

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

**METOTREKSATIN NEDEN OLDUĞU TESTİS  
HASARINA KARŞI CURCUMİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Leyla KILINÇ**

Referans no: 10029701

EDİRNE – 2015

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

**METOTREKSATIN NEDEN OLDUĞU TESTİS  
HASARINA KARŞI CURCUMİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Leyla KILINÇ**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP-2013/126**

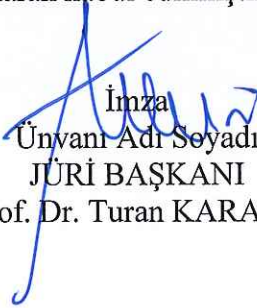
**Tez No :**


**EDİRNE – 2015**


**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

**O N A Y**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Leyla KILINÇ tarafından tez başlığı “Metotreksatın Neden Olduğu Testis Hasarına Karşı Curcuminin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **02/02/2015** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

  
İmza  
Ünvanı Adı Soyadı  
**JÜRİ BAŞKANI**  
Prof. Dr. Turan KARACA

  
İmza  
Ünvanı Adı Soyadı  
**ÜYE**  
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

  
İmza  
Ünvanı Adı Soyadı  
**ÜYE**  
Doç. Dr. Ali YILMAZ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÜR

Eğitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen aileme minnettirim. Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yetiŐtiren, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, tez çalıŐmamın her aşamasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen, danıŐman hocam sayın Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a, araŐtırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Turan KARACA, Doç. Dr. Gülnur KIZILAY-ÖZFİDAN, Doç. Dr. Yeter TOPÇU-TARLADAÇALIŐIR ve Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ-METİN'e yine tez çalıŐmam boyunca desteklerini gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkısı bulunan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
<b>TESTİSİN ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ</b> .....	<b>4</b>
<b>TESTİSİN GELİŞİMİ</b> .....	<b>7</b>
<b>TESTİSİN HİSTOFİZYOLOJİSİ</b> .....	<b>10</b>
<b>METOTREKSAT</b> .....	<b>11</b>
<b>CURCUMİN</b> .....	<b>14</b>
<b>MİTOJENLER TARAFINDAN AKTİVE EDİLEN PROTEİN KİNAZLAR</b> .....	<b>16</b>
<b>NÜKLEER FAKTÖR-KAPPA B</b> .....	<b>21</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>25</b>
<b>BULGULAR</b> .....	<b>31</b>
<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>50</b>
<b>SONUÇLAR</b> .....	<b>57</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>59</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>63</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>75</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>77</b>
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>CMN</b>	: Curcumin
<b>DHF</b>	: Dihidrofolat
<b>DHFR</b>	: Dihidrofolat redüktaz
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>ERK</b>	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
<b>H+E</b>	: Hematoksilen+Eozin
<b>IKK</b>	: İnhibitör kinaz kompleks
<b>ig.</b>	: İntragastrik
<b>ip.</b>	: İntraperitoneal
<b>JNK</b>	: Jun N-terminal kinaz
<b>MAPK</b>	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
<b>MAPKK</b>	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz kinaz
<b>MAPKKK</b>	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz
<b>MTX</b>	: Metotreksat
<b>NF-kB</b>	: Nükleer faktör-kappa B
<b>THF</b>	: Tetrahydrofolat
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör- $\alpha$

## GİRİŞ VE AMAÇ

Metotreksat (MTX) antimetabolitler grubunda olup, moleküler etki mekanizmasını dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimi aracılığı ile gerçekleştiren antikanser bir ilaçtır (1). Deoksiribo nükleik asit (DNA) öncülerinin sentezini inhibe ederek hücre döngüsünün S fazındaki hücreler üzerine etki eder. Akut lenfoblastik lösemi, lenfoma, osteosarkoma, meme, baş ve boyun bölgesi kanserlerine ek olarak psöriyazis ve romatoid artrit gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (2).

Metotreksat gibi antikanser ilaçlar, sadece kanser hücreleri üzerine öldürücü etki göstermekle kalmaz aynı zamanda yüksek çoğalma gücüne sahip kemik iliği, bağırsak mukozası, gonadlar gibi normal dokuları da etkiler (3,4) ve oogenez/spermatogenez hatalarına neden olarak fertilizasyonu azaltır (5,6).

Kötü huylu tümörlerde en yaygın kullanıldığı alan olan akut lenfoblastik lösemilerin çocuklarda gözlenmesi başta olmak üzere, diğer tümörler ve yine psöriyazis, romatoid artrit gibi hastalık tanılarıyla tedavi edilen genç erkek bireylerde oluşacak gonad disfonksiyonlarının ileride doğuracağı infertilite, göz önüne alınması gereken önemli bir sorundur (3,7).

Sıçanlara uygulanan tek doz MTX, testislerde oksidatif stresin artmasına yol açar. Artmış olan bu oksidatif stres veya doğrudan toksik etkisi yoluyla testiküler toksisiteye sebep olarak (6), infertiliteye yol açabilir. Ayrıca MTX'e maruz kalan erkek bireylerde oligozoospermi ve hücresel-kromozomal değişiklikler de meydana gelir (5).

Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazlar (MAPK); hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü ile ilgili çeşitli sinyallerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (8). Özellikle p38 MAPK oksidatif stresi de içeren çeşitli hücrel stresler ile aktive olabilen ve sonuçta hücrede serbest oksijen radikallerinin artmasına yol açan bir kinazdır. Buna ek olarak, çoğunlukla inflamasyon ve apoptozis ile ilgilidir (8-10).

Akciğer bronşiyal hücre serisinde yapılan bir çalışmada MTX verilmesiyle doza bağlı olarak p38 MAPK bileşenleri ekspresyonu ve fosforilasyonunun arttığı, p38 MAPK inhibitörü olan SB203580'in verilmesiyle de bu ekspresyonunun ve fosforilasyonunun azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar p38 MAPK sinyal yolağının MTX ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir (11). Nazal polip doku kültürü ile yapılan bir çalışmada da MTX'in, p38 MAPK sinyal yolu üzerinden apoptozise neden olduğu rapor edilmiştir (12).

King ve ark. (13) tarafından 2012'de yapılan bir araştırmada MTX'in hem kemik iliği hem de dolaşımda pro-osteoklastogenik bir üretimle nükleer faktör-kappaB (NF-kB) aktivasyonunda artışa ve osteoklast farklılaşmasına neden olduğu ortaya konmuştur. Yine başka bir çalışmada, MTX'in MAPK/NF-kB sinyal yolu aktivasyonu aracılığıyla intestinal permeabilityi artırdığı gösterilmiştir (14). Ayrıca, MTX'in NF-kB'nin nükleer translokasyonunu önemli ölçüde artırdığı da bildirilmiştir (15). Benzer şekilde, MTX'in NF-kB aktivasyonunu arttırdığı, van't Land ve ark.'nın (16) yaptıkları bir çalışmada gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada curcuminin (CMN) NF-kB inhibisyonunu azalttığı da ortaya konmuştur.

Metotreksat'ın testis dokusunda neden olduğu hasarı önlemeye yönelik çeşitli antioksidan maddeler kullanılmıştır (5,6,17-19).

Curcumin, Zingiberaceae (*Zencefilgiller*) familyasına ait *Curcuma longa* bitkisinin yumrusundan elde edilen farmakolojik ve biyolojik aktiviteleri çok geniş bir yelpaze içeren sarı-oranj renkli lezzetli bir baharattır (20,21). CMN'nin antioksidan (22,23) ve bunun yanında antiinflamatuvar (24) aktivitesi çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Bundan başka, CMN'nin, analjezik, antiseptik ve antikanserojen özellikleri bilinmekte ve yüzyıllardır kullanılmaktadır (21).

Yapılan çalışmalar sıçan enterit modelinde CMN'nin, p38 MAPK sinyal yolunun inaktivasyonuna ve NF-kB aracılı transkripsiyonun inhibisyonuna neden olarak bağırsak mukoza hasarını iyileştirdiği gösterilmiştir (25,26). Buna ek olarak, deneysel kolit modelinde



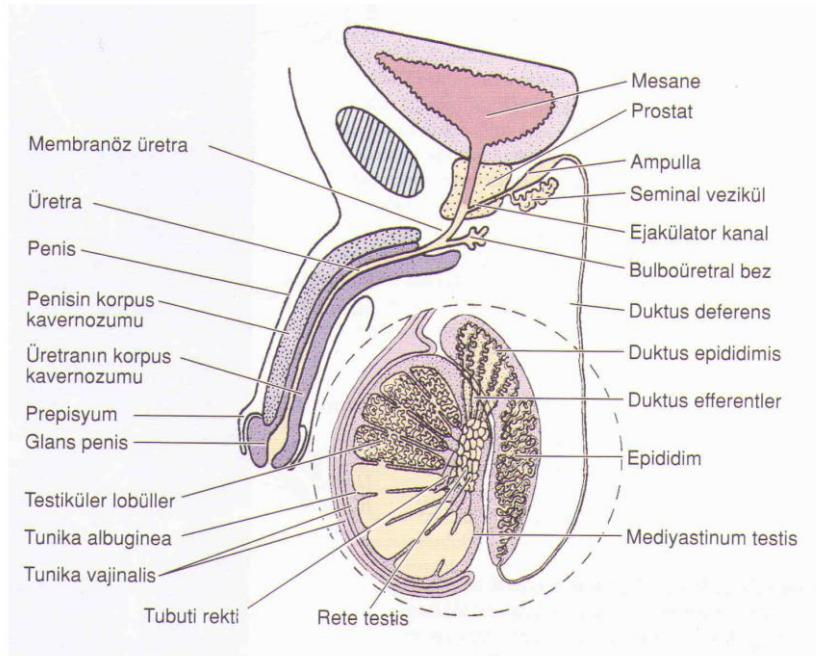
CMN'nin NF-kB aktivitesini inhibe ederek ve p38 MAPK aktivitesini azaltarak hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir (25). Yine başka bir çalışmada CMN, cisplatinin oksidatif hasar ve MAPK/NF-kB aktivasyonu aracılığıyla neden olduğu testis hasarını azaltmıştır (23).

Sonuç olarak, yapılan literatür araştırmalarında, MTX'in neden olduğu testis hasarı zerine CMN'nin etkisi ile ilgili yapılan immünohistokimyasal düzeyde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, MTX'in neden olduğu testis hasarı zerine CMN'nin etkisinin incelendiği bu çalışmada, histolojik ve immünohistokimyasal düzeyde araştırma yapılarak bu hasarın azaltılmasına yönelik katkı sağlanması amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

### TESTİSİN ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Erkek genital sistem, bir çift testis, genital boşaltım yolları ve bu yollara açılan yardımcı bezler, penis ve scrotumdan meydana gelir (Şekil 1).



Şekil 1. Erkek genital sistem (27)

Testisler, erkek üreme hücrelerinin yapıldığı, elips şeklinde, scrotum içinde oblik bir pozisyonda yerleşmiş ve funiculus spermaticus ile scrotum içinde asılı bulunan bir çift

organdır. Üst ve alt olmak üzere iki ucu (extramitas superior, extramitas inferior) vardır. Üst ucu anterolaterale, alt ucu ise posteromediale bakar. Ayrıca facies medialis ve facies lateralis adı verilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen iki kenarı vardır (28). Testisler, sahip oldukları sitogenik ve endokrin fonksiyonlarıyla erkek üreme hücrelerini (spermatozoon) ve testosteron ile inhibin hormonlarını üretirler (29). Bu özellikleriyle testisler, üreme ve hormon salgılama gibi iki önemli fonksiyona sahiptir (30).

Sol testis, scrotumda sağ testise göre yaklaşık 1 cm daha distalde yer alır. Bunun nedeni sol testisin kan birikimi nedeniyle daha ağır olmasıdır (29).

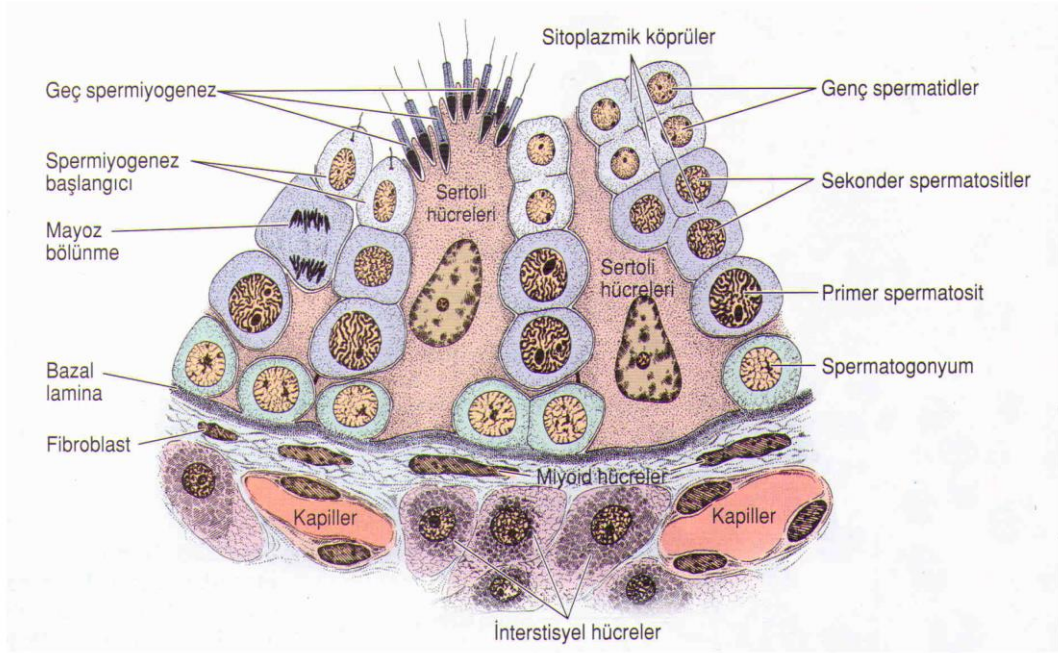
Her testis erişkinde 15-20 cc hacminde, longitudinal olarak 4,5-5,1 cm boyutlarında (31) ve 10-14 gr ağırlığındadır (28).

Testis üç tabaka ile sarılmıştır. Bu tabakalar dıştan içe doğru; tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosadır (29,32). Tunica albuginea testisleri örten kalın ve fibröz yapıda bir tabakadır (28) ve içerisine uzanan fibröz bölmeler testisi piramidal şekilli 250-300 lopçuğa (lobuli testis) ayırır (29). Bu lopçuklar içerisinde bulunan ve kıvrımlı şeklienden dolayı *tubuli seminiferi concerti* (seminifer tübül) adı verilen kanalcıklar testis parankimini oluşturur (28). Seminifer tübüllerin arası intersitisiyel doku adı verilen gevşek bir bağ doku ile doludur. Bu bağ doku içerisinde ince kollagen ve retiküler lifler, fibroblastlar, histiyositler ve mast hücreleri bulunur. Ayrıca kan ve lenf damarları ve bunların çevresinde tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiş olan Leydig hücreleri de (intersitisiyel hücreler) yer alır (30,33).

Leydig hücreleri 15-20 mikrometre çapında, köşeli (polygonal) ya da yuvarlak şekilli, endokrin işlev gören hücrelerdir ve testosteron salgırlar. Çekirdekleri hücrenin ortasında yerleşmiştir ve bir ya da iki tane bulunabilir. İyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyon, büyük çomak şeklinde protein karakterinde Reinke kristalloidleri (crystalloideum), C vitamini ve yaş ilerledikçe artan lipofuksin pigmenti içerirler (33).

Her bir lopçuktan gelen kanalcık mediastinuma sokulur ve birlikte rete testis adı verilen ağı oluştururlar. Rete testis, ductuli eferentes testis adı verilen kanallar aracılığıyla epididimise bağlanır. Böylece testislerde yapılan spermatozoonlar epididimise ulaşır (28).

Seminifer tübüllerin duvarında iki tip hücre yer alır: Spermatogenik seri hücreler (germinal hücreler) ve Sertoli hücreleri (destek hücreleri) (29,32, Şekil 2).



**Şekil 2. Seminifer Tübül Epiteli (27)**

Spermatogenik veya germinal hücreler seminifer tübüllerin bazal membranı ile lümeni arasında 4-8 tabaka halinde dizilmiş olarak bulunurlar. Bu tabakalar kademeli olarak spermatogenezin farklı aşamalarını temsil ederler (29).

Sertoli hücreleri tabanları bazal membran üzerine oturan apikal uçları ise lümeneye kadar uzanan hücrelerdir. Spermatogenik seri hücelere göre daha büyük hücrelerdir ve belirgin oval nukleusları bulunur. Şekilleri düzensizdir. Çok sayıda lateral uzantıları vardır. Spermatogenik hücrelerin beslenmesi, korunması ve desteklenmesinden sorumludur. Ayrıca kan-testis bariyerini oluşturarak kandaki zararlı maddelere karşı spermatogenik hücreleri korurlar ve fagositoz yetenekleri vardır (29,32). Birçok molekülü sentezleyebilirler. Bunlardan bazıları androjen bağlayıcı protein (ABP), kollajen tip I ve V, seruloplazmin, transferin, inhibin, somatomedin benzeri maddeler ve antimüllerian hormondur (AMH ya da MIS) (embriyogenez sırasında) (32). MIS, erkeğin seksüel gelişimi sırasında Müllerian kanalların gerilemesini başlatır. MIS'in yokluğunda Müllerian kanallar dişilerde uterus, fallop tüpleri ve vajinanın üst üçte birine farklılaşır. MIS'in bu temel rolüne ek olarak, doğum sonrası devam eden ekspresyonu, gonadal fonksiyonun düzenlenmesi, testiküler iniş, akciğer gelişimi ve tümör büyümesinin baskılanması gibi diğer rollere sahip olabileceği hipotezini destekler (34).

## TESTİSİN GELİŞİMİ

Düşünce tarihinin en az 3 bin yılı, farklı cinsiyetlerin nasıl oluştuğunu kapsar. Cinsiyet belirlenmesinde bilimsel çalışmanın spermin keşfi ile 17. yüzyılda başladığı söylenebilir, ancak 1841'e kadar araştırmacılar, "küçük hayvancıkların" köken ve işlevini atlamışlardır. Memeli yumurtası 1827'de keşfedilmiş ve yy'nin son çeyreğinde fertilizasyon gözlenmiştir. O dönemde yaygın olan, cinsiyet tayininin çevre kontrolü altında olduğu görüşü, 20. yy'nin ilk çeyreğinde kromozomal belirlenme fikrine dönüşmüştür. Yüzyılın 3. çeyreği boyunca, insan ve diğer memeli kromozom çalışmaları ve cinsiyet kromozom anomalilerinin keşfi, erkek cinsiyetinin belirlenmesinde Y kromozomunun önemi üzerinde durulmuştur (35).

Zwingman ve ark. (36) pre-implantasyon ve post-implantasyon dönemlerinde görülen XY fetüslerinin daha ileri gelişiminin Y kromozomunun hızlandırıcı etkisinden kaynaklandığını kabul etmiş ve ZFY ve SRY "cinsiyet belirleyici gen" bölgelerinin bundan sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Mevcut genetik inceleme Y kromozomunun etkisini ve X kromozom yapısındaki farklılıkların etkisini içeren daha karmaşık bir genetik kontrolü ortaya koymuştur.

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olsada, morfolojik karakteristiği gelişimin 7. haftasına kadar belli değildir (37-39). Bu nedenle genital sistem gelişiminin başlangıç periyodu "**seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası**" olarak adlandırılır (38).

Memelilerde cinsiyetin belirlenmesi üç aşamalı bir sürece bağlıdır; (1) fertilizasyonda cinsiyet kromozomlarının yerleşmesi (XX veya XY), (2) SRY'nin etkisi yoluyla (ya da bunların eksikliği), kromozomal cinsiyete göre gonadal farklılaşmanın erkek ya da dişi yönünde olması ve (3) gonadal cinsiyete göre iç ve dış genital organları içeren sekonder seks karakterlerinin düzgün gelişmesi. Bu üç aşamanın herhangi birisinde meydana gelecek bir hata, cinsiyet belirleme sürecinde aksamalara neden olabilir (40).

Genital sistem erkekte ve dişide gonadlar, iç duktal sistem ve dış genital organlardan meydana gelir (41). Gonadlar (testisler ve overler) başlangıçta bir çift uzunlamasına sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenkimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital (gonadal) kabarıklık olarak ortaya çıkarlar (39) ve mezodermal epitel, embriyonik bağ dokusu, primordial germ hücreleri olmak üzere üç farklı kaynaktan köken alırlar (38).

Primordial germ hücreleri, epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç eder ve 3. haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler (39). Daha sonra ameboid hareketlerle genital kabarıklıklara göç eder (38,39) ve primordial cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Primordial germ hücreleri gonadların over veya testis yönünde farklılaşmasında belirleyici etkiye sahiptir. Eğer embriyo erkekse, primordial germ hücreleri XY sex kromozom kompleksini taşırlar (39).

Çoğu memelide, cinsiyet tayini Y kromozomu üzerindeki SRY olarak bilinen (38,40), testis belirleyici genin etkisi ve varlığına bağlıdır. SRY'nin yokluğunda cinsiyet dışı gelişimi yönünde gerçekleşir. SRY, homolog X kromozomunda bulunmaz, sadece Y cinsiyet kromozomu üzerinde yer alır, böylece XX kromozom oluşumlu embriyolar tipik olarak dişi, XY'ler tipik olarak erkektir. Bir anlamda, memeli cinsiyeti, bir Y ya da bir X taşıyan sperm yumurtayı dölediğinde belirlenir. SRY geni olsa bile, farklılaşmamış gonad, sonraki embriyonik gelişime kadar testis farklılaşması yönünde hareket etmez (40).

Yirminci yy'nin son çeyreğindeki kanıtlarla, farelerde Tdy ve insanlarda TBF (testis belirleyici faktör) adı verilen Y kromozomu üzerindeki varsayımsal "testis belirleyici" genin devamlı izi sürülmüştür (35). TBF, primordial cinsiyet kordonlarını uyararak çoğalmalarına ve testis (medullar) kordonlarını oluşturmak üzere farklılaşmamış gonadların medulla derinlerine doğru uzamalarına neden olur (38,39). İleride rete testisi oluşturacak bu kordonlar, burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve ince hücre sıralarından oluşan bir ağ şeklini alırlar (38,39,42). Testis kordonları, testisin özel bağ dokusu olan yoğun fibröz yapıdaki tunica albuginea geliştikten sonra yüzey epiteli ile olan bağlantılarını kaybederler (38,39). Dördüncü ayda, testis kordonları uzayarak at nalı şeklini alır ve bu nalın açık uçları rete testis olarak devam eder. Testis kordonları bu haliyle primitif germ hücreleri ve Sertoli destek hücrelerinden oluşmaktadır (39).

Seminifer tübüller puberteye kadar ortaya çıkmaz (38,39). Puberteden itibaren, solid halde bulunan testis kordonlarının lümenleri açılır ve seminifer tübüller oluşur. Daha sonra seminifer tübüller rete testis tübüleriyle birleşirler (39). Rete testis, eferent duktulileri oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübülle devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (38).

İnsanda, 8-18. haftalarda, interstisyel doku arasında kalan mezenkimin hızla farklılaşmasıyla Leydig hücreleri oluşur (42). Gebeliğin 8. haftasında Leydig hücrelerinden

testosteron salgılanmaya başlar ve artık testisler cinsiyeti etkileyecek hale gelmiştir (39). Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, vas deferens, seminal veziküller ve epididimisi oluşturmak için mezonefrik (Wolf) kanalları uyarır. Boru şeklindeki genital dokularda, testosteron 5 $\alpha$ -redüktaz tarafından dihidrotestosteron biçimine dönüştürülür, bu da prostat, üretra, penis ve skrotum oluşumunu uyarır. Hem testosteron hem de dihidrotestosteron hedef dokuda hücrel androjen reseptörüne bağlanma yoluyla aracılık eder. Böylece androjenler iç ve dış erkek genital yapıların her ikisinin gelişimini de yönetir (40).

### **Spermatogenez**

Spermatogenez spermatogonial kök hücrelerin bölünmesiyle başlar ve kendini yenileyerek ya da farklılaştırarak, kök hücre karakterinde spermatogoniayı üretme yeteneğine sahiptir. Spermatogonia primer spermatisitleri vermek üzere birkaç mitotik bölünme geçirir. Sonra primer spermatisit, sekonder spermatisiti vermek üzere mayotik bölünme geçirir (43). Sekonder spermatisit, küresel bir şekle sahiptir ve 4.6 kat daha küçük hücre hacmi, 6.2 kat daha az nükleoplazmik indeksi ile primer spermatisitten ayırt edilir (44). Bundan sonra sekonder spermatisitler doğrudan ikinci mayoz bölünmeye gider ve yuvarlak spermatidler oluşur. Son olarak yuvarlak spermatidler yapısal değişikliklerle spermiumu oluşturur (43).

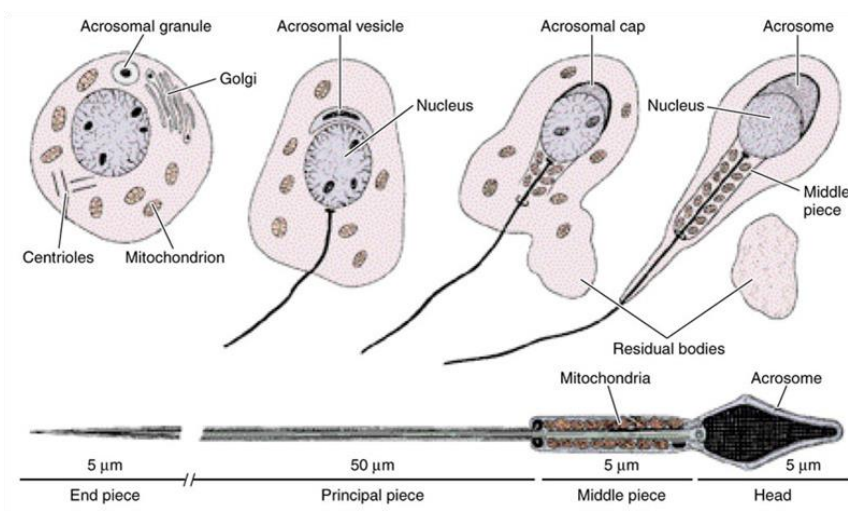
Spermium oluşumu spermiyogenez olarak isimlendirilir (45) ve 4 aşamada gerçekleşir: Golgi evresi, başlık evresi, akrozom evresi ve olgunlaştırma evresi (32, Şekil 3).

**Golgi evresi:** Spermatidler içerisinde bulunan Golgi aygıtı nükleusa yakın yerleşimlidir. Bazı enzimler Golgi aygıtında modifiye olduktan sonra küçük veziküller halinde trans Golgi ağı aracılığıyla salınırlar. Bu veziküller birleşerek sperm ön yüzünün oluşacağı bölgede nükleus zarına tutunurlar ve akrozomal vezikülü meydana getirirler. Bu esnada sentrioller nükleustan uzağa taşınırlar. Distalde yer alan sentriol aksonem oluşumuna katılırken, proksimalde yer alan sentriol bağlantı parçasının oluşmasına katkı sağlar (32).

**Başlık evresi:** Sperm ön yüzünün oluşacağı bölgede nükleus zarına tutunan veziküllerin oluşturduğu akrozomal vezikül daha sonra nükleer zarın etrafını sarar ve akrozama dönüşür (32).

**Akrozom evresi:** Bu evrede hücre uzar, nükleus yoğunlaşır ve mitokondriler nükleusun arka kısmına doğru kaymaya başlar (32). Akrozom nükleus yüzeyini sarar. Enzim içeriğinden dolayı, lizozom gibi işlev görür. Oositin döllemesi sırasında bu enzimler oosit içerisine girmeyi kolaylaştırır (46).

**Olgunlaştırma evresi:** Bu aşamada sitoplazma hücreden uzaklaştırılır. Olgunlaşmaya devam eden sperm lümenine salınır (32). Seminifer epitelden tübül lümenine salınan sperm hala olgunlaşmamış ise yumurtayı döllemesi mümkün değildir. Spermin olgunlaşması epididimiste gerçekleşir (45).



**Şekil 3. Spermiogenezis ve olgun spermium (33)**

Spermatogenez boyunca germ hücreleri farklılaşmanın her aşamasında Sertoli hücreleri ile yakın temastadırlar. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin çoğalmaları, mayoz ve spermium haline başarılı bir şekilde dönüşmeleri için fiziksel ve metabolik destek sağlar (45).

Spermatogenez yaşam boyunca devam eder ve otokrin ve parakrin yollar aracılığıyla hareket eden büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler de dahil olmak üzere bölgesel olarak üretilen çok sayıda faktörün yanısıra hormonların karmaşık bir çeşitliliği ile düzenlenir (45).

## TESTİSİN HİSTOFİZYOLOJİSİ

Testislerin skrotum içindeki sıcaklığı, 37°C olan normal vücut ısısından 2-3°C daha düşüktür (yaklaşık 35°C'dir). Bu sıcaklık spermatogenezin regülasyonu için gereklidir. Testislerin her biri testiküler arter yoluyla kanlanır. Testiküler arterin çevresi, testisten



abdominal venlere kan taşıyan pampiniform venöz pleksus tarafından çevrelenmiştir. Bu düzenleme mevcut testiküler ısının kan damarları arasındaki karşılıklı ısı değişimiyle korunarak testislerin düşük sıcaklıkta kalmasına yardım eder. Ortam sıcaklığının korunmasındaki diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ve kasılıp gevşeyerek testisleri skrotum içinde aşağı yukarı hareket ettiren kremaster kasıdır. Kremaster kası kasılarak testislerin daha düşük sıcaklıkta kalacağı inguinal kanallara çekilmesini sağlar (27).

Spermatogenezde en önemli faktör hormonlardır (27). Bu hormonlar hipotalamus, pitüiter bezin anterior lobu ve gonadal hücreler (Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreler ve Leydig hücreleri) arasında düzenlenmektedir (47). Spermatogenezis, follikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH'a yanıt olarak interstisyel Leydig hücreleri testosteron miktarını artırır. Sertoli hücrelerinde FSH ve testosteron reseptörlerinin varlığı, bu hücrelerin spermatogenezde primer düzenleyici olmalarını sağlar. Ayrıca FSH Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını ve sonuçta siklik adenozin monofosfat'ın (cAMP) artışı stimüle eder. Aynı zamanda androjen bağlayıcı proteinin (ABP) sentezi ve salgılanmasında harekete geçirdiği bilinmektedir. Bu protein testosteronla bağlanarak seminifer tübül lümenine gider ve spermatogenez testosteron yoluyla uyarılır, östrojen veya progesteronla inhibe edilir (27,47).

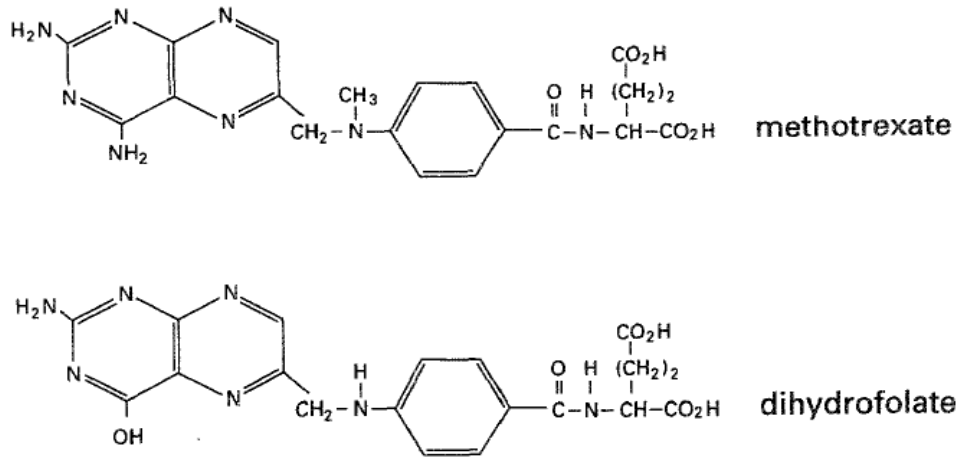
Spermiumlar epididimise uygun bir medium olan testiküler sıvı aracılığıyla taşınırlar. Bu sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından yapılır. İçeriğinde; steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla bağlantılı olarak androjen bağlayıcı proteinleri bulundurur (27).

## **METOTREKSAT**

Metotreksat, folik asit (FA) antagonisti olup kemoterapötik bir ajandır (2,5,48-50). Akut lenfoblastik lösemi, lenfoma, osteosarkoma, meme, baş ve boyun bölgesi kanserlerine ek olarak psöriyazis ve romatoid artrit gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (2).

Dihidrofolat redüktaz, folat bağımlı yolların merkezî bir bileşeni olarak hizmet veren DHF'nin Trihidrofolat'a (THF) dönüşümünü katalizler. THF aynı zamanda pürin sentezinde yer alan basamaklarda ve homosisteinin (metil grubu akseptörü) metionine dönüşümü sırasında 5-metil-THF'den oluşturulur. Biyolojik olarak aktif folatlar tetrahidrofolatların türevleridir ve bir karbon transfer reaksiyonlarına katılırlar. Bu folatlar hücrelerde

poliglutamat formlarına dönüştürülebilir ve böylece hücre içinde hapsolür. MTX (ametopterin, 4-amino 4-deoksi-N10-metilpterol-glutamik asit) DHF'ye oldukça benzer bir yapısal formüle sahiptir. MTX'te hidroksil (OH) grubu yerine amino (NH<sub>2</sub>) grubu vardır ve fazladan bir metil grubu içerir (51, Şekil 4). DHFR'nin yüksek affiniteli bir inhibitörü olarak MTX, DHF havuzunun tükenmesine neden olur ve dolaylı olarak DNA sentezini baskılayarak timidilat sentezini etkiler (52).



**Şekil 4. MTX ve DHF'nin yapısal formülü (51)**

İnsanlarda, vücudun ana yapılarından birisi olan folatı sentezleme yeteneği olmadığından diyetle folat alınması şarttır. DHFR, DHF'yi folat bağımlı yollarda temel bileşen olarak hizmet eden THF'ye dönüştürür (51). Chabner ve ark. (53) MTX'in FA antagonisti mekanizması olarak iki teori öne sürmüşlerdir. Folik asit azalma teorisi; intrasellüler FA'nın azalması DHFR'nin blokajına dayanmaktadır. Yarışma teorisi; Nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları MTX'in doğrudan inhibe etmesine ve DHF birikimine dayanmaktadır. MTX, DHFR'yi inhibe ederek THF'nin azalmasına neden olur.

Ayrıca MTX glutamatları, 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol-karbokzamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerdeki inhibisyon sonucu pürin ve pirimidin metabolizmasında inhibe olur ve bunu takiben tümör hücreleri ve normal hücrelerdeki DNA sentezinde bozulmalar meydana gelir. MTX; proteinler, lipidler ve miyelinin şekillenmesinde büyük önemi olan transmetilasyon reaksiyonlarında belirgin olarak etki eder (54).

Metotreksat ile tedavi birden fazla organda artmış oksidatif stres oluşturmaktadır. Oksidatif stres denatürasyon ve fragmantasyonda sperm DNA'sının yüksek duyarlılığı ve apoptozisin indüklenmesinde önemli bir rol oynayabilir (55).

Oksidatif stresin MTX kaynaklı testiküler hasarın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Spermatozoidlerde apoptozisin ve testiküler seminifer tübüllerde atrofinin reaktif oksijen türlerinde (ROS) bir artış ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (18). İlaç sitotoksitesinin bir mekanizması olarak biyomoleküllere karşı ROS ve oksidatif hasarın sperm fonksiyonunu azaltarak erkek infertilitesine neden olabileceği öne sürülmüştür (56).

Metotreksat kullanımında bulantı, transaminaz düzeyinde değişiklik ve ağız iltihabı gibi yan etkilerin doza bağımlı olduğu ve sıklıkla rastlandığı bildirilmiştir (51).

Yan etkiler genellikle 2 hafta içinde tamamen geçse de, ilaç atılımının geciktiği böbrek fonksiyonu bozulmuş hastalarda uzun süreli miyelosüpresyon oluşabilir. MTX'in önemli bazı toksisiteleri; alopesi, dermatit, intersitisyel pnömoni, nefrotoksisite, hatalı oogenez veya spermatogenez, ve teratogenezdür (57).

Metotreksat kaynaklı karaciğer hasarının, MTX'in kronik veya yüksek dozda uygulanması olabileceği ileri sürülmüştür. MTX'in steatoz, kolestaz, fibrozis ve siroz gibi karaciğer hepatoksisitesine yol açabileceği söylenmiştir (58). Karaciğer enzimlerinin yükselmesi yüksek doz MTX ile tutarlı bir bulgudur ancak genellikle geri dönüşümlüdür. Diğer yandan düşük doz MTX, psöriazisli hastalarda olduğu gibi uzun süreli kullanım sonrası siroza yol açabilir (57).

Metotreksat, kriptler ve kısaltılmış villilerde indirgenmiş mitozla karakterize, bağırsak epitelinde akut bir hasara neden olur (59). Tek doz MTX'in ince bağırsakta ağır hasara yol açarak şiddetli villöz atrofi, epitelde düzleşme ve yoğun kript kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca belirgin selülarite ve stromadaki kan damarlarının sayıca arttığı da bildirilmiştir. Bunlara ek olarak ciddi mukozal hipoplazi söz konusudur (60).

Çeşitli nedenlerle erkek hastalarda MTX kullanımının ciddi oligospermi (61) ve yine deneysel hayvan modellerinde seminifer tübüllerin dejenerasyonu, çaplarının azalması, bazal lamina kalınlaşması ile interstisyel alanda ödem gibi histolojik değişikliklere neden olduğu ve spermatogenezisi bozduğu gösterilmiştir (5,17,55). Ayrıca MTX'in kanda testosteron seviyesini düşürdüğü de rapor edilmiştir (50). MTX'in antioksidan enzim sisteminin

etkinliğini azaltarak ve hücrelerin ROS'a karşı daha duyarlı hale gelmelerini sağlayarak oksidatif stres sonucu hasara neden olduğu bildirilmiştir (4,52).

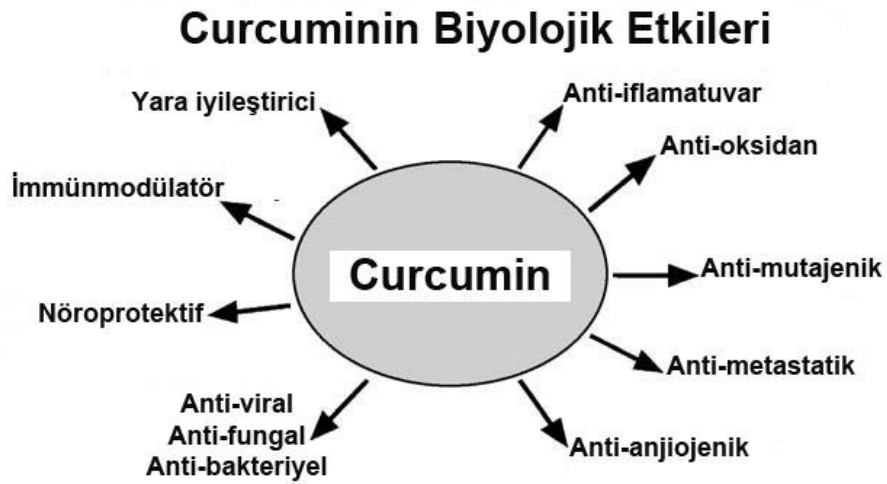
Işık ve ark.'nın (7) yaptığı bir çalışmada, MTX'in düşük dozda kısa süreli kullanımında spermatogenezin bozulduğu, seminifer tübül duvarlarının kalınlaştığı, germ hücrelerinde matürasyon ve sıralanma bozukluğu olduğu, lümende spermium azlığı veya yokluğu dikkat çekmiştir. Tedavi süresinin artması en çok spermatozoid ve spermatidleri etkilemiş, spermatogoniumlar ise daha az etkilenmiştir. Bu hücrelerde kromatin yoğunlaşması, parçalanması, vakuolizasyona bağlı hücre ölümü görülmüştür. Ayrıca dejenere olan spermatidlerin lümene döküldüğünde izlenmiştir. Spermiogenezdeki bozulmaya bağlı olarak spermatidlerdeki akrozomun duruşu değişmiştir. Azalan spermiumlar daha derinde yerleşim göstermiştir. Sertoli hücrelerinde yağ birikimi artmış, interstisyel dokuda ödem oluşmuş ve makrofajlarda artış meydana gelmiştir.

## **CURCUMİN**

*Curcuma longa*, *Zingiberaceae* (Zencefilgiller) familyasına ait (21,62) sarı çiçekli, mızrak şeklinde yaprakları ve etli bir yumrusu olan (21) çok yıllık bir bitkidir (63-65). Turmerik ve körideki sarı pigment olan CMN antioksidan ve antikanserojen aktiviteye sahiptir (66,67, Şekil 5). Hindistan ve Çin başta olmak üzere Uzak Doğu ve Asya ülkelerinde yemek endüstrisi (tatlandırıcı, koruyucu, renklendirici, baharat vs.) ve geleneksel tıp (inflamasyon, burkulma vs.) alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (68). Çeşitli çalışmalarda CMN'nin immün sistem düzenleyici, antitümöral, antipsöriyatik (69), antioksidan, antiinflamatuvar (69,24), bakterisid, antihelmintik etkiler gibi terapötik uygulamalar ve yüksek kolesterolün düşmesinde yardımcı geniş bir spektruma sahip olduğu gösterilmiştir (70, Şekil 6). Bu polifenolik fitokimyasal halen güçlü bir antikanser ajan olarak kabul edilir. CMN'nin tümörosidal etkisi, fare sarkoma (S180), insan kolon kanser hücreleri (HT-29), insan böbrek hücre serisi 293 ve hepatosellüler karsinom (HepG2 hücreleri) gibi hücre serilerinde geniş ölçekte çalışılmıştır. CMN aynı zamanda insan meme kanseri MCF-3 hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterir. CMN aracılı tümörosidal etkinin mekanizması protein tirozin kinaz aktivitesi, protein kinaz aktivitesi ve arakidonik asit metabolizmasının engellenmesine dayandırılmıştır (24). Tümör hücrelerinin bölünmesini durdurduğu ve bazı kanser tiplerinde kanser hücrelerinin ölüm hızını arttırdığı için antikanser özelliğe sahip bir bileşiktir. Ayrıca CMN'nin antikanser bir ajan olarak meme bezleri, deri, mide, kolon, akciğer, prostat ve karaciğerde tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir (71-80).



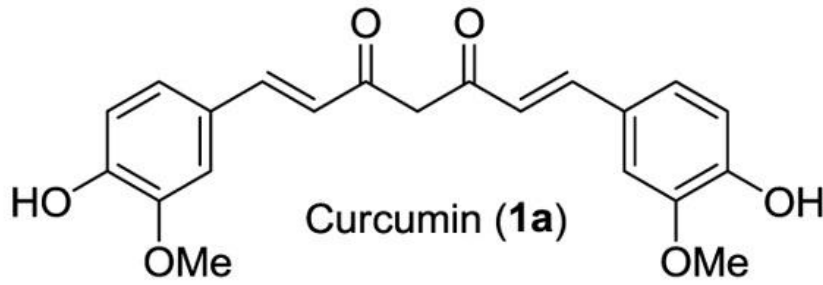
Şekil 5. Curcumin (66)



Şekil 6. Curcuminin Biyolojik Etkileri (70)

Curcumin suda çözünmediğinden, hücre zarının hidrofobik ceplerinde bulunur. Kimyasal özelliklerinden dolayı, hücre membranına kolayca penetre olarak hızlıca sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmada biriken CMN'nin nükleusa girmediği gözlenmiştir. Hidrofobik özelliklerinden dolayı yoğunlukla plazma membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek kılıfı gibi membranlı yapılar içerisinde bulunur. CMN dolaşımında ya çok az bulunur veya hiç bulunmaz (81).

Vitamin E gibi CMN de yağda çözünen bir fenoldür ve bir fenoksi radikal üretmek için oksitleyici radikallerin yayılan zincirleriyle kendi fenolik OH grubu reaksiyon gösterir. Bu, iki fenolik OH grubu ile birleşmiş halde bulunan bir  $\beta$ -diketon'a sahiptir. Oksitleyici ajanların saldırısı boyunca elektron transferi ile üretilen fenoksi radikal, molekülün genişleyerek birleşmesiyle sağlamlaşmıştır. Ancak,  $\beta$ -diketon yapısının antioksidan aktivitedeki kesin rolü hala bilinmemektedir (82, Şekil 7).



**Şekil 7. Curcuminin kimyasal formülü (66)**

Curcuminin metabolizması ratlarda hem oral hem intraperitoneal uygulama sonrası incelenmiştir. İzole edilen ürünlerin ana metabolitleri tetrahidrocurcumin (THC), heksahidrocurcumin, dihidroferulik asit vb. dir. THC, CMN'nin bağırsaktaki metabolizması sırasında üretilen, CMN'nin kısmen indirgenmiş bir ürünüdür (82).

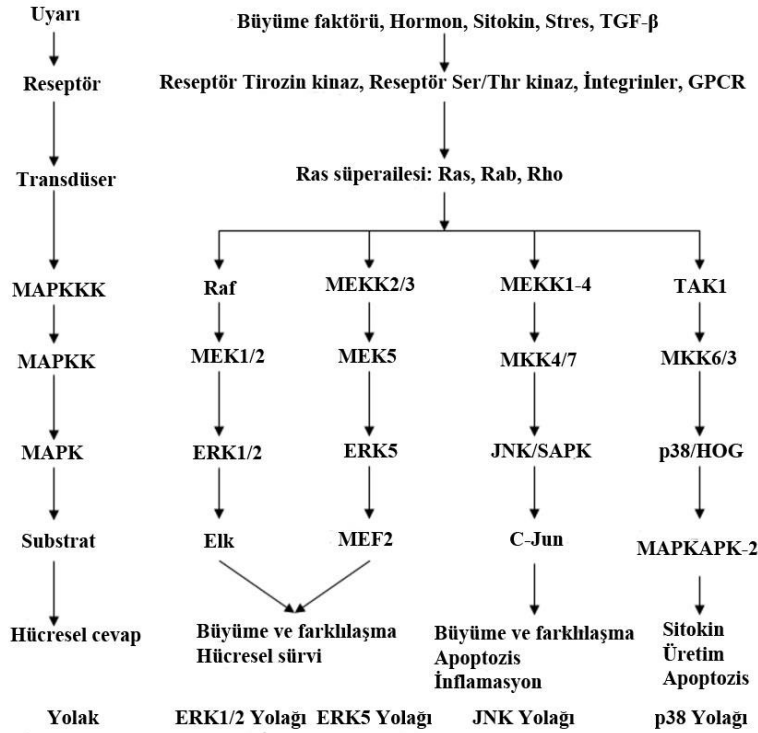
Yapılan bir deneysel kolit çalışmasında CMN'nin, p38 MAPK inhibisyonu yaparak kolonik mukozada koruma sağladığı bildirilmiştir (25). Buna ek olarak, daha önce sıçan enterit modeli çalışmasında da CMN'nin inhibitör faktör I-kB'nin kinaz aktivitesini engellediği, bu mekanizmanın NF-kB aktivasyonunu engelleyen muhtemel yolak olduğu düşünülmüştür. CMN, mitojen ile aktive edilen protein kinaz fosfataz-1'i (MKP-1) aktive ederek p38 MAPK inaktivasyonuna ve I-kB'yi baskılayarak ta NF-kB inhibisyonuna neden olmuştur. Sonuç olarak, CMN, inflamatuvar cevabın azalmasına yol açmıştır (26).

## **MİTOJENLER TARAFINDAN AKTİVE EDİLEN PROTEİN KİNAZLAR**

Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazlar, hücre dışı sinyallerin hücre içine taşınmasında fonksiyon gören protein kinaz ailesidir. Farklı MAPK yolları farklı sinyallerle iletilir ve fizyolojik süreçte geniş çeşitlilikte bir role sahiptir (83). Yapılan son araştırmalar

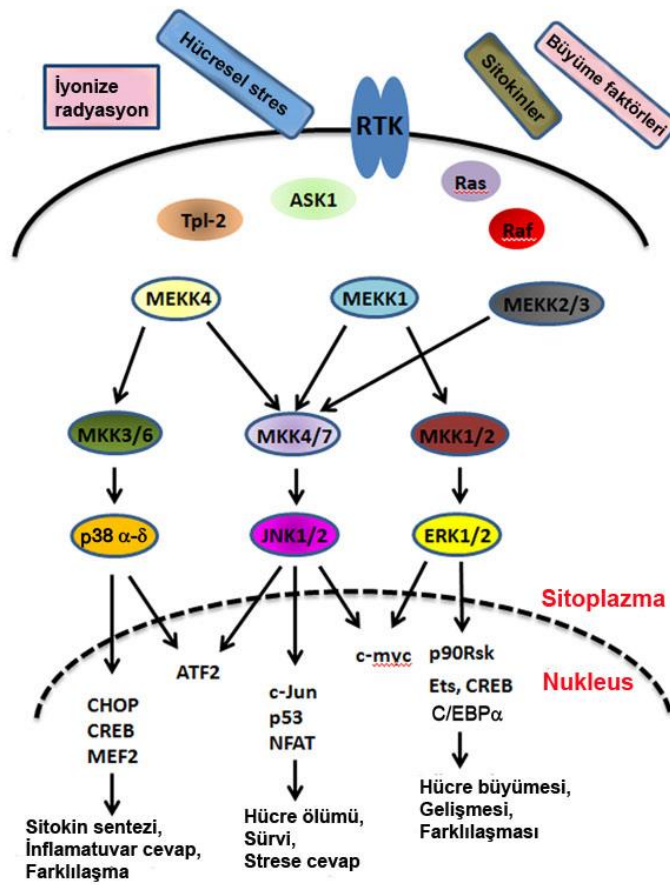
tanımlanan mevcut MAPK yollarının biyotik ve abiyotik faktörlerin yanısıra hücre çoğalması ve hormon fizyolojisinde de önemli rol oynadığını doğrulamaktadır (84). Bitkilerde abiyotik stresler, patojenler, bitki hormonları ve hücre döngüsü hattının sinyallenmesinde MAPK'ların rol oynadığı kanıtlanmıştır (85). Ayrıca MAPK'lar ökaryot hücrelerde de hücre içi sinyal iletiminde büyük öneme sahiptir (86) ve tüm ökaryotlarda büyüme, ölüm, farklılaşma, çoğalma ve stres tepkilerinin yüksek oranda korunmuş merkezî düzenleyicileri işlevini görürler (84).

Temel MAPK yolağı 3 sinyal zincirine dayanır. Aktive edilmiş MAP kinaz kinaz kinaz (MAPKKK), MAP kinaz kinazı (MAPKK) aktive eder (86,87), MAPKK ise MAPK'nın veya ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) aktivasyonundan sorumludur. MAPKKK düzenleyici domain olarak N-ucu ve serin/triyonin protein kinaz domaini olarak C-ucu içerir. Aktivasyonu ile MAPKKK, MAPKK üzerinde aktivasyon halkasında bulunan iki serin ve treonin köklerini fosforile eder. Bu köklerin fosforlanmasıyla aktive olan MAPKK, MAPK üzerinde triyonin ve tirozin köklerini fosforlar. Bu fosforilasyon şekilsel değişikliğe sebep olarak MAPK'yı aktif hale getirir (87). Nükleusta yer değiştirip aktifleşen bu MAPK daha sonra belirli transkripsiyon faktörleri tarafından fosforillenen çeşitli gen efektörlerinin ekspresyonuyla düzenlenir (86, Şekil 8)



**Şekil 8. Tipik MAPK sinyal yolağı (88)**

Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz ailesi üç ana kinazdan oluşmaktadır: ERK, Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK (89-92). ERK mitojen veya büyüme faktörü uyarılmasına cevaben aktive edilmesine karşın JNK ve p38 MAPK proinflamatuar sitokinler ve UV ışık, hiperosmolarite, ısı şoku ve mikrotübül bozan ilaçları da içeren çeşitli hücrel stresler tarafından aktive edilirler (90). Buna ek olarak ERK3, ERK5, ERK7 ve ERK8 de dahil olmak üzere pekçok diğer kinazın klasik yolların dışında farklı etki ve işlevlere sahip olduğu görülmektedir (93). Bu kinazların hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, hücre ölümü ve bağışıklık yanıtları da dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (89, Şekil 9).



**Şekil 9. Memelilerde MAPK sinyal yolağı diyagramı (94)**

Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz yollarına ilişkin farmasötik gelişmeler MAPK'ları engelleyen moleküller üzerinde odaklanmıştır. Örneğin p38 MAPK inhibitörleri, inflamatuvar hastalığı olan hastalarda etkinliği açısından değerlendirilmektedir ve ERK inhibitörleri kanser hücre kültürlerinde test edilmektedir ki, burada ERK yolağının aktivasyonuna bazı kemoterapötik ajanlar ile anti-apoptotik yanıtı takip eden tedavi aracılık etmiştir (93).



## p38 Sinyal İleti Yolu

İlk olarak 1994'te tanımlanan p38 MAPK kaskadı, çeşitli hücrel yanıtı stres, inflamasyon ve diğer sinyallere karşı düzenlemiştir. p38 MAPK iki Treonin-Glisin-Tirozin (Thr-Gly-Tyr) motifi fosforilasyonu ile hızlıca aktive edilir ve fosforillenmemiş formunda nispeten inaktiftir (93).

p38 MAPK inflamatuvar tepkide önemli rol oynayan yaygın ve yüksek oranda korunmuş bir proteindir (8,92). Nötrofil, makrofaj ve T-lenfositler gibi inflamatuvar hücrelerin uyarılmasında, p38'in fosforilasyonundan sorumlu protein fosforilasyon mekanizmalarını başlatmak üzere reseptör bağlantılı G-bağlı ve G-bağlı olmayan proteinlerin aktivasyonunu tetikler. Fosforil p38 aktive edici transkripsiyon faktörü 2 (ATF-2) gibi transkripsiyon faktörlerini fosforlamak ve aktive etmek için nükleusa taşınır. Bu etkileşim interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımıyla sonuçlanır (8).

p38 MAPK'nın  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  olmak üzere 4 izoformu bulunur (8,92,93). p38 $\alpha$  en karakterize olanıdır ve inflamatuvar yanıtlarda rol oynayan en belirgin kinaz olması muhtemeldir (92). Osmotik yanıtın önemli bir düzenleyicisi olan p38 $\alpha$  (MAPK14) proteini, *Saccharomyces cerevisia* Hog1'in homoloğu olarak bulunmuştur. p38 MAPK aile üyeleri yaklaşık olarak benzerdir. p38 MAPK'ların dördü de farklı doku ekspresyon şekillerine sahiptir ve farklı genler tarafından şifrelenmişlerdir. p38 $\alpha$  çoğu hücre tipinde önemli seviyelerde eksprese edilirken diğerleri, daha dokuya özgü bir tarzda eksprese edilir. Örneğin beyinde p38 $\beta$ , iskelet kasında p38 $\gamma$  ve endokrin bezde p38 $\delta$  eksprese edilir (95). Bu izoformlar homolog dizilimler taşıdığı gibi Thr-X-Tyr motifinde Thr ve Tyr aminoasitlerinin MAPK kinazları tarafından fosforile edilmesiyle aktif hale gelirler (8,93).

Substrat özgüllükleri örtüşen p38 MAPK aile üyeleri, bazı farklılıklar bildirilmesine rağmen özellikle substratlarla p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$  ya da tam tersine p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  tarafından daha iyi fosforile edilmiştir. Spesifik p38 MAPK aile üyelerinin genetik ablasyonu, fonksiyonel fazlalığın varlığını göstermiştir. Örneğin, SAP (sinaps ile ilişkili protein) 97/hDlg'nin (insan disk büyüklüğü) osmotik şok kaynaklı fosforilasyonu genellikle p38 $\gamma$  aracılıdır, ancak bu kinazın yokluğunda diğer p38 MAPK'lar bu fonksiyonu yapabilirler (95).

p38 MAPK'lar, geniş çeşitlilikte uyarılarla birçok MAPKKK tarafından sırasıyla aktive edilen, MAPKK3 ve MAPKK6 olarak adlandırılan, bir üst MAPKK tarafından

Treonin<sup>180</sup> ve Tirozin<sup>182</sup> üzerinde ikili fosforilasyonla aktive edilirler. p38 MAPK yolağının aktivasyonu, apoptozun indüklenmesine yol açan, oksidatif stresi de içeren çeşitli uyaranlara karşı inflamatuvar yanıtın gelişmesinde önemlidir. Örneğin, tekli oksijen, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve peroksinitrit p38 MAPK'yı aktiveleştirir. p38 MAPK, TNF kodlayan genler ve siklooksijenaz-2 (COX-2) de dahil olmak üzere bir takım inflamasyon ilişkili gende meydana gelen, AU tekrarlarını içeren mRNA'ların stabilizasyonuna katılır. Ayrıca IL-1 $\beta$  ve IL-6'yı da içeren diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik eder (92).

İnflamatuvar tepkide p38 MAPK sinyal yolları hakkında çoğu bilgi hücre kültürü çalışmalarına dayanır. Sınırlı sayıda çalışma inflamatuvar hayvan modellerinde p38 MAPK'nın patolojik rollerini ortaya koymuştur. p38 MAPK yolağının in vivo inflamasyonda nasıl yer aldığı hala tam olarak bilinmemektedir. Özellikle p38 MAPK'nın hangi hücre tiplerinde aktive edildiği ve hangi inflamatuvar yolların p38 MAPK bağımlı olduğu hala cevaplanamamıştır (8).

### **JNK Sinyal İleti Yolu**

JNK sinyal ileti yolu stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) ailesinin bir üyesidir. Hücreler aracılığıyla bağlantı sağlar, hücre dışı (ya da hücre içi) strese cevap verebilir ve genleri devreye sokar (yani aktif transkripsiyon yapar). Çok sayıda [endotