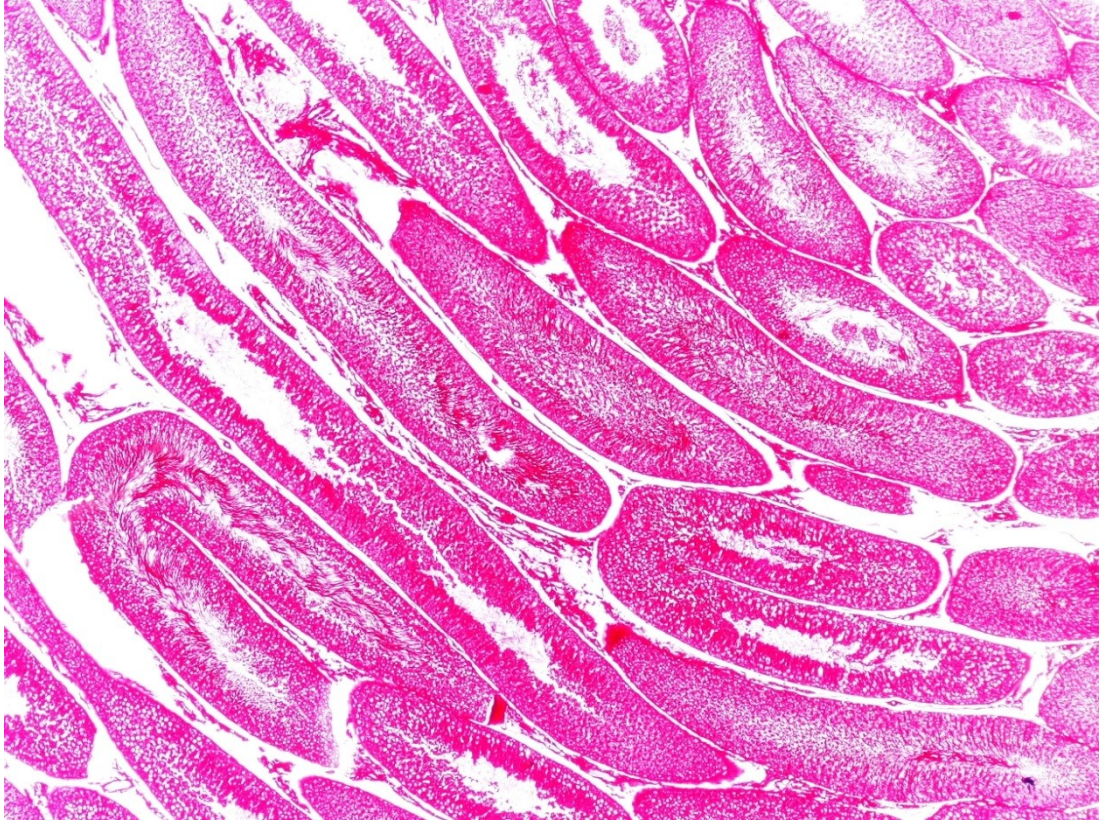
Her 4 gruptaki testis dokuları histopatolojik olarak incelenirken; seminifer tübüllerin genel yapısı, tübül içerisindeki spermatogenetik seri hücrelerinin varlığı ve interstisiyel alanın görünümü gözönünde bulundurulmuş kriterlerdir. Bunları değerlendirirken Johnson skorlama yöntemi kullanıldı. Her grupta rastgele 10 seminifer tübül içerisindeki spermatogenetik seri hücrelerinin hangi aşamada olduğuna ve tübüllerin yapısına bakılarak her bir tübül için ayrı bir skor verildi ve bunların istatistiksel olarak hesaplanan ortalaması ile grupların ortalama Johnson skorları belirlendi. Bu skorlama sistemine göre; Johnson skor 1 seminifer tübüllerde hücre yok. Skor 2 germ hücreleri yok, yalnızca sertoli hücreleri görülüyor. Skor 3 var olan tek germ hücreleri spermatogonyumlardır. Skor 4 spermatozoa veya spermatid yok, 5'ten az spermatozoid var. Skor 5 spermatozoa veya spermatid yok ancak spermatozoidler var. Skor 6 spermatozoa yok, 10'dan az spermatid mevcut. Skor 7 bol spermatid mevcut ancak spermatozoa yok. Skor 8 germinal epitelyum çok sıralı ancak lümende 10'dan az sayıda spermatozoa var. Skor 9 germinal epitelde çok sıralı ancak disorganize görünüm, lümende obliterasyona yol açan hücre dökülmesi var. Skor 10 çok sıralı, bol spermatozoa ve santralde açık lümen içeren tübüller var.

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

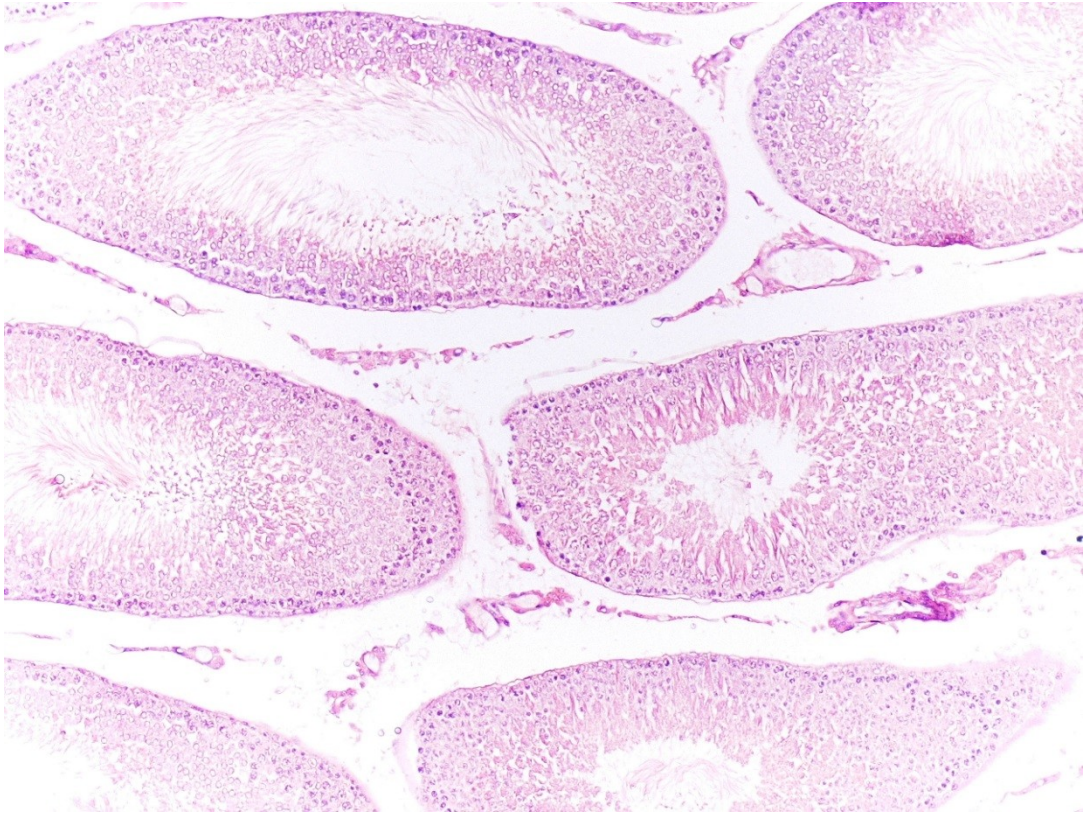
Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinde, genel görünümü saptamak için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası yapıldı.

4.1.1. Kontrol Grubu

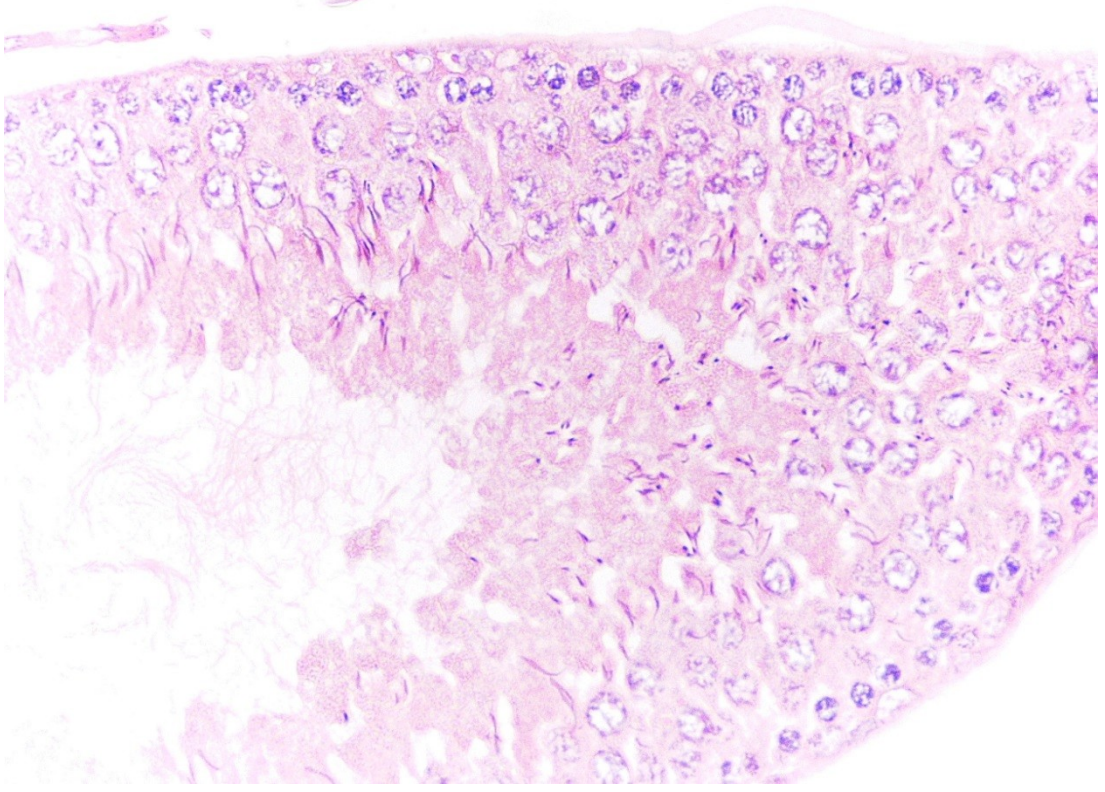
Testis dokusunda seminifer tübüller genellikle düzenli yapıda olup çap ve büyüklükleri bakımından minimal değişkenlik mevcuttur (Resim 3.1.1). Seminifer tübül epitelleri düzgün, Sertoli hücreleri bazal membran üzerinde dizilenim göstermekteydi. Spermatogenetik seriye ait hücreler, spermatozoaları da içerecek şekilde izlenmekteydi. İnterstisiyel alanda kan damarları ve az sayıda Leydig hücresi varlığı dikkati çekti (Resim 3.1.2, 3.1.3). Grubun ortalama Johnson skoru 9,74 olarak tespit edildi.



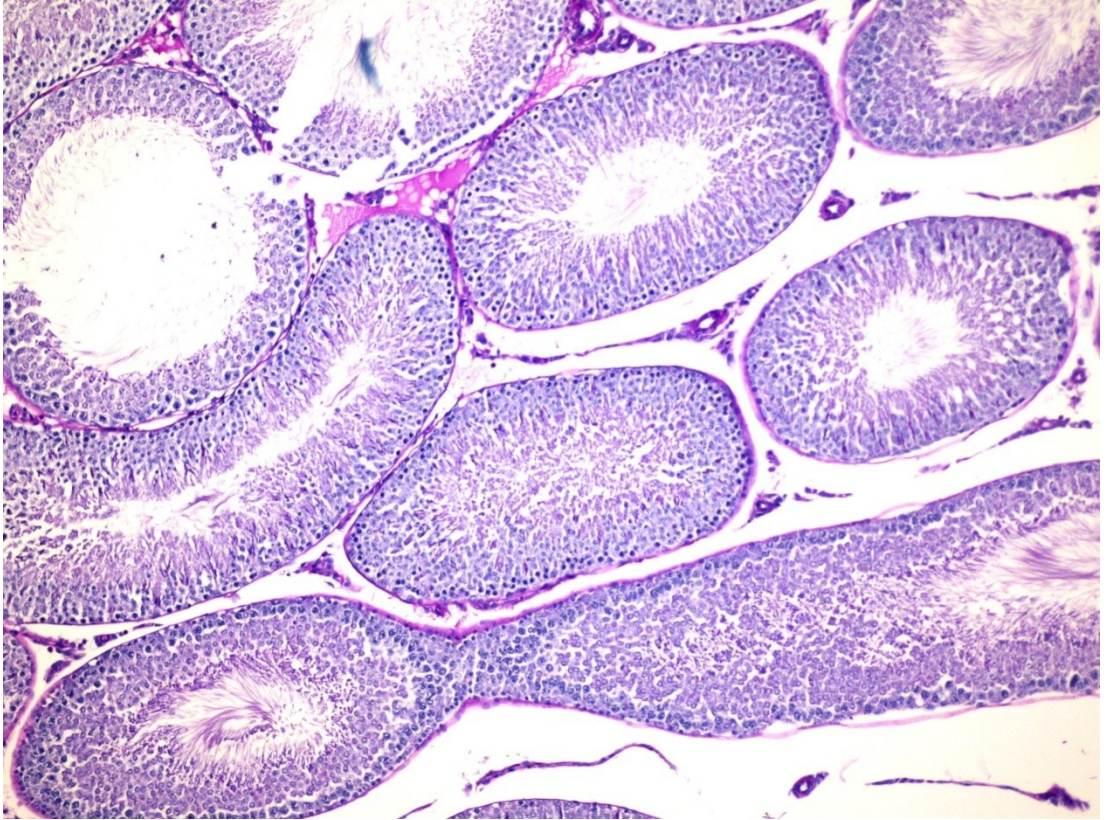
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x40)



Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100)



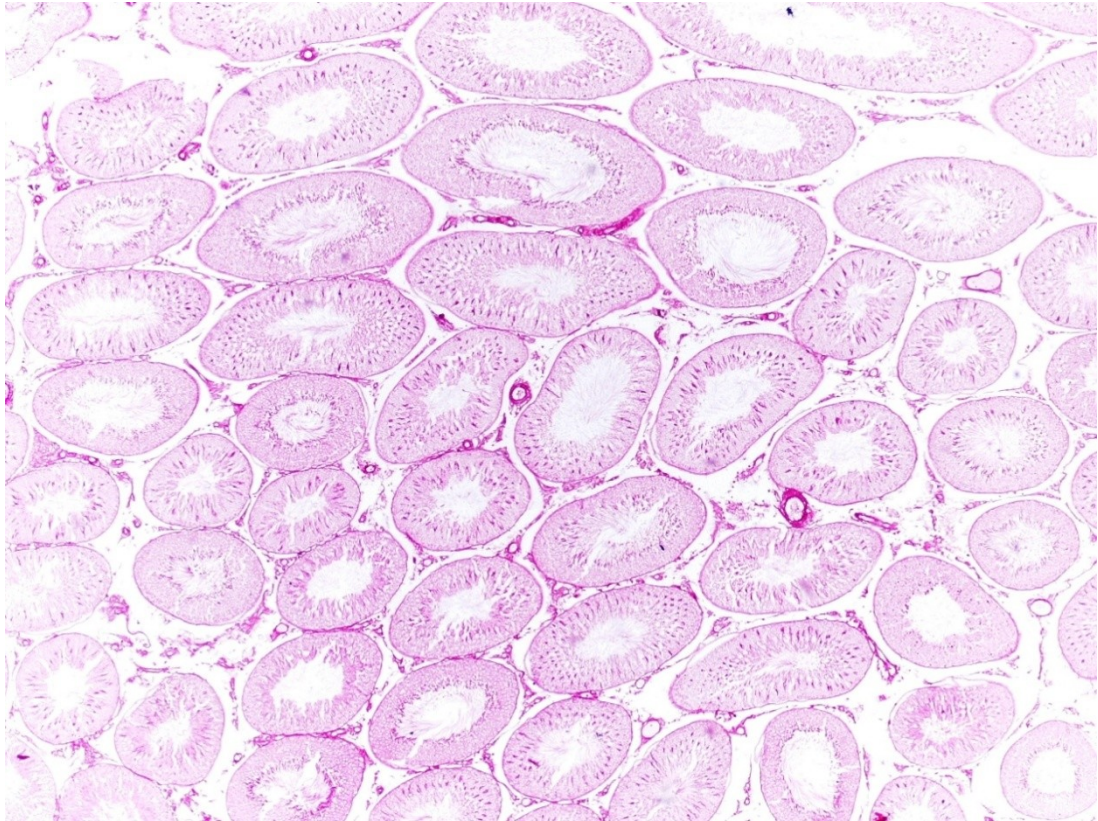
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200)



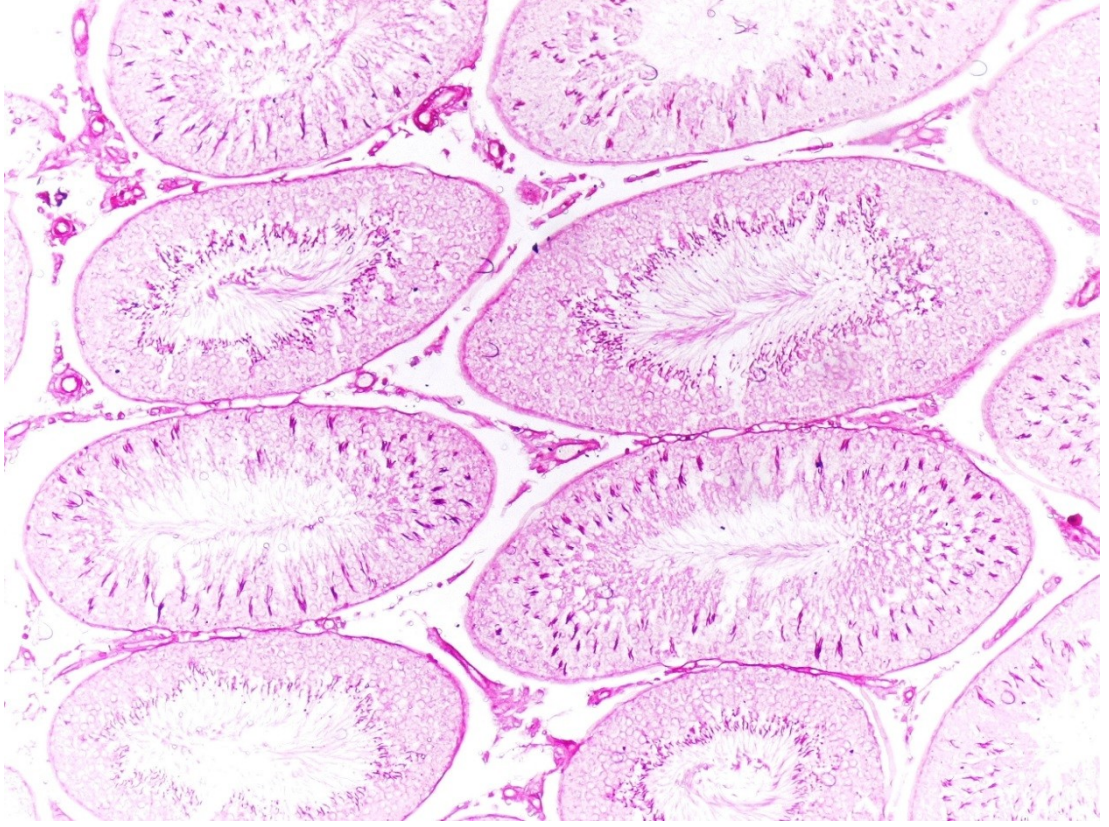
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x100).

4.1.2. Metotreksat (MTX) Grubu

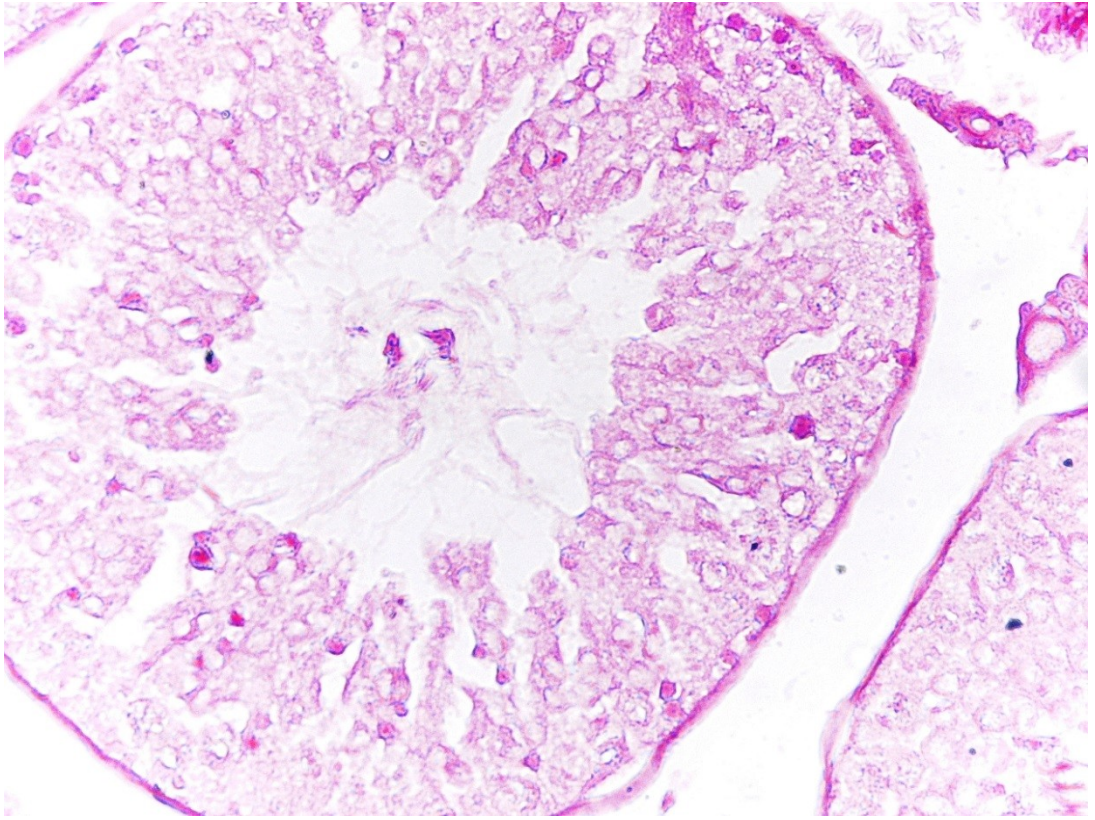
Bu grupta testis dokusunda seminifer túbüllerin fokal bir kısmı normal yapısını korumakta olup, bazı túbüllerde hücrelerin büyük oranda bazal membrandan ayrılarak lümeneye döküldüğü görüldü (Resim 3.2.1, 3.2.2). Túbüllerde atrofik değişiklikler belirgin olarak dikkati çekmekteydi. Atrofik túbüllerde sertoli hücreleri dışında spermatogenetik seri hücrelerinden primer spermatosit ve spermatidler izlendi ancak spermatozoa görülmeydi. Bazı alanlarda normale yakın boyutlarda túbüller mevcut olup bunların lümeninde spermatozoalar da tespit edildi. Ancak túbüllerin tamamında sertoli hücreleri mevcut olup, spermatozoalarıda içeren spermatogenetik seri hücrelerinde dikkati çeken azalma izlendi (3.2.2, 3.2.3). İnterstisyel alanda belirgin iltihabi hücre infiltrasyonu, kan damarları ve yer yer belirgin hiperplazi gösteren Leydig hücreleri yanısıra túbülleri birbirinden ayıran ödematöz boşluklar belirgindir (Resim 3.2.1, 3.2.2). Seminifer túbüllerde, sitoplazmik vakualizasyon ve artmış apoptoz görüldü. Bu grubun ortalama Johnson skoru 4,37 idi.



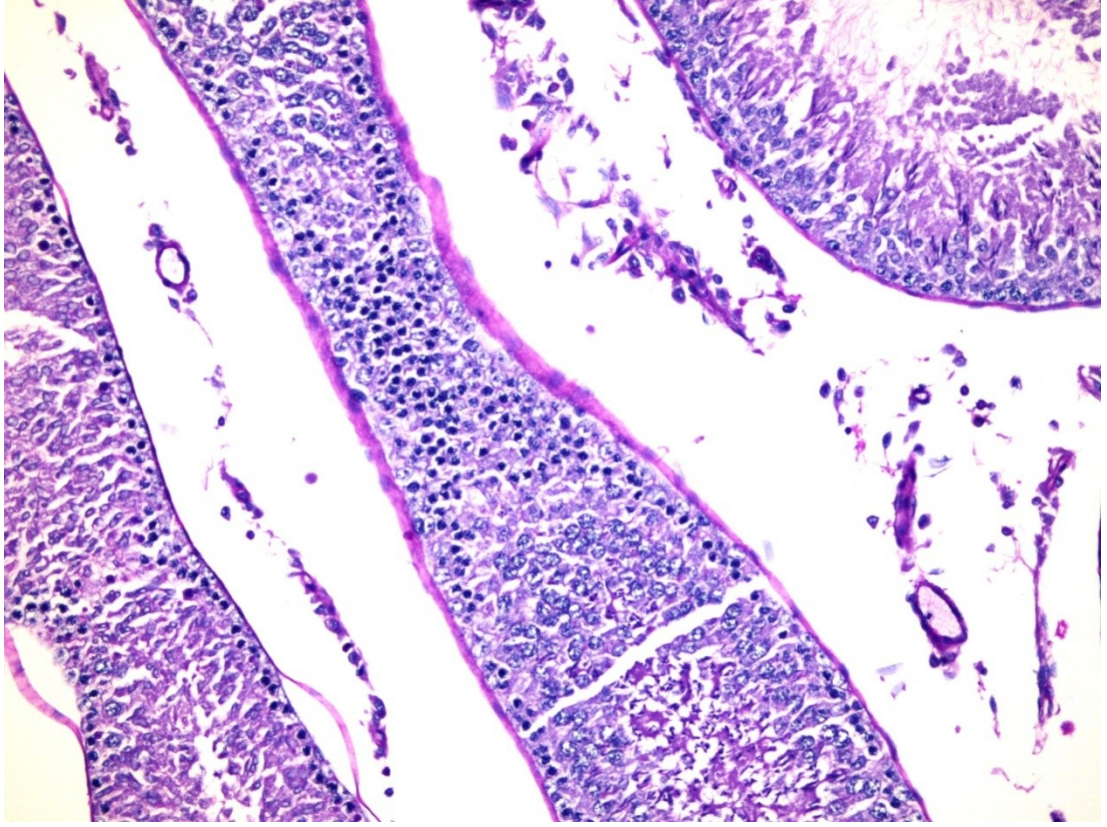
Şekil 4.5. MTX grubuna ait seminifer túbüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x40)



Şekil 4.6. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100)



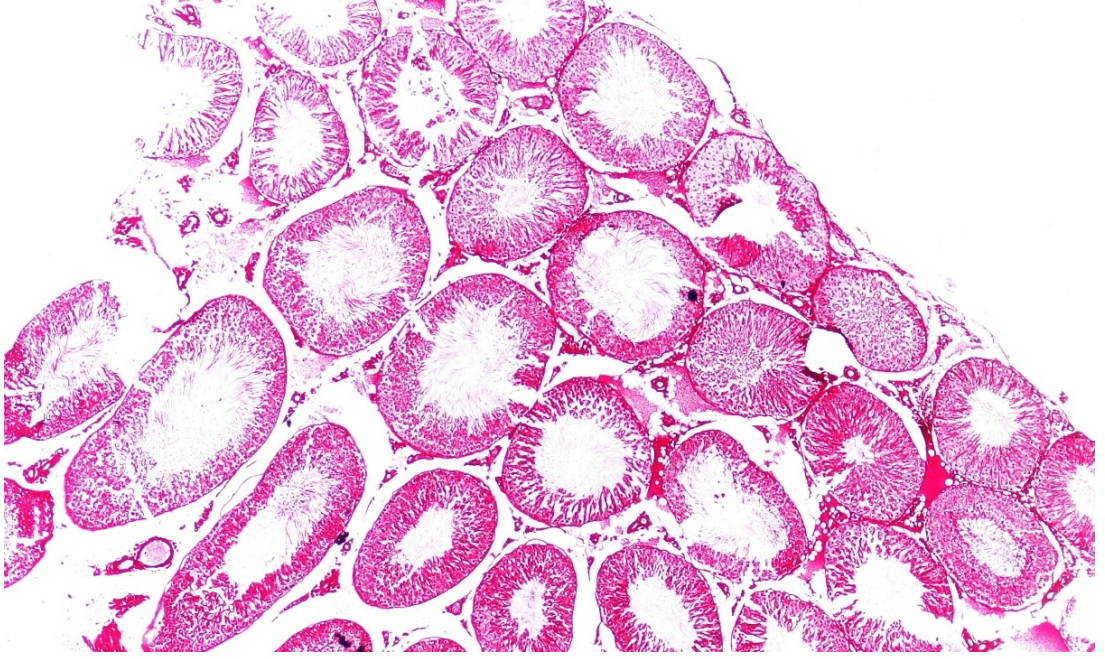
Şekil 4.7. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200)



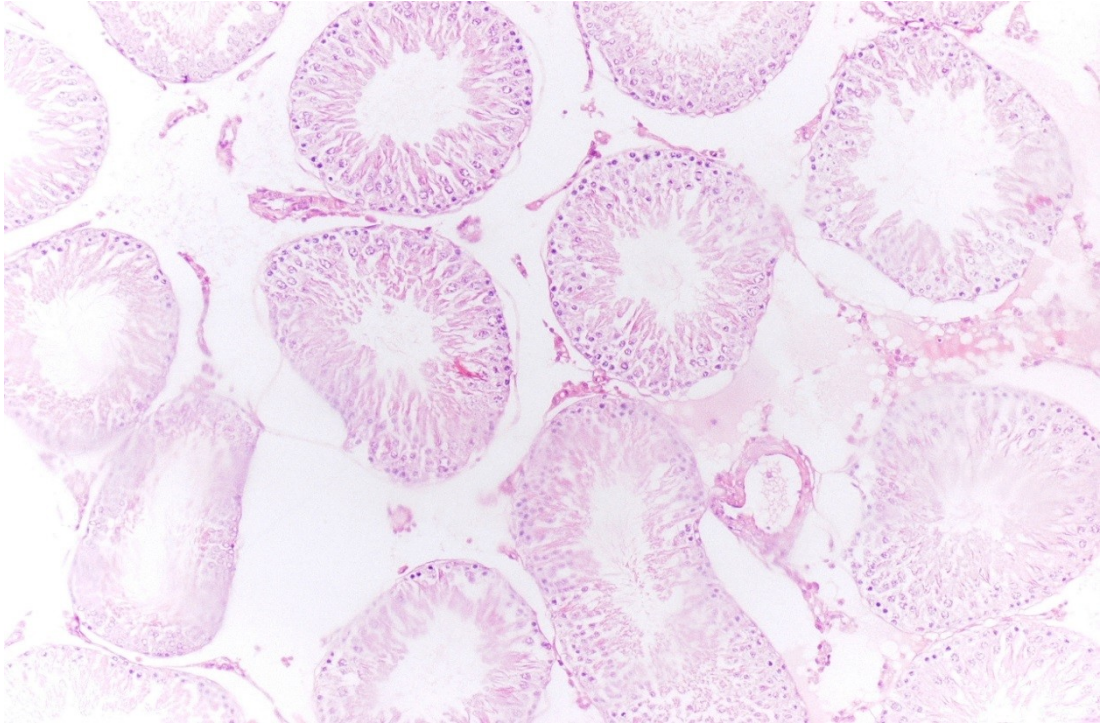
Şekil 4.8. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x200).

4.1.3. Metotreksat + C vit. Grubu

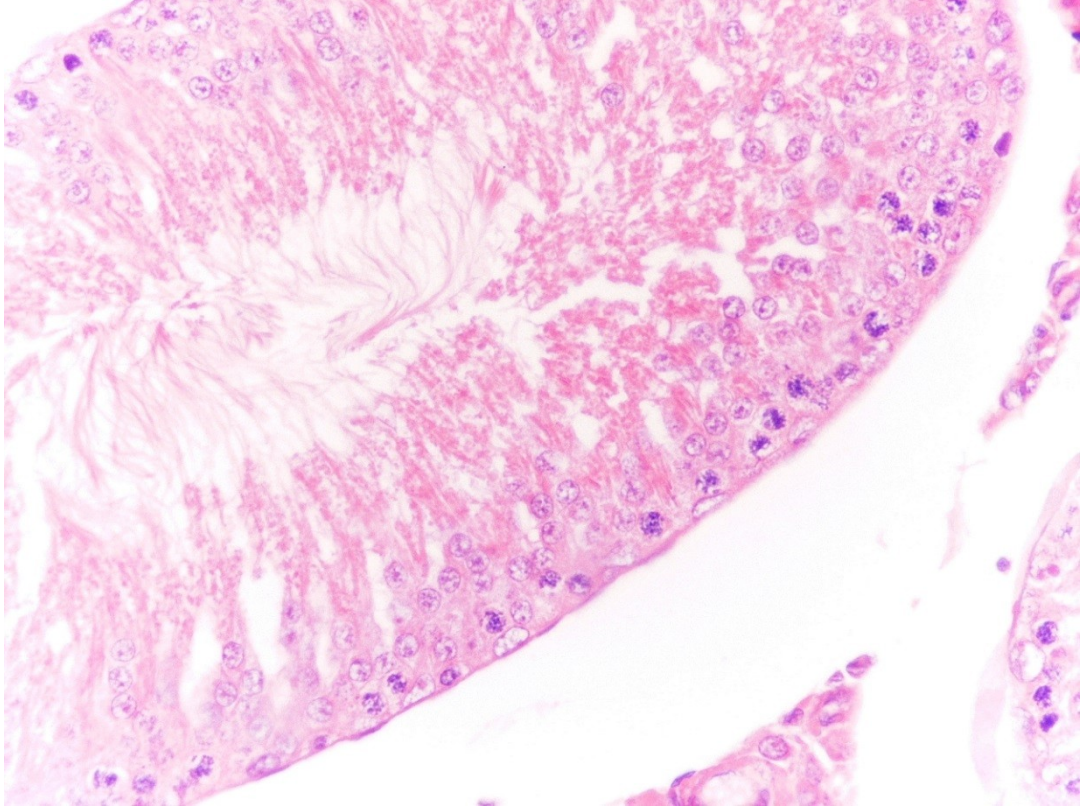
Bu grupta testis dokusundan hazırlanan kesitlerde, seminifer tübüllerin çoğunda hücrelerin bazal membrandan ayrılıp lümene döküldüğü görüldü. Sertoli hücreleri ve spermatozoaları da içeren spermatogenetik seri hücrelerinin yer yer kayba uğradığı izlendi (Resim 3.3.2, 3.3.3). İnterstisiyel alanda ödemin belirgin olduğu görüldü (Resim 3.3.1). Ortalama Johnson skoru 5,1 olduğu hesaplandı.



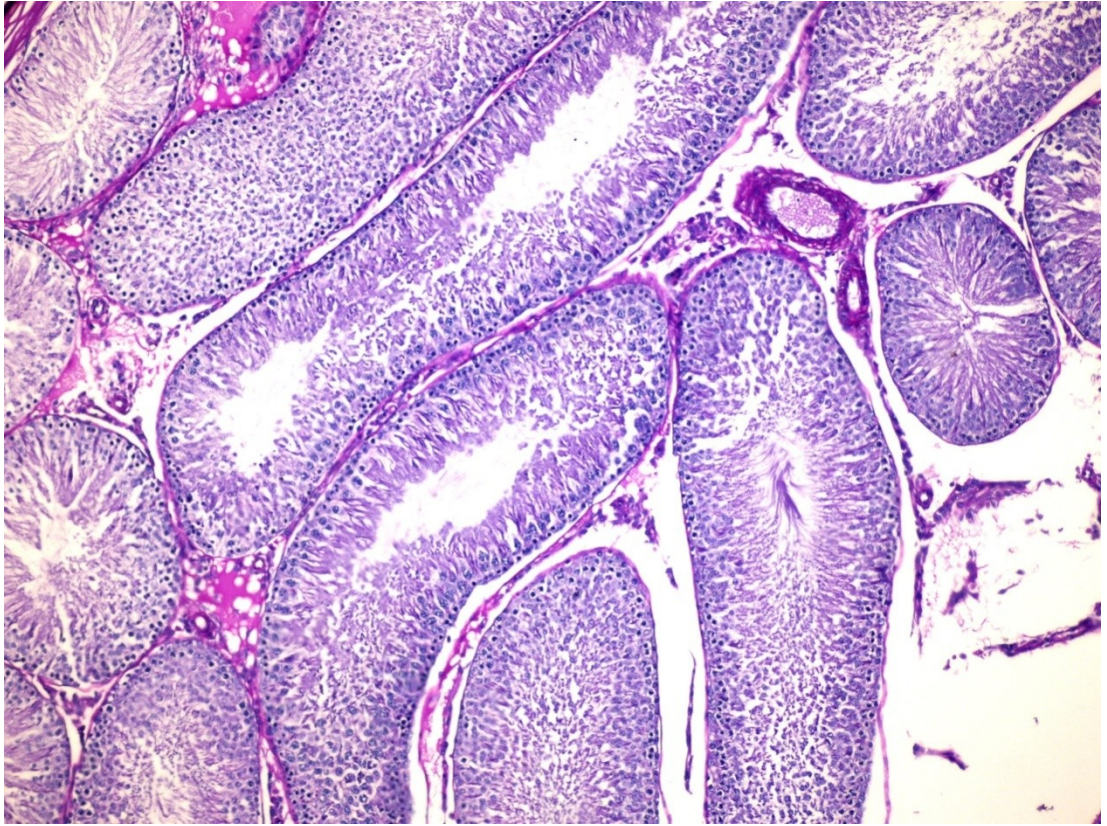
Şekil 4.9. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x40)



Şekil 4.10. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100)



Şekil 4.11. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x200)



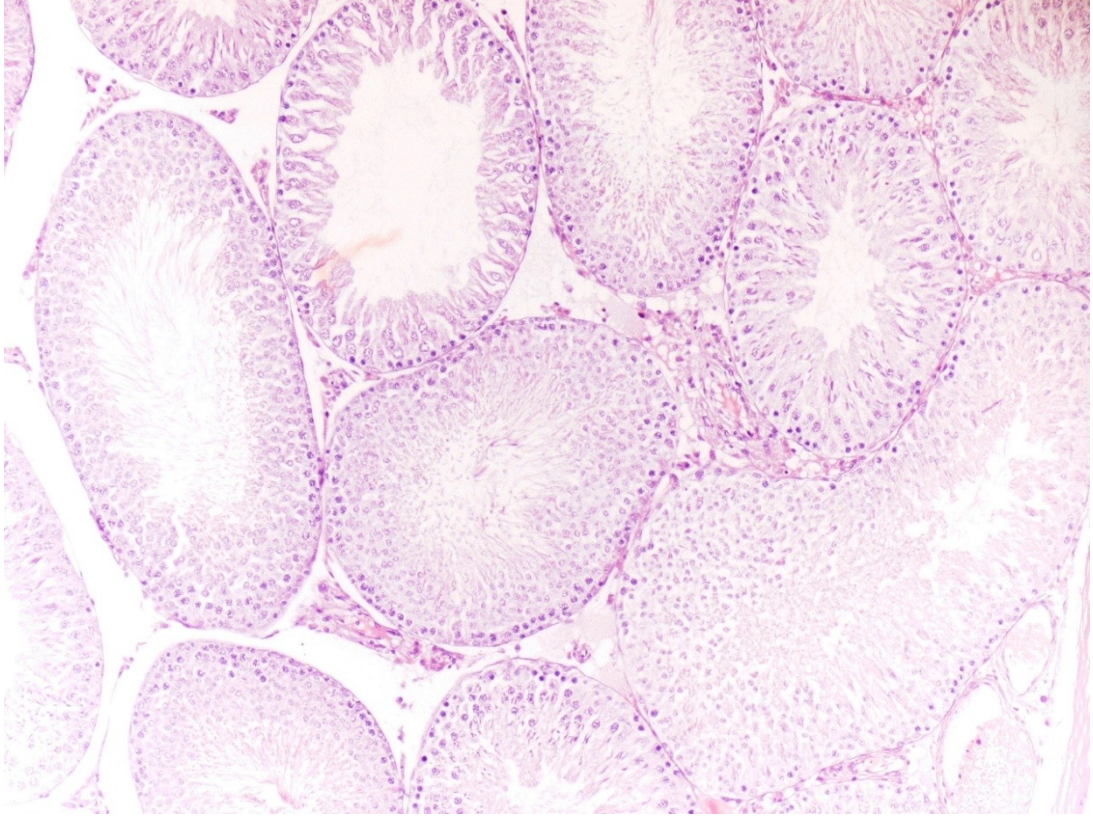
Şekil 4.12. MTX + C vit. grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x200).

4.1.4. C vit. + Metotreksat Grubu

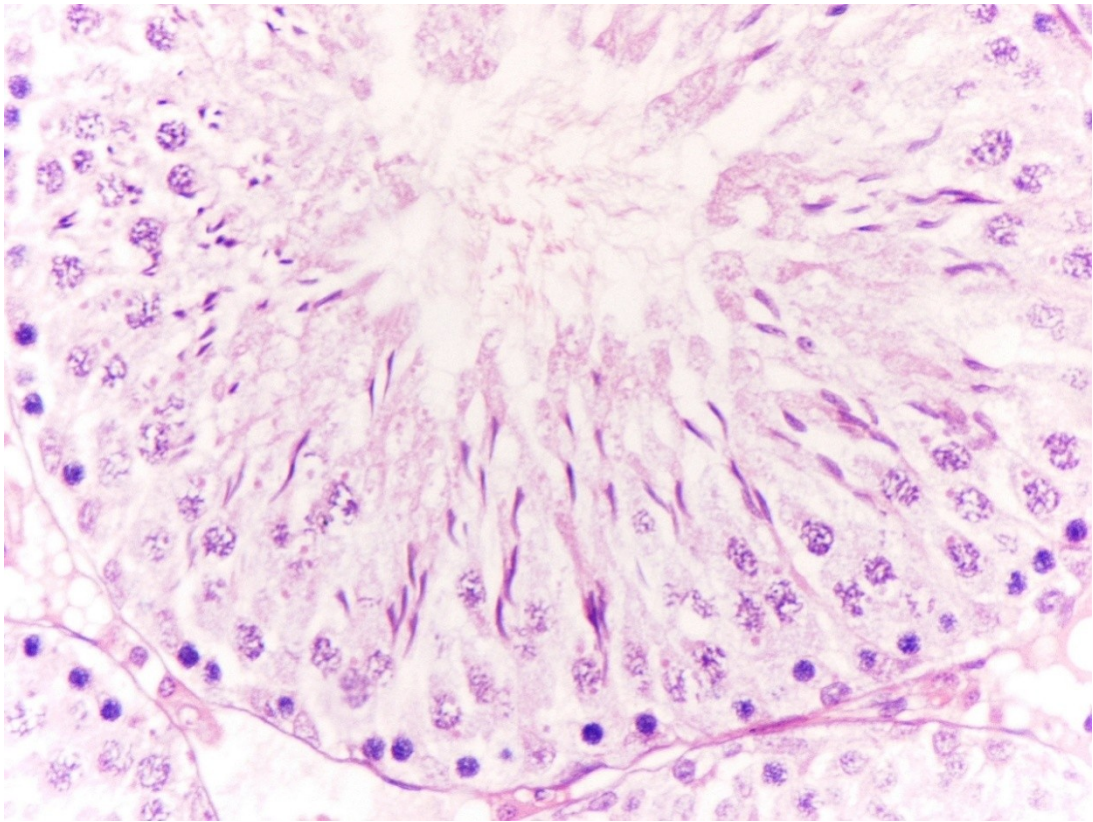
Bu gruptaki testis dokusunda, seminifer tübüllerin büyük oranda korunduğu izlendi (3.4.1, 3.4.2). Spermatogenetik seriye ait hücreler, spermatozoaları da içerecek Şekilde izlenmekteydi. İnterstisiyel alanda kan damarları ve az sayıda Leydig hücresi varlığı dikkati çekti (Resim 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3). Grubun ortalama Johnson skoru 7,2 olduğu hesaplandı.



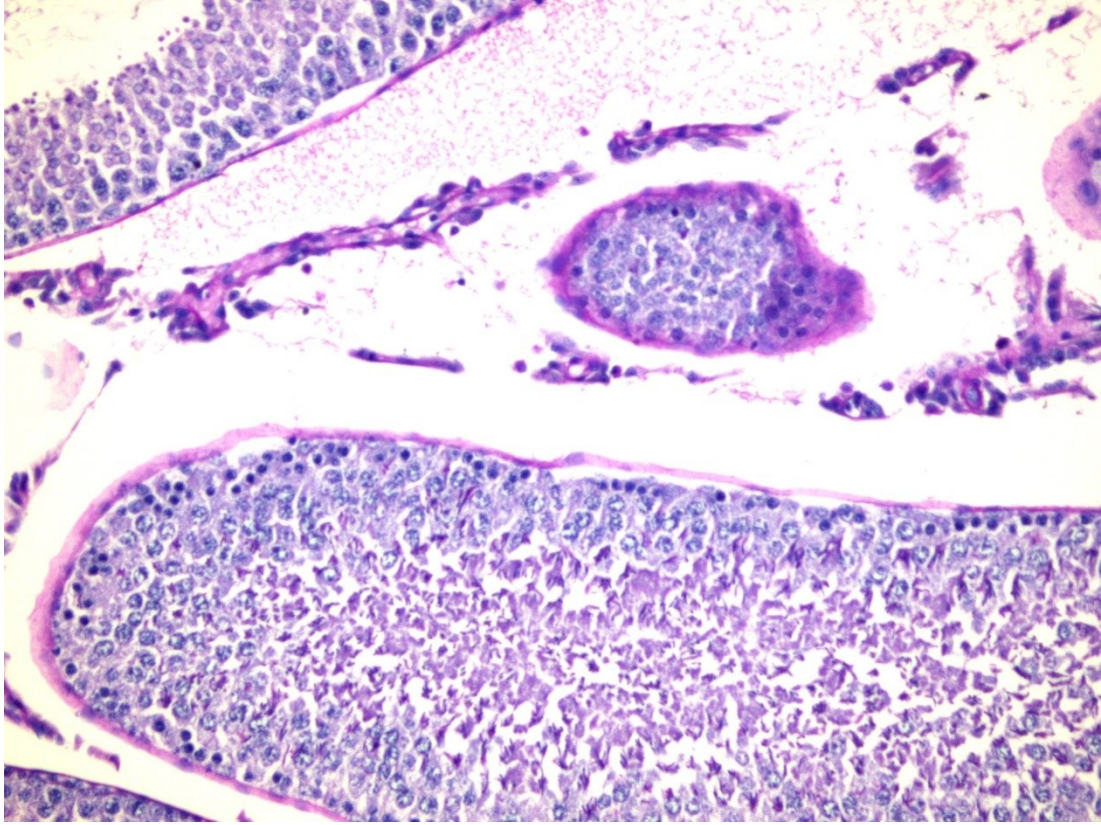
Şekil 4.13. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x40)



Şekil 4.14. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x100)



Şekil 4.15. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x200)



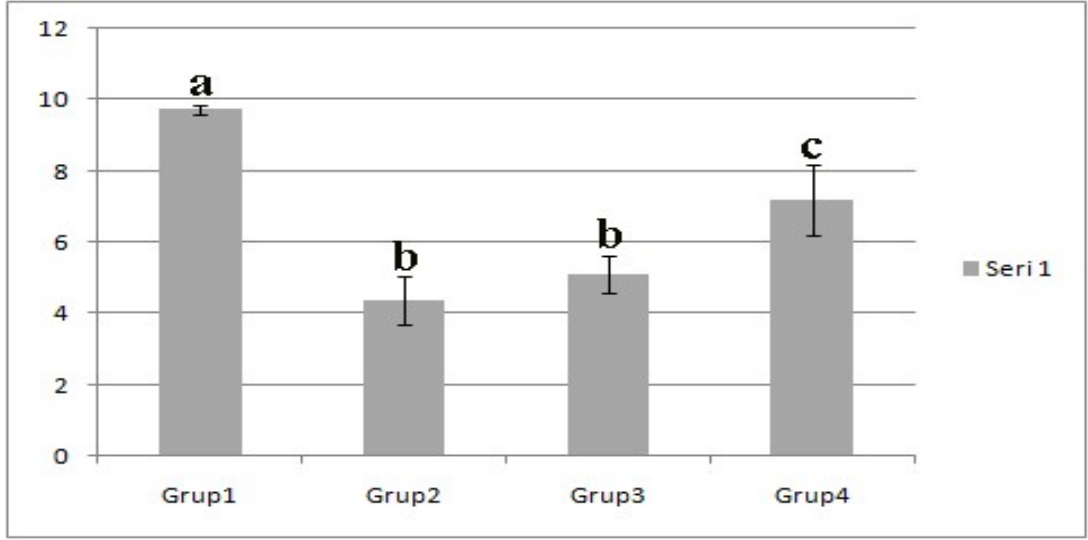
Şekil 4.16. C vit. + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin PAS boyası ile görüntüsü (x200).

4.2. Histopatolojik Bulgular

Seminifer tübül duvarındaki spermatogenez, Johnson kriterlerine göre değerlendirildi. Kontrol grubuna ait örneklerde ortalama değer 9,74 olarak bulunurken, MTX grubu'nda 4,37, MTX + C vit. Grubu'nda 5,1, C vit + MTX grubu'nda ise 7,2 olarak bulundu.

Tablo 4.1. Gruplar arası Jonhson skor ortalamaların One Way Anova, Tukey Testi ile karşılaştırılması, her bir sütundaki farklı harfler diğer gruplar ile arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir, $p < 0,05$ (Ortalama+ Standart Sapma).

No	Kontrol	Metotreksat	MTX+Cvit.	C vit. + MTX
1	9,7	5,5	4,5	8,2
2	9,7	3,9	5,9	8,2
3	9,8	3,9	5,7	8,1
4	9,7	4,9	5,1	7,1
5	9,5	4,4	4,6	6,8
6	9,9	4,5	5,1	6
7	9,9	3,5	4,8	6
Ortalama	9,74	4,37	5,1	7,2
St.hata	0,05	0,25	0,2	0,37



Şekil 4.17. Grup 2 ve grup 3 birbirine benzer ortalamalara sahip ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır. Grup 1; Grup 2 -Grup 3 ve Grup 4'ten, Grup 2-Grup 3; Grup 1 ve Grup 4'ten; Grup 4; Grup 1 ve Grup2-grup3'ten istatistiksel olarak anlamlı farklıdır. Grup 2'de MTX'in testislere verdiği zarar, Grup 4'te C vit + MTX uygulaması ile anlamlı olarak azalmıştır.

5. TARTIŞMA

Kanser çağımızın önde gelen sağlık sorunlarından birisidir. Yüzyılın başlarında ölümlere neden olmuş hastalıklar arasında 7-8. sırada yer almış ve dünyanın birçok ülkesinde ve ülkemizde kalp hastalıklarından sonra ikinci sıralarda yer almaktadır. Günümüzde kanserin doğası anlaşılmışsa da tedavide de bir o kadar ilerlemeler sağlanmaktadır. Geliştirilen tedavi yöntemleriyle bu hastaların yaşam süreleri uzatılmaya ve daha kaliteli yaşamaları sağlanmaya çalışılmıştır (Dedeli Ö. ve ark. 2008).

Sitotoksik ilaçların etkisi, antitümör etkilerini, kanser hücrelerinin spesifik hücre yapısını veya metabolik yolları bozarak etkisini göstermektedir. Sitotoksik ilaçlar, genel olarak alkilleyici ajanlar (örn. siklofosamid, ifosfamid ve sisplatin), antimetabolitler (örn. 5-florourasil ve Metotreksat), tubulin aktif ajanlar (örn. vinkristin ve paklitaksel) ve kullanılan antibiyotikler (örn. Doksoribisin ve Bleomisin) olarak sınıflandırılmıştır. Yapılmış tüm çalışmalarda çeşitli kategorideki sitotoksik ilaçların hem in-vivo hem de in-vitro olarak serbest radikal üretimine neden oldukları gösterilmiştir (Sabuncuoğlu S. ve ark. 2011). Kemoterapik ajanlar, kanserli olmayan normal doku ve hücrelerde çeşitli düzeyde neden olduğu yan etkiler, erkek infertilitesi hatta sterilitesi, kemoterapik ilaçların, üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkilerden sadece biridir (Türk G. 2013). Spermatogeneziste meydana gelen aksaklıklar, sperm kalite parametrelerinde oluşturduğu bozukluklar, ejakülasyon bozuklukları, hipotalamus, hipofiz ve gonad eksenindeki fonksiyon bozuklukları, cinsel işlev bozuklukları gibi birçok olumsuz durumlar kemoterapik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkiler arasında yer almaktadır. Testis dokusunda bulunan Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen kemoterapik ilaçlara dirençli iken, germinal epitelyum bu ilaçlara son derece hassastır. Ancak alınan kemoterapi protokolü, ilaç sayısı, dozu ve uygulama sürelerine bağlı olmakla beraber eğer germinal epitelyumda bulunan kök hücreler sağlam kalmışsa tedavinin sonlandırılmasından belli bir zaman sonra spermatogenezis geriye dönebilmektedir (Türk G. 2013).

Sitotoksik ilaçlarla, tedavi edilmiş hematolojik veya solid maligansili hastaların, polimorfonükleer lökositlerce in-vitro olarak H₂O₂ ve O₂ üretiminin tedavi öncesine oranla belirgin oranda arttığı görülmüştür. Birçok araştırmacı

tarafından kanser hastalarında kemoterapiye bağılı oluşan lipid peroksidasyonu (LPO), ürünlerinin miktarının yükselmesi, tedavi sonrasında da plazma E düzeyinin azaldığı dikkati çekmiştir. Radyoterapi ve kemoterapiklerin bir kısmı, serbest radikal üretimine neden olmuş ve bu da hücreölümüne sonuçlanmıştır. Kemoterapi nedeniyle oluşan reaktif oksijen türlerinin; DNA, RNA, protein ve lipid gibi moleküllerde hücre ölümüne kadar hasarlara neden olduğu belirtilmiştir (Sabuncuoğlu S. ve ark. 2011).

Bir folik asit antimetaboliti olan metotreksat, hücre siklusunun “s” durumundaki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar. Hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeniyle kanser tedavisinde uzun zamandır kullanılan bir kemoterapiktir. Malign hastalıklar arasında metotreksatın en önemli kullanım yeri akut lenfositik lösemi (ALL) hastalığıdır. Esasen kontrolsüz ve anormal hücre artışı ile karakterize olan malign hastalıklarda hücre bölünmesinin herhangi bir aşamasında etkili olan bu ilaçlar, aynı zamanda normal hücreler üzerinde de benzer etkiler göstermiştir. Metotreksat etkisine özellikle duyarlı olan hücreler: Kemik iliği, gastrointestinal mukozaya, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler olmak üzere hızlı bölünen hücrelerdir. Metotreksat tedavisi alan erkeklerde, yeni spermatozoon oluşumunun bozulması neticesinde gelişen infertilite önemli bir sorundur (Işık A. ve ark. 1997). Vardı ve ark. ları kanser tedavisinde kullanılan metotreksat’ın testis dokusunda oluşturduğu değişiklikler üzerine klorojenik asit’in etkisini araştırmışlar. Epidemiyolojik çalışmalar neticesinde sebze ve meyveden zengin beslenmenin sağlıklı bir hayat ve hastalıklara karşı direncin artırılmasında veya da hafifletilmesinde önemli olduğunu göstermişlerdir. Son yıllarda birçok araştırmacı bu konu üzerinde çalışmalar yapmıştır (Vardı N. ve ark. 2010). Bu çalışmada metotreksat’ın, testislerde yarattığı hasarına ve histopatolojik bulgulara, bir antioksidan olan C vitamininin kullanılarak etkileri ve düzenli besin alımının sağlığa katkıları araştırıldı. Testislerde, metotreksat hasarını önlemede tek başına C vitamininin uygulandığı herhangi bir histolojik çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, literatürde ki benzer çalışmalarla uyumlu C vitamini bilgileri kullanılmıştır. Hücre içinde bir tripeptit (glutamik asit, sistein, glisin) olarak sentezlenen glutatyon, NADPH’ ı kullanarak hücrelere indirgeyici güç sağladığı bilinmektedir. Hücre esas olarak indirgenmiş formda (GSH) bulunmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin kimyasal ve metabolik oluşumuna yol açan hücre içi ve/veya hücre dışı koşullar oksidatif stres olarak tanımlanmıştır. GSH,

antioksidan, vitaminler (vit E, vit C), antioksidan enzimler, oksidatif hasara karşı hücreleri korumada önemli rol oynamaktadırlar (Aksoy Y. 2002). Vardı ve ark.'larının yapmış oldukları bir çalışmada, metotreksat'ın antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azalttığı ve hücreleri reaktif oksijen partiküllerine (ROP) karşı hassas hale getirdiği ve testiste hasara neden olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres testis dokusunda hasara neden olmuş ve kullandıkları bir antioksidan olan klorogenik asit (chA) in testis hasarını azalttığı ve seminifer tübülleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruduğu gösterilmiştir (Vardı N ve ark. 2010). Çalışmada 24 adet sıçan kullanılmış, sıçanlar rastgele 4 gruba ayrılmış. 1. grup kontrol, 2. grup chA, 3. grup metotreksat, 4. grup ise chA + MTX grubudur. Metotreksat grubuna, 21. gün tek doz i.p yolla 20mg/kg metotreksat uygulanmış. Bizde yaptığımız çalışmada, metotreksat grubuna, iki hafta süresince haftada tek doz 10mg/kg/gün metotreksat i.p yolla uyguladık. Yapılan her iki çalışmada da, total 20mg/kg metotreksatı i.p yolla verilmiştir. Vardı ve ark.' ları, 4.gruba önce antioksidan olan chA 100mg/kg i.p yolla, 24 gün süresince vermiş ve 21.günde metotreksat tek doz 20mg/kg ip yolla verilmiş. Bizde bu çalışmada 31 adet sıçan kullandık ve rastgele 4 gruba ayırdık. 1. Kontrol grubu olup, 7 adet sıçan vardır. 2.grup metotreksat grubu olup, 8 adet sıçan vardır. 3. grup MTX + C vit olup, 8 adet sıçan vardır. 4. grup ise C vit + MTX grubu olup, 8 adet sıçan kullandık. Vardı ve ark.' larının çalışmasıyla benzer olarak, metotreksat hasarını ve antioksidan kullanımının etkileri incelendi. Çalışmamızın farklı bir yönü ise antioksidanın, metotreksattan önce ve metotreksattan sonra kullanılarak etkilerini karşılaştırarak değerlendirdik. Bir başka sonuç, düzenli beslenmenin sağlıklı yaşama katkılarını da göstermek oldu. Ahmed E.A. ve ark.' larının yapmış oldukları bir çalışmada, ratlarda sisplatine bağlı oluşan oksidatif hasara karşı vitamin C, DPPD ve L-Sistein'in antioksidan aktivitesini değerlendirmişlerdir. Antioksidan enzimlerin SOD, CAT ve GST aktivitelerinde anlamlı bir düşmenin eşlik ettiği, belirgin lipid peroksidasyonu (LPO), total peroksidaz ve süperoksit anyon düzeylerinin ise yükseldiği izlenmiştir. Sisplatin ile tedavi edilmiş ratların testislerinde kontrol grubuyla kıyaslanmış ve glutatyon (GSH), vit E ve vit C içeriğinin anlamlı olarak düştüğü izlenmiştir. Sisplatinin C vit, DPPD veya L-sistein ile birlikte verilmesi, sisplatinin süperoksit anyon ve antioksidan içerikler üzerinde etkisini düşürmüştür. Sisplatin enjeksiyonundan önce vit C, DPPD veya L-sistein verilmesi histolojik tabloyu düzelttiği ve apoptotik hücre sayısını azalttığı saptanmıştır (Ahmed E.A ve ark. 2011). Bu çalışmada antioksidan olarak

kullandığımız C vitamini iki şekilde uygulanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. MTC + C vit grubuna, MTX önce uygulanmış, 10mg/kg/gün i.p yolla iki hafta süresince haftada bir gün, tek doz verildikten sonra C vitamini 10 gün süreyle hergün 100mg/kg i.p yolla uygulandı. Diğer bir grup ise C vit + MTX grubu olup, önce C vitamini düzenli 10 gün süreyle hergün 100mg/kg/gün i.p yolla uygulanmış, ardından MTX 10mg/kg/gün iki hafta süreyle haftada bir gün, tek doz i.p yolla uygulanmıştır. Çalışma neticesinde, Ahmed E.A ve ark. larının yapmış olduğu çalışmayla, bu çalışma neticesinde, benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yani C vitaminin önceden verilmesi metotreksatın testis dokusuna yapmış olduğu hasarı azalttığı, hatta en aza indirdiği ve antioksidanların koruyucu etkilerini bize gösterdi. Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Hem Spermatogenez hem Leydig hücresi, Steriodogenez, oksidatif stresle hasar görmektedir. Testis bu hasardan korunmayı sağlayabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. C vitamini seminal plazmadaki antioksidan kapasitesinin kırılmasında önemli bir zincirdir. Yani C vitamini spermatogenez desteklemektedir (AL-Asadi F.S 2011). Bu çalışmada, MTX grubuna haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün i.p yolla MTX uyguladık. Çalışma neticesinde MTX'in testislerde, spermatogenetik hücrelerde azalmaya, testiküler hasara neden olduğu görülmüştür. Bu gruplara Johnson testiküler biopsi skorlama (JTBS) kullanılarak değerlendirmeler yapıldı ve çalışma neticesinde seminifer tübüllerde sitoplazmik vakualizasyon ve artmış apopitoz izlendi. Bu çalışmada bir antioksidan olan C vitamininin etkisi daha görebilmek için MTX + C vit. verilmiş diğer grup ise C vit + MTX olarak iki grup oluşturduk. MTX + C vit grubuna önce MTX iki hafta süresince haftada bir gün tek doz i.p yolla uygulanmış ardından 10 gün süresince her gün bir kez 100mg/kg/gün C vit i.p yolla uygulanmış olup, diğer grup olan C vit + MTX grubuna ise önce C vitamini 10 gün boyunca her gün tek doz 100mg/kg/gün i.p yolla verilmiş ardından MTX, iki hafta süresince haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün i.p yolla verildikten sonra gruplar anestezi altında sakrifiye edildi. Bu çalışma Johnson testiküler biopsi skorlama (JTBS) neticesinde C vit + MTX grubu diğer grup olan MTX + C vit'e oranla daha anlamlı ve yüksek değerler çıktı. Önce 10 gün 100mg/kg/gün C vitamini alıp ardından iki hafta süresince haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün MTX verilmesi, testislerde daha az hasarlanma olmakla beraber seminifer tübüllerin büyük oranda korunduğu izlendi. Diğer grup olan MTX + C vit alan ratlara ise öncesinde MTX, iki hafta süresince

haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün i.p verilmiş ardından 10 gün süresince her gün tek doz 100 mg/kg C vitamini i.p yolla verildi. Öncesinde herhangi bir antioksidan almayan ratlarda, antioksidan alan ratlara oranla seminifer tübüllerin çoğunda, hücrelerin bazal membrandan ayrılıp lümene döküldüğü, spermatogenetik seri hücrelerin yer yer kayba uğradığı izlendi. Bu iki grubu kıyasladığımızda C vitamininin MTX hasarını en aza indirip, seminal plazmayı büyük oranda koruduğu izlendi.

Başka bir çalışmada Aitken R.J. ve ark. ları antioksidan alımının oksidatif stresin testiste yarattığı hasarları en aza indirdiği ve koruyucu etkilerini göstermişlerdir (Aitken R.J ve ark. 2008). Sanghishetti V. ve ark.'larının yaptığı çalışmalarda vitamin C ve vitamin E nin eksikliği oksidatif stresi başlatır. Vitamin C membran bütünlüğünü ve hücrel fonksiyonları koruyarak oksidatif stresi azalttığı anlatılmıştır (Sanghishetti V ve ark. 2014). Bu çalışma ile MTX, testiste meydana getirdiği hasarın histopatolojik olarak araştırılması ve bu hasarın oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünüldüğünden bir antioksidan tedavisi uygulanarak potansiyel olumlu etkilerinin histolojik olarak gösterilmesi amaçlandı.

Benzer bir çalışmada Yuluğ E. Ve ark. larının yapmış oldukları çalışmada MTX ile uyarılmış testis hasarına karşı bir antioksidan olan resveratrol'un biyokimyasal, histopatolojik ve apoptotik düzeylerde koruyucu etkisine işaret etmektedir. Çalışmada sıçanlar rastgele gruplara dağıtılmıştır. Çalışmada sıçanlar kontrol grubu, MTX grubu, Resveratrol grubu ve MTX + Resveratrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. MTX grubundaki sıçanlara 7 gün boyunca hergün i.p yolla 30 mg/kg/gün MTX uygulanmış. Res grubundaki sıçanlara 20 mg/kg resveratrol i.p yolla 10 gün süresince uygulanmıştır. Diğer bir grup olan MTX + Res grubuna ise 3 gün süresince 30mg/kg/gün MTX i.p yolla uygulandıktan sonra resveratrol 7 gün süreyle 20mg/kg olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada ise benzer olarak MTX hasarına karşı bir antioksidan, i.p yolla kullanılmıştır. Deney sonucunda plazma ve melondialdehit (MDA) düzeyleri dokudaki süperoksit dismütaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi testiküler histopatolojik hasar skorları, testiküler ve epididimal indeksle değerlendirilmiştir. MTX grubu, kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek plazma, plazma MDA seviyelerine ve anlamlı daha düşük SOD ve CAT aktivitesine sahipti. MTX grubu ile MTX + Res grubu karşılaştırıldığında MTX + Res grubundaki plazma ve doku MDA seviyeleri önemli, SOD aktivitesi ümit verici

oranda düştüğü izlenmiş. Johnsen testiküler biopsi skorlamasında (JTBS), MTX grubu kontrol grubundan anlamlı daha düşük değerlere sahip olduğu izlendi. Johnsen testiküler biopsi skorlamasıyla (JTBS), MTX + Res grubundaki değerler MTX grubundan anlamlı ve daha yüksekti (Yuluğ E. Ve ark.). Bu çalışmada resveratrol yerine antioksidan olarak C vitamini kullanıldı. MTX dozu 7 gün boyunca her gün 30mg/kg/gün olarak i.p yolla uygulandı. Bu alışmada, MTX dozu iki hafta süresince haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün olarak i.p verildi. Bu alışma ile kıyasladığımızda, MTX'in testis dokusuna yaptığı hasar ve bu hasarın etkilerini azaltacak benzer etki gösteren farklı bir antioksidan kullanıldı.

Bu çalışmada, tüm bu bilgilerden yola çıkarak sıçan testislerinde MTX'in yapmış olduğu hasarın bir antioksidan olan C vitamini ile dzeltilebilirliği histolojik olarak gösterildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, çağımızın en ön sıralarda yer alan sağlık sorunlarından biridir. Yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar arasında 7-8. sırada yer alırken, bugün hemen dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye’ de kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Geliştirilen tedavi yöntemleri sayesinde hastaların yaşam sürelerinin uzatılması ve daha kaliteli yaşamaları amaçlanmaktadır (Dedeli Ö. Ve ark. 2008). Sitotoksik ilaçların etkisi, antitümör etkilerini, kanser hücrelerinin spesifik hücre yapısını veya metabolik yolları bozarak etkisini göstermektedir. Yapılmış tüm çalışmalarda çeşitli kategorideki sitotoksik ilaçların, hem in-vivo hem de in-vitro olarak serbest radikal üretimine neden oldukları gösterilmiştir. Kemoterapik ajanlar, kanserli olmayan normal doku ve hücrelerde çeşitli düzeyde neden olduğu yan etkiler, erkek infertilitesi hatta sterilitesi, kemoterapötik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği yan etkilerden sadece biridir. Testis dokusunda bulunan Leydig ve Sertoli hücreleri kısmen kemoteraplere dirençli iken, germinal epitelyumda bulunan hücreler son derece hassastır. Ancak alınan kemoterapi protokolü, ilaç sayısı, dozu, ve uygulama sürelerine bağlı olmakla beraber, eğer germinal epitelyumdaki hücreler sağlam kalmışsa tedavinin sonlandırılmasından belli bir zaman sonra spermatogenezis geriye dönebilmektedir. Radyoterapi ve kemoterapiklerin bir kısmı, serbest radikal üretimine neden olmuş ve buda hücrelölümle sonuçlanmıştır. Metotreksat tedavisi alan erkeklerde, yeni spermatozoon oluşumunun bozulmasına bağlı oluşan infertilite önemli bir sorun haline gelmiştir.

Metotreksat’ın antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azalttığı ve hücreleri, reaktif oksijen partikülleri (ROP)’a karşı hassas hale getirdiği ve testiste hasara neden olduğu gösterilmiştir. Testis bu hasardan korunmayı, sağlayabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. C vitamini seminal plazmadaki antioksidan kapasitesinin kırılmasında önemli bir zincirdir. C vitamini spermatogenezisi desteklemektedir. Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada, metotreksat’ın testiste meydana getirdiği hasarın histopatolojik olarak araştırılması ve bu hasarın oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünüldüğünden bir antioksidan tedavisi uygulanarak potansiyel olumlu etkilerinin histolojik olarak araştırılması amaçlandı.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda yer alan gruplardan kontrol grubuna 28 gün süresince her gün, günde bir kez serum fizyolojik 2mg/kg i.p yoldan uygulandı. Diğer bir grup olan, MTX grubuna ise, iki hafta boyunca haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün i.p yoldan MTX uygulanmıştır. Diğer bir grup olan MTX + C vit grubuna öncelikle MTX, iki hafta süresince haftada bir gün, tek doz 10mg/kg/gün i.p verildikten sonra, 10 gün süresince her gün tek doz 100mg/kg/gün C vitamini i.p yoldan verildi. Son grup olan C vit + MTX grubuna ise öncelikle 10 gün süresince her gün tek doz C vitamini 100mg/kg/gün i.p yoldan uygulandıktan sonra iki hafta süresince haftada bir gün tek doz MTX 10mg/kg/gün i.p yoldan uygulanmıştır. Deney sonunda rutin histolojik doku takibi yapıldıktan sonra hematoksilen eozin (H&E) ve periyodik asit shiff (PAS) ile boyanan dokular, mikroskopta seminifer tübüllerin genel yapısı, tübül içerisinde gerçekleşen spermatogenez olayındaki spermatogenetik seri hücrelerinin varlığı ve interstisiyel alanların görünümü açısından değerlendirildi. Değerlendirme johnsen testiküler biopsi skorlama (JTBS) testine uygun değerlendirilmiştir. Değerlendirmede kontrol grubunda; Testis dokusunda seminifer tübüller genellikle düzenli yapıda olup, çap ve büyüklükleri bakımından minimal değişkenlik mevcuttu. Seminifer tübül epitelleri düzgün, sertoli hücreleri bazal membran üzerinde dizelenim göstermektedir. Spermatogenetik seriye ait hücreler, spermatazoaları da içerecek şekilde izlenmekteydi. İnterstisiyel alanda kan damarları ve az sayıda Leydig hücresi varlığı dikkati çekti. Grubun ortalama Johnson skoru 9,74 olarak tespit edildi. Metoteksat grubunda ise Testis dokusundaki seminifer tübüllerin fokal bir kısmı normal yapısını korumakta olup, bazı tübüllerde hücrelerin büyük oranda ayrılarak lümeneye döküldüğü görüldü. Tübüllerde atrofik değişiklikler belirgin olarak dikkati çekmekteydi. Seminifer tübüllerde sitoplazmik vakualizasyon ve artmış apoptoz görüldü. Ancak tübüllerin tamamında sertoli hücreleri mevcut olup, spermatazoalarında içeren spermatogenetik seri hücrelerinde dikkati çeken bir azalma izlendi. İnterstisiyel alanda belirgin iltihabi hücre infiltrasyonu, kan damarları ve yer yer belirgin hiperplazi gösteren Leydig hücreleri yanı sıra tübülleri birbirinden ayıran ödematöz boşluklar belirgindi. Bu grubun johnson skoru 4,37 olarak belirlendi. MTX + C vit grubunda ise testis dokusundan hazırlanan kesitlerde seminifer tübüllerin çoğunda hücrelerin bazal membrandan ayrılıp lümeneye döküldüğü görüldü. Sertoli hücreleri ve spermatazoaları da içeren spermatogenetik seri hücrelerinin yer yer kayba uğradığı izlendi. İnterstisiyel alanda ödemin belirgin olduğu görüldü. Ortalama Johnson skoru 5,1 olarak belirlendi. Son

grup olan C vit + MTX grubunda ise testis dokusunda, seminifer tübüllerin büyük oranda korunduğu görüldü. Spermatogenetik seriye ait hücreler, spermatazoalarıda içerecek Şekilde izlenmekteydi. İnterstisiyel alanda kan damarları ve az sayıda Leydig hücresi varlığı dikkati çekti. Grubun ortalama Johnson skoru 7,2 olarak tespit edildi.

Bu sonuçlara dayanarak diyebiliriz ki; Kemoterapik ilaçlar, birçok dokuda olduğu gibi testis dokusunda da hasar meydana getirmektedir. Metotreksat, testiste bu hasarlara neden olan kemoterapiklerden biridir. Metotreksat testis dokusunda oksidatif stres oluşturarak bu hasarı meydana getirmektedir. Bu çalışmada günlük alınması dahilinde, bađıŐıklıđı arttırdığı bilinen kuvvetli bir antioksidan olarak C vitamini kullanılmış ve MTX kaynaklı testis hasarını önlemede etkili olduğu histolojik yönden mikroskobik yöntemlerle gösterilmiştir.

7. ÖZET

Kanser çağımızın önde gelen sağlık sorunlarından birisidir. Günümüzde kanserin doğası anlaşılmiş ve tedavide de bir o kadar ilerlemeler sağlanmaktadır. Bir folik asit antimetaboliti olan metotreksat, hücre siklusunun 's' dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar. Hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeniyle kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan bir kemoterapiktir. Yapılan çalışmalar metotreksat' ın hücreler üzerine etkisi, hücrelerin antioksidan etkinliğini azaltarak reaktif oksijen türlerinin etkilerine açık hale gelmelerini ve böylece testis dokusu ve germ hücrelerinde hasara neden olduğunu göstermektedir. Bu hasarın hangi yolla gerçekleştiği tam olarak bilinmemesine karşılık birçok çalışmada bu dokuda oksidatif stres meydana geldiği gösterilmiş, nedeni reaktif oksijen partiküllerinin yeterince ortadan kaldırılamamasına bağlanmıştır. Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmada metotreksat uygulanarak sıçanlarda oksidatif strese bağlı oluşan testiküler hasarı ve bu hasarın etkilerini azaltan C vitamini uygulanarak olumlu etkileri histolojik olarak araştırılmıştır. Çalışmamızda deneysel olarak MTX grubu sıçanlara, MTX hasarını görebilmek adına iki hafta süresince haftada bir gün tek doz 10mg/kg/gün MTX i.p olarak uygulanmış ve seminifer tübüllerde atrofik değişiklikler belirgin olarak izlenmiştir. Seminifer tübüllerde sitoplazmik vakualizasyon ve artmış apoptoz izlendi. Bununla birlikte C vitamininin etkilerini daha net görebilmek adına MTX + Cvit grubuna önce MTX, iki hafta süresince haftada tek doz 10mg/kg/gün i.p uygulandıktan sonra 10 gün süresince hergün 100mg/kg/gün C vitamini i.p uygulandı. Diğer bir gruba ise önce C vitamini 10 gün süresince her gün 100mg/kg/gün C vit i.p uygulandıktan sonra iki hafta süresince haftada bir gün tek doz 10mg/kg MTX i.p uygulanmıştır. Kontrol grubuna deney sonuna kadar her gün 2mg/kg/gün serum fizyolojik i.p uygulandı. Kontrol grubunun seminifer tübüllerinde önemli bir değişikliğe rastlamazken, MTX grubu ve MTX + C vit gruplarında seminifer tübüllerin çoğunda hücrelerin bazal membrandan ayrılıp lümene döküldüğü izlendi. Sertoli hücreleri ve spermatazoaları da içeren spermatogenetik seri hücrelerin yer yer kayba uğradığı dikkat çekiciydi. C vit + MTX grubu kontrol grubuyla daha çok benzerlikler göstermiştir. Bu grupta seminifer tübüllerin büyük oranda korunduğu spermatogenetik seriye ait hücreler, spermatazoaları da içerecek şekilde izlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: MTX, Testis, C vitamini.

8. SUMMARY

Cancer is the one leading health problems of our century. Nowadays, the nature of the cancer was figured out and there has been some improvements on the treatment of this disease. Methotrexate(MTX), which is a folic acid metabolite has a cytotoxic effect on the "s" phase of the cell cycles. It is a chemotherapeutic that is being used for a long time for cancer treatment since it inhibits cell division. The studies showed that MTX decrease the antioxidant level and be open to the effects of the reactive oxygen types and therefore harms the testis tissue and germ cells. Even though how this damage occurred is still a grey area, many studies showed oxidative stress occurred in those tissues, and the reason for this is tied to not completely being able to remove the reactive oxygen particles. For this reason, the rats which were given MTX were applied vitamin C that decrease the testicular damage caused by oxidative stress and the positive effects were searched histologically. For experimental reasons, the MTX group rats were given once a week single dose of 10mg/kg/day MTX i.p for two weeks, and the obvious atrophic changes in the seminiferous tubules, cytoplasmic vacuolization and increased apoptosis were observed. Besides this, in order to see the effects of the vitamin C better, the MTX + C vit group was first applied single dose of 10mg/kg/day MTX i.p once a week for two weeks time frame, and then 100mg/kg/day vitamin C i.p was applied to them for 10 days. During the experiment, the control group was given 100mg/kg/day saline solution i.p every day. Where a change was not observed on the seminiferous tubules of the control group, it was observed that on most of the seminiferous tubules the cells were separated from the basement membrane and flow into the lumen on the MTX + C vit groups. It was pointed out that the spermatogenic series cells which includes sertoli cells and spermatozoa was of a lost. The C vit + MTX group showed more similarity with the control group, in this group the spermatogenic cells in which the seminiferous tubule were mostly protected, were observed including the spermatozoa.

Keywords: MTX, Testes, C vit.

9. KAYNAKLAR

Afshari A, Brok J, Møller AM, Wetterslev J. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in adults and children: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Anesth Analg*. 2011 Jun;112(6):1411-21.

Ahmed E.A, Omar H.M, Elghaffar SKA, Ragb S.M.M, Nasser A.Y. The Antioxidant Activity of Vitamin C, DPPD and L-cystein against Cisplatin –Induced Testicular Oxidative Damage in Rats. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49:1115-1121.

Aitken R.J, Roman S.D. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes. *Oxi Med Cell Langev*. 2008. Oct-Dec;1(1):15-24.

Akdemir N, Birol L. İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı. Ankara: Sistem Ofset; 2004: p. 243-306.

Akkus I, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 1995, 38, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye.

Akyol H. Kemoterapinin temel ilkeleri. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser kongresi, Hemşire Programı: 2004 Mayıs 18-22; İzmir.

Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutasyonun Rolü. Ph.D, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Ankara. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*: 2002;22(4):442-8.

AL-Asadi FS. Effect Of Vitamin C On Apoptotic Germ Cells Of Cryptorchid Testis In Rabbits. *Bas.j.Vet.Res*,Vol.10,No.1,2011.

Al-Attar L, Noël K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest*. 1997 Sep 15;100(6):1335-43.

Alexander NJ. Male evaluation and semen analysis. *Clin Obstet Gynecol*. 1982 Sep;25(3):463-82.

Amann RP, Johnson L,Pickett BW. Connection between the seminiferous tubules and efferent ducts in the stallion. *Am. J. Vet. Res*. 1977; 38:1571-1579.

Aslan Ö, Vural H, Kömürçü Ş, Özet A. Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi, C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi. 2006; 10(1): 15-28.

Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, Asl NA, Roshangar L, Khodadadi A. Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2011; 15: 1003-1009.

Aşçı H. Metotreksat Kaynaklı Karaciğer Ve Böbrek Hasarında Misoprostolün Koruyucu Etkisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi,Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2010 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet Kaya Özer).

Arcıncı K, Elhan A. *Anatomi*. Cilt 1-2. Ankara , Güneş Matbaacılık, 1999.

Atal S. Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir, 2014. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Varol Şahintürk)

Aydın S. İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Anadolu Üniversitesi, 5. Baskı, 2000.

Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH, ve ark. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development*. 1994 Jan;120(1):189-97.

Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis*. 1994 Jul;24(1):112-29.

Bannister J, Bannister W, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*. 1987;22:111–80.

Bannister LH, Dyson M. Reproductive system. *Gray's Anatomy*, 1995, 38th Edition. Ed. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH, London: Churchill Livingstone, 1995: 343–73.

Barack BM. Transport of spermatozoa from seminiferous tubules to the epididymis in the mouse. A histological and quantitative study. *J. Reprod. Fert*. 1968; 16: 35-48.

Bassenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1994 Aug;8(4):601-10.

Başpınar N, Kurtoğlu F. Vitaminler, S.Ü. Veteriner Fak. Yayın Ünitesi, 2003, Konya.

Bates CJ. The function and metabolism of vitamin C in man. In *Vitamin C (Ascorbic Acid)*. ED:Counsell JN and Hornig DH, Applied Science, 1981, 1st Edition, London, 1-22.

Battista N, Meccariello R, Cobellis G, Fasanod S, Tommasoa DM, Pirazzia V, Konjef JC, Pierantonid R, Maccarronea M. The role of endocannabinoids in gonadal function and fertility along the evolutionary axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; vol. 355, no.1, pp. 1–14.

Belur LR, James RI, May C, Diers MD, Swanson D, Gunther R, McIvor RS. Methotrexate preconditioning allows sufficient engraftment to confer drug resistance in mice transplanted with marrow expressing drug-resistant dihydrofolate reductase activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2015: 314; 668–674.

Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol*. 1998 Aug;9(4):393-400.

Berk M, Ng F, Dean O, Dodd S, Bush AI. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008: Vol.29 No.7.

Berman DM, Rodriguez R, Veltri RW. Development, Molecular Biology, and Physiology of the Prostate. *Campbell-Walsh Urology*. Ed: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. 2012, 10th ed. Philadelphia. Elsevier Saunders. 2533-2569.

Bleyer WA. Current status of intrathecal chemotherapy for human meningeal neoplasms. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1977; 46: 171-178.

Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer.* 1978; 41: 36-51.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003 Jan;91 Spec No:179-94.

Boyar RM, Rosenfeld RS, Kapen S, Finkelstein JW, Roffwarg HP, Weitzman ED, Hellman L. Human puberty. Simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *J Clin Invest.* 1974;54:609–618.

Braat AK, Speksnijder JE, Zivkovic D. Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol.* 1999;43(7 Spec No):745-60.

Brachet J, Mirsky AE. *The cell: Meiosis and mitosis.* Academic Press. 1961. Volume 3. Orlando, FL.

Brigelius-Flohe R, Traber M. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J.* 1999;13:1145–55.

Brugnoletti F, Morris EB, Laningham FH, Patay Z, Pauley JL, Pui CH, Jeha S, Inaba H. Recurrent intrathecal methotrexate induced neurotoxicity in an adolescent with acute lymphoblastic leukemia: Serial clinical and radiologic findings. *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Feb;52(2):293-5. doi: 10.1002/pbc.21764.

Budras KD, Sauer T. Morphology of the epididymis of the cock (*Gallus domesticus*) and its effect upon the steroid sex hormone synthesis. I. Ontogenesis, morphology and distribution of the epididymis. *Anat. Embryol.* 1975; 148:175-196.

Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science.* 1992 Jul 17;257(5068):401-3.

Bustos-Obregon E, Holstein AF. The rete testis in man: Ultrastructural aspects. *Cell Tiss. Res.* 1976; 175: 1-15.

Campbell AN, Reece BJ. *Biyoloji.* Palme Yayıncılık, 2006, 6. Baskı, Ankara.

Can G. Antineoplastik İlaçların Yan Etkileri ve Hemşirelik Yaklaşımları. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi.* 2005; 2 (2): 8-15.

Can G. *Kanser Kemoterapi ve Uygulama Rehberi.* Ed: Durna Z, Aydın A. Nobel Tıp Kitabevleri. 2003, İstanbul.: p: 6-8.

Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, et al. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 2008;283:16169–77.

Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jul;20(7):1716-23.

Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Human Reproduction Update.* 2007; vol. 13, no. 3, pp. 313–327.

Carreras A, Mendoza C. Zmc levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia.* 1990; 22(3): 279-83.

Cavicchia JC, Burgos MH. Tridimensional reconstruction and histology of the intratesticular seminal pathway in the hamster. *Anat. Rec.* 1977; 187: 1-10.

Cheeseman KH1, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3):481-93.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:192–208.

Cheng CY, Mruk DD. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philosophical Transaction of The Royal Society. B* (2010); 365, 1459–1463.

Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem.* 2008;15(12):1236-48.

Chu E, DeVita VT. *Cancer Principles & Practice of Oncology.* 2001.Ed: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. 6th Edition. page 289.

Cole PD, Zebala JA, Alcaraz MJ, Smith AK, Tan J, Kamen BA. Pharmacodynamic properties of methotrexate and Aminotrexate during weekly therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Jun;57(6):826-34. Epub 2005 Sep 17.

Comhaire F, Vermeulen L, Ghedira K, Mas J, Irvine A, Callipolitra G. Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertil Steril* 1983; 40: 500-4.

Cooper ERA, Jackson H. The vasa efferentia in the rat and mouse. *J. Reprod. Fertil.* 1972; 28:317-319.

Cooper TG, Weidner W, Nieschalg. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal fructose and citric acid. *Int J Androl.* 1990; 13: 336-339.

Coward K, Wells D. *Textbook of Clinical Embryology.* Cambridge University Press, 2013, United Kingdom.

Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin N Amer.* 1997; 23: 739-55.

Cunningham, Daniel John Cunningham's Text-book of anatomy. Ed. Arthur Robinson, William Wood And Company, New York, 1918.

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1997; 3-4: 92-95

Darby K, Granner MD. The Diversity of the Endocrine System. Harper's Illustrated Biochemistry. Ed: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Wei PA. 2009, 28th ed. 855-890.

Dawson E, Evans D, Harris W, Teter M, Mcganity W. The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers. J Am Coll Nutr. 1999; 18 (2): 166-70.

Deaton CM, Marlina DJ. Exercise-associated oxidative stress. Clinical Techniques in Equine Practice Volume 2, Issue 3, September 2003, Pages 278–291.

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

Del Pozo J, Martínez W, García-Silva J, Almagro M, Peña-Penabad C, Fonseca E. Cutaneous ulceration as a sign of methotrexate toxicity. Eur J Dermatol. 2001 Sep-Oct;11(5):450-2.

di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. Mol Endocrinol. 1994 Aug;8(8):1006-20.

Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem Pharmacol. 2002 Sep;64(5-6):1019-26.

Dinçol K. Kemoterapide Temel Prensipler. Ed: Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN. Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 2000:34-47.

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. Lancet. 1991 Dec 21-28;338(8782-8783):1546-50.

Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. Annu Rev Physiol. 1998;60:461–496.

Duyff R. American Dietetic Association: Complete Food and Nutrition Guide. John Wiley and Sons Inc., 2002, 2nd Edition. Hoboken, NJ.

Dündar Y, Aslan R. Oksidan–antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. / The rol of vitamins in oxidant and antioxidant balance. Hayvancılık Araştırma Dergisi 9(1-2):32-39,1999.

Dym M. The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti. Am. J. Anat. 1974; 140:1-26.

Ebadi M. Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. Arizona: Prominent Press; 2001.

Eisner T, Aneshansley DJ. Spray aiming in the bombardier beetle: Photographic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9705–9.

Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O, Ronquist G. Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 58: 191-8.

Fantel AG. Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology*. 1996 Mar;53(3):196-217.

Fawcett DW, Dym M. A glycogen-rich segment of the tubuli recti and proximal portion of the rete testis in the guinea pig. *J. Reprod. Fert.* 1974; 38: 401-409.

Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. Chapman&Hall Companies, 1994, 12th Edition. New York.

Fomenko DE, Koc A, Agisheva N, Jacobsen M, Kaya A, Malinouski M, Rutherford JC, Siu KL, Jin DY, Winge DR, Gladyshev VN. Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):2729-34. doi: 10.1073/pnas.1010721108. Epub 2011 Jan 31.

Forsburg SL, Nurse P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1991;7:227-256.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 1982 Nov;47(5):412-26.

Freeman ER, Bloom DA, McGuire EJ. A brief history of testosterone. *J Urol*. 2001;165(2): 371-373.

Frie B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;37:569–71.

Gaetani G, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*.1996;87:1595–9.

Türk. G. Kemoterapötiklerin Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Yan Etkileri ve Koruyucu Stratejiler. *Marmara Pharmaceutical journal* 2013;17:73-92.

Gaies E, Jebabli N, Trabelsi S, Salouage I, Charfi R, Lakhel M, Klouz A. Methotrexate Side Effects: Review. *J Drug Metab Toxicol*. 2012, 3:4.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989 May;83(5):1774-7.

Gartner PL, Hiatt JL. Color Text Book of Histology. WB Saunders Companies, 2006, 3rd Edition, Philadelphia.

Gill-Sharma MK, Choudhuri J, Souza SD. Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein and Peptide Letters*. 2011; vol. 18, no. 8, pp. 786–801.

Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 1998 Aug;39(8):1529-42.

Giuli G, Shen WH, Ingraham HA. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development*. 1997 May;124(9):1799-807.

Gonzales GF, Garca Hjarles M, Velsquez G, Coyotupa J. Seminal prolactin and its relationship to sperm motility in men. *Fertil Steril* 1989; 51: 498-503.

Gottlieb C, Svanborg K, Eneroth P, Bygdeman M. Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphatase content. *Fertil Steril* 1988; 49: 322-327.

Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Lea & Febiger Companies, 2000, Philadelphia.

Gray, Henry. XI. Splanchnology. 3c. The Male Genital. *Anatomy of the Human Body*. 20th Edition. Philadelphia, New York: Lea & Febiger, 1918; Bartleby 2000; 2000.

Habert R, Veniard B, Brignaschi P, Gangnerau MN, Picon R. Absence of development of late steroidogenic lesions in rat testis during the end of fetal life. *Arch Androl*. 1989; 22, 41-48.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Inc., 1999. 3rd Edition, New York, 936s.

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.

Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs*. 1991 Oct;42(4):569-605.

Halliwell B. How to characterize an antioxidant- An update. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:73–101.

Hammond GL. Endogenous steroid levels in the human prostate from birth to old age: a comparison of normal and diseased tissues. *J Endocrinol*. 1978;78(1): 7-19.

Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA. Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science*. 1994 Dec 2;266(5190):1494-500.

Harila-Saari AH, Vainionpää LK, Kovala TT, Tolonen EU, Lanning BM. Nerve lesions after therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1998; 82: 200-207.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266:1821-28.

Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Ushida K, Nikaido O, Osawa T. 8 Hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol.* 1997;89:10405–9.

Herfindal ET, Gourley DR, Hart LL. *Clinical Pharmacy And Therapeutics*, Lippincott Williams – Wilkins. 1992, 5th Edition. Maryland.

Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB. *Antioxidant Defenses and Animal Adaptation to Oxygen Availability During Environmental Stress. Cell and Molecular Responses to Stress.* Elsevier Press, 2001. Ed: Storey KB, Storey JM, Amsterdam, pp. 263-287.

Herrera E, Barbas C. Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.* 2001;57:43–56.

Hess RA, Bassily N. Structure of the ductuli efferentes in the dog. *J. Vet. Med. C.* 1988; 17:85.

Hill M.A. *Embryology Seminiferous-tubule.* 2015.

Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;991:214-28.

Huggins C , Scott WW , Heinen JH. Chemical Composition Of Human Semen And Of The Secretions Of The Prostate And Seminal Vesicles. *American Journal of Physiology.* 1May 1942; Vol. 136 no. 467-473.

Ilio Ky, Hess Ra. Structure and Function of the Ductuli Efferentes: A Review. *Microscopy Research And Technique* 1994;29:432-467.

Isacoff WH, Townsend CM, Eiber FR, Forster T, Morton DL, Block JB. High dose methotrexate therapy of solid tumors: observations relating to clinical toxicity. *Med Pediatr Oncol.* 1976;2(3):319-25.

Işık A, Işılçay L, Atabekli Erdemli E, Akbay C, Anafarta K. Sıçan Testisinde Metotreksattın Işık Ve Elektron Mikroskop Düzeyinde Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 50, Sayı 3, 1997, 125-129.*

Jacob RA. Vitamin C. Ed: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, *Modern Nutrition in Health and Diseases*, Lippincott Williams and Wilkins, 1999, 9th Edition. Baltimore,.

Jacobs SA, Stoller RG, Chabner BA, Johns DG. 7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *J Clin Invest.* 1976: 57: 534-538.

Jahuson, FE, Doubek, WG, Tolman, KC, Janney, CG. Testicular cytotoxicity of intravenous procarbazine in rats. *Surg Oncol.* 1993; 2: 77-81.

Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development.* 2003 Aug;130(16):3663-70.

Jensen CE, Wiswedel K, McLoughlin J, van der Spuy Z. Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertil Steril*. 1995; 64(6): 1189-1197.

Jequier AM, Crich JP. Semen analysis. A practical guide. Blackwell Scientific Publications. 1986, Oxford.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*. 2005;26:340–52.

Johnson FE, Farr SA, Mawad M, Woo YC. Testicular cytotoxicity of intravenous methotrexate in rats. *J Surg Oncol*. 1994 Mar;55(3):175-8.

Jordan RL, Wilson JG, Schumacher HJ. Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. *Teratology*. 1977 Feb;15(1):73-9.

Johnson SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes. Normal values and results of 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1(1):2-25).

Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L ve ark. Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog Horm Res*. 1993;48:1-59.

Josso N, Picard JY, Tran D. The anti-Müllerian hormone. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1977;13(2):59-84.

Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, 2006, 10. Baskı, İstanbul.

Kappus H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chem Phys Lipids*. 1987 Nov-Dec;45(2-4):105-15.

Karataş S. Sıçanlarda Kadmiyum Klorürün (CdCl₂) Testis Dokusuna etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 1998.

Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 2007 Feb;115(2):81-103.

Kayaalp OS, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 1. Cilt, Pelikan Yayıncılık, 12. Baskı, 2009.

Kayalı H, Satiroğlu G, Taşyürekli G, İnsan Embriyolojisi, 7. Baskı, İstanbul, Alfa Basın Yayın Dağıtım 1992.

Kayalı H. *Özel Histoloji*. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, 1989, İstanbul.

Keime-Guibert F, Napolitano M, Delattre JY. Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy. *J Neurol*. 1998; 245: 695-708.

Kızılcı S. Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler, C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi. 1999; 3(2): 18-26.

Kiely EA. Scientific basis of testicular descent and management implications for cryptorchidism. *Br J Clin Pract* 1994; 48: 37–41

Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Archives of Histology and Cytology*. 2004; vol. 67, no. 4, pp. 271–284.

Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol*. 1999 Sep-Oct;13(5):391-7.

Kim YJ, Song M, Ryu JC. Mechanisms underlying methotrexate-induced pulmonary toxicity. *Expert Opin Drug Saf*. 2009 Jul;8(4):451-8.

Kiserud CE, Fossa A, Bjoro T, Holte H, Cvancarova M, Fossa SD. Gonadal function in male patients after treatment for malignant lymphomas, with emphasis on chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009; 100(3): 455-463.

Koshland D. Mitosis: Back to the basics. *Cell*. 1994;77: 951-54.

Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992;200:248–54.

Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 1997;15:201–204.

Kuran O. *Sistematik Anatomi. Filiz Kitabevi, 1983, İstanbul.*

Lankelma J, van der Klein E, Ramaekers F. The role of 7-hydroxymethotrexate during methotrexate anti-cancer therapy. *Cancer Lett*. 1980; 9: 133-142.

Lawrenz-Wolf B, Wolfrom C, Frickel C, Fengler R, Wehinger H, Henze G. Severe renal impairment of methotrexate elimination after high dose therapy. *Klin Padiatr*. 1994; 206: 319-326.

Lee HJ, Hong SK, Seo JK, Lee D, Sung HS. A Case of Cutaneous Side Effect of Methotrexate Mimicking Behçet's Disease. *Ann Dermatol*. 2011 Aug; 23(3): 412–414.

Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev*. 1993 Apr;14(2):152-64.

Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. *Text / Atlas of Histology*. W.B. Saunders Co., 1988, Philadelphia.

Lennox B, Ahmad KN. Total Length of Tubules in Human Testis. *Journal of Anatomy*. 1970; 107: 191.

Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations and gonadal dysfunction. *Arch Med Res*. 1999; 30(6): 486-494.

Levine M, Dhariwal KR, Washko P, Welch R, Wang YH, Cantilena CC, Yu R. Ascorbic acid and reaction kinetics in situ: a new approach to vitamin requirements. *J Nutr Sci Vitaminol* 1992; 169–172. (Tokyo).

Levine M, Ramsey SC, Daruwara R. Criteria and recommendation for Vitamin C intake. *JAMA*. 1991;281:1415–23.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126.

Lovell MA, Ehmann WD, Buffer BM, Markesberry WR. Elevated thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzemers disease. *Neurology*. 1995;45:1594–601.

Lovell-Badge R, Hacker A. The molecular genetics of Sry and its role in mammalian sex determination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1995 Nov 29;350(1333):205-14.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994 Feb 1;120(3):227-37.

Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol Neurodegener*. 2009 Jun 5;4:24. doi: 10.1186/1750-1326-4-24.

Marsh LD, Alexander NJ. Vasectomy. Effects on the efferent ducts in Mucucu mulattu. *Am. J. Pathol*. 1982; 107:310-315.

Martin-Padilla M. The mesonephric-testicular connection in man and some mammals. *Anat. Rec*. 1964; 248: 1-14.

MEB(Milli Eğitim Bakanlığı). Üreme Sistemi radyolojik anatomisi. Ankara; 2011.

Meister A, Anderson A. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711–60.

Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, eds. *Williams textbook of endocrinology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.

Menche N. *Biologie Anatomie Physiologie Urban & Fischer*. 2012, Zugang, München: Elsevier GmbH. 2012.

Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*. 1993 Jan-Feb;9(1):89-93.

Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. 2010;Reproduction, vol. 139, no. 2, pp.287–301.

Moore K, Daley A II. Inguinal Region. *Clinically Oriented Anatomy*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 214-230.

Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human (Clinically Oriented Embryology)*, 5th edn. Philadelphia: WB Saunders& Co., 1993: 265–301.

Moore KL. Persaud, TVN. İnsan Gelişiminin Başlangıcı. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. Ed. Dalçık H., Yıldırım M. Nobel Tıp Kitabevi, 2009, İstanbul.

Morgan, Shelly. (2010). Vitamin C and the common cold. Retrieved January 13, 2013 from <http://www.livestrong.com/article/301309-vitamin-c-the-common-cold/>

Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, Silverman AK. Methotrexate and reproduction in men: case report and recommendations. *J Am Acad Dermatol*. 1993 Nov;29(5 Pt 2):913-6.

Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D, Schwartz JP. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci*. 1993 Aug;16(8):323-8.

Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Radwell VW. Harper'in Biyokimyası. Baris Kitabevi. 1993. Ed: Menten G, Ersöz B

Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord*. 2002 Sep;8(6):385-7.

Netto LE, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol*. 2002;348:260-70.

Ng C, Xiao YD, Lum BL, Han YH. Quantitative structure–activity relationships of methotrexate and methotrexate analogues transported by the rat multispecific resistance-associated protein 2 (rMrp2). *Eur. J. Pharm. Sci*. 2005; 26; 405–413.

Niki E. Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From basic science to medicine*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1993. pp. 365–73.

Niki E. Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol, Third Conference on Vitamin C, 498, 187-198,1987.

Nogueira JC, Godinho HP, Cardoso FM. Microscopic anatomy of the scrotum, testis with its excurrent duct system and spermatic cord of *Dipelphis azarae*. *Anat. Rec*. 1977; 99: 209-219.

Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem*. 1992; 61: 441-470.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001 Dec 1;31(11):1287-312.

Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia*. 2009; vol. 41, no. 2, pp. 105–110.

ODAR İV. *Anatomi Ders Kitabı*, 9. Baskı cilt 1, 2 Ankara, 1975.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979, June; Volume 95, Issue 2, Pages 351–358.

Okamura N, Tajima Y, Ishikawa H, Yoshii S, Koiso K, Sugita Y. Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. *Fertil Steril* 1986; 45: 265-72.

Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuma H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 1985; 260: 9699-705.

Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci.* 1994 May;15(5):149-53.

Olsen EA. The pharmacology of methotrexate. *J Am Acad Dermatol.* 1991; 25: 306-318.

Orbea A, Fahimi HD, Cajaraville MP. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochem Cell Biol.* 2000 Nov;114(5):393-404.

Orsi PAM, Dias SM, Seullner G, Guazzelli, Filho J, Vicentini CA. Structure des canaux efférentes du porc domestique. *Anat. Anz.* 1983;163:249-254.

Ovayolu N, Parlar S, Karakaş S. Kemoterapi uygulamasının toksik ve yan etkilerine yönelik alınabilecek hemşirelik önlemleri, *Hemşirelik forumu.* 2003; 6(2): 36-41.

Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003;22:18–35.

Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid, *Mutation Research.* 2009; 673/s 43–52.

Pamir A. 2005. *Tıbbi Onkoloji Kitabı.* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 145.

Pardee AB. G1 events and the regulation of cell proliferation. *Science.* 1989; 246: 603-608.

Pauling L. Discussion of function, deficiency, disease prevention, disease treatment, food sources, new research and recommendations from the linus. [http:// www. Ipi. Oregonstate. edu/ infocenter/vitamins/Vitamin C.](http://www.Ipi.Oregonstate.edu/infocenter/vitamins/VitaminC) Erişim Tarihi: 17.10.2008.

Peel T, Alegre L, Congeni R, El-Zorkon MM, Fiorani M. *Vitamin C: New Research,* Nova Publishers, 2006 First Edition, New York.

Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril.* 1985; 44(3):396-400.

Porter NA, Richardson T, Finley JW. Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. Van Nostrand Reinhold Company, 1985, New York.

Prescott DM. *Reproduction of Eukaryotic Cells.* Academic Press. 1976, New York.

Psychrembel W. *Klinisches Wörterbuch.* De Gruyter. 2014, Berlin.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987 Nov 7;2(8567):1057-8.

Ranjbar AM, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 2004 Jun;10(6):RA141-7. Epub 2004 Jun 1.

Reid BL, Cleland KW. The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.* 1957; 5:223-246.

Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997;29:363-72.

Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 1995 Apr;9(7):526-33.

Retenauer S, Chauveau D, Récher C. Surdsage au méthotrexate: complications, prise en charge et prevention High-dose methotrexate: toxicity, management and prevention. *Reanimation.* 2009; 18: 654-658.

Rey R, Picard JY. Embryology and endocrinology of genital development. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism.* Volume 12, Issue 1, April 1998, Pages 17-33

Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med.* 1993;15:77-96.

Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: Structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction.* E. Knobil, and J. Neill, eds. Raven Press, 1988, NY, pp 999-1080.

Robert M, Gagnon C. Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: presence of a precursor molecule in seminal vesicle fluid and its molecular processing after ejaculation. *Int J Androl.* 1994 Oct;17(5):232-40.

Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareflo EJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease. *Environmental Health Perspectives.* 1998: Vol 106, Supplement 5.

Roosen-Runge EC. The rete testis in the albino rat. Its structure, development and morphological significance. *Acta Anat.* 1961; 45: 1-30.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology.* Lippincott Williams & Wilkins, 2003, 4th Edition.

Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas.* Saunders Companies, 2006, 5th ed. Philadelphia.

Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. *Urol Clin N Am* 1995; 22: 107-18.

Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi,* Ankara,2011;31(2):137-150.

Sadırlı KS. Kanserli Hastalarda Semptom Kontrolünün Değerlendirilmesi. Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemsirelik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2008 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNSAR).

Sadler TW. Langman's Medical Embriology. Eight Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2000. Ankara

Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Ed: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, 1996, 7. Baskı. Ankara.

Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. ODTÜ Yayıncılık, 2008, 4. Baskı. Ankara.

Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha CB, Srivastava AK. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. Arch Androl. 2004 Jan-Feb;50(1):33-5.

Saxena AK, Singh C. Effect of cyclophosphamide on the seminiferous tubules and leydig cells in rat. Anat Soc. 1990; 32: 101-107.

Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. Ann Intern Med. 1980 Jul;93(1):109-14.

Schmidt R, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Heidelberg: Springer. 2011.

Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. Endocr Rev. 2009;30:883-925.

Senler FÇ. Neoadjuvan Tedavi, Solunum. 2001; 3(2): 212-214.

Shacter E. Protein oxidative damage. Methods Enzymol. 2000;319:428-36.

Shalet SM. Normal Testicular Function and Spermatogenesis. Pediatr Blood Cancer. 2009;53:285-288.

Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Kerr JB, Saunders PT, McKinnell C. Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgenregulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. Journal of Andrology, 1992, 13: 172-184.

Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. Cell. 1994 Jun 3;77(5):651-61.

Shi HL, Noguchi N, Niki N. Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol and α -tocopherol, against lipid peroxidation. Free Radic Biol Med. 1999;27:334-46.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot. 2002;53:1305-19.

Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod.* 2001 Aug;65(2):514-21.

Shuper A, Stark B, Kornreich L, Cohen IJ, Avrahami G, Yaniv I. Methotrexate-related neurotoxicity in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Isr Med Assoc J.* 2002 Nov;4(11):1050-3.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med.* 1990 May;43(5):334-44.

Singer R, Sagin M, Levinsky H, Allalouf D. Andrological parameters in man with high sperm counts and possible correlation with age. *Arch Androl.* 1990; 24:107-111.

Sitzia J, Huggins L. Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. *Cancer Pract.* 1998 Jan-Feb;6(1):13-21.

Smeland E, Fuskevåg OM, Nymann K, Svendsen JS, Olsen R, Lindal S, Bremnes RM, Aarbakke J. High-dose 7-hydromethotrexate: acute toxicity and lethality in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;37(5):415-22.

Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm.* 2001;61:241-66.

Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1768(8):1976-90. Epub 2007 Feb 9.

Snell RS. Structures of the Anterior Abdominal Wall: Scrotum, Testis, and Epididymides. *Clinical Anatomy for Medical Students.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. 153-157.

Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988 Apr;63(4):381-9.

Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology.* 1992 Dec;103(6):1928-49.

Sternberg SS. *Histology for pathologist.* Raven Press Lt, 1992: 731-9, New York.

Sussman A, Leonard JM. Psoriasis, methotrexate and oligospermia. *Arch Dermatol.* 1980; 116: 215-217.

Swanson CP, Merz T, Young WJ. Cytogenetics, the chromosome in division, inheritance, and evolution. Prentice-Hall, 1981, 2nd Edition. Englewood, Cliffs, NJ.

Swartz, MH. Male Genitalia and Hernias. *Textbook of Physical Diagnosis: History and Examination.* 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. 520-526.

Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Aug;6(8):662-80.

Şeftalioğlu A. Genel ve Özel insan Embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti;1998.

Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Robboy SJ. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol.* 1984 Dec;106(2):394-8.

Talo, A. In-vitro spontaneous electrical activity of rat efferent ductules. *J. Reprod. Fert.*, 1981;63:17-20.

Tapanainen JS, Vaskivuo T, Aittomaki K, Huhtaniemi IT. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;145:129–135.

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

Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995 Jan;35(1-2):21-39.

Thornalley PJ, Vasák M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Jan 21;827(1):36-44.

Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 2003 Jun;55(6):329-35.

Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS. *Testes. Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide.* 6th ed. McGraw-Hill Professional: 2004.

Tortora GJ, Derrickson BH. *Principles of Anatomy and Physiology*, 2012, 13th Edition, United States of America.

Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:4–15.

Türk G. Kemoterapötiklerin Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Yan Etkileri Ve Koruyucu Stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 17: 73-92, 2013.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):41-54.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006 Jun;64(2):178-89.

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

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

van Ede AE, Laan RF, De Abreu RA, Stegeman AB, van de Putte LB. Purine Enzymes In Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Metotrexate. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 1060-64.

Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Otlu A. Metotreksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorogenik Asidin Koruyucu Etkileri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010; 30(2):507-13.

Velsquez RA, Vilar RC, Hicks JJ. Similar effects of prolactin and dbcAMP upon spermatozoa metabolism. *Int J Androl* 1980; 3: 23-31.

Vierhapper H, Nowotny P, Waldhausl W. Production rates of testosterone in patients with Cushing's syndrome. *Metabolism.* 2000;49:229-231.

Vijayprasad S, Ghongane BB, Nayak BB. Effect of Vitamin C on Male Fertility in Rats Subjected to Forced Swimming Stress. *J Clin Diagn Res.* Jul 2014; 8(7): HC05-HC08.

Vincent VA, Tilders FJ, Van Dam AM. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. *Mediators Inflamm.* 1998; 7(4): 239-255.

Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002 Sep;54(3):375-429.

Vitale-Calpe R, Aoki A. Fine structure of the intratesticular excretory pathway in the guinea pig. *Z. Anat. EntwicklGesch.* 1969; 129: 135-153.

Weingarten BJ, Kelman GM, Middleton WD, Gross ML. Tubular ectasia within the mediastinum testis. *Journal of Ultrasound in Medicine.* 1992; 11(7):349-353.

Weiss HD, Walker MD, Wiernik PH. Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents (first of two parts). *N Engl J Med.* 1974; 291: 75-81.

Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 1982 Jul;47(1):5-18.

Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006; 11; 694-703.

Widemann BC, Balis FM, Murphy RF, Sorensen JM, Montello MJ, O'Brien M, Adamson PC. Carboxypeptidase-G2, thymidine, and leucovorin rescue in cancer patients with methotrexate-induced renal dysfunction. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 2125-2134.

Wilke WLW, Rowen DF, Fails AD. *Anatomy and Physiology of Farm Animals.* John Wiley and Sons, 2009. ISBN 0-8138-1394-8. Retrieved 2013-11-03.

Winston GW. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol C.* 1991;100(1-2):173-6.

Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal fold. *Carnegie Institute Wash Contrib Embryol.* 1948;209: 67-80.

Woo RA, Melure KG, Lee PW. DNA dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature.* 1998;394:700-4.

Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Djinovic Carugo K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:8569–74.

Yelamos O, Puig L. Systemic methotrexate for the treatment of psoriasis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2015: Early online, 1-11.

Yıldırım M. İnsan Anatomisi, Nobel Tıp Kitabevleri 7. Baskı , İstanbul, 2013.

Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats. *The Scientific World Journal* Volume 2013, Article ID 489659.

Zachariae H. Methotrexate side-effects. *Br J Dermatol.* 1990 Jun;122 Suppl 36:127-33.

Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:337–49.

10. ÖZGEÇMİŞ

Aysun Sayılmaz 1980 yılında Adana'da doğdu. İlköğrenimini Nalbant köyü ilköğretim okulu'nda, ortaöğrenimini 50. yıl Lisesi'nde, Lise eğitimini Kozan Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladı. 2000 yılında Devlet memurluğu sınavını kazanıp Adana SSK Bölge hastanesinde Hemşire olarak göreve başladı. Halen devam etmektedir. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümünü kazandı. 2008 yılında Selçuk Üniversitesinden Bölüm 2. si olarak mezun oldu. 2009 yılında yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2012 yılında Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

11. EKLER

EK A: Etik Kurul Onayı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi



Karar Sayısı: 2014 – 065


Karar Tarihi: 24.12.2014


Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'den Prof.Dr.Aydan CANBİLEN ve Aysun SAYILMAZ tarafından sunulan **"Methotreksat Toksisitesinin Sıçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere C Vitaminin Etkisinin Araştırılması"** başlıklı tez projesi 9 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

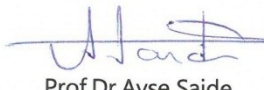
Projede 4 grupta toplam 31 adet sıçan (Wistar Albino) kullanılacağı ve sıçanların derin anesteziyle ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.


Prof.Dr.Selim KUTLU
Başkan

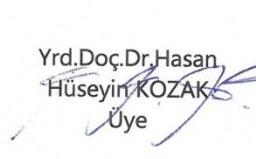

Prof.Dr.Lerna TAVLI
Üye


Prof.Dr.Ayşe Saide
ŞAHİN
Üye

Prof.Dr.Mehmet GÜL
Üye-Katılmadı


Doç.Dr.Ercan KURAR
Üye


Doç.Dr.Tevfik
KÜÇÜKKARTALLAR
Üye


Yrd.Doç.Dr.Hasan
Hüseyin KOZAK
Üye


Yrd.Doç.Dr.Ömer
TANYELİ
Üye

Dr.Ahmet UZUNAY
Üye-Katılmadı


Vet.Hek.Alpaslan ÖZKÜRÇÜLER
Üye


Mustafa ŞİRİN
Üye

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>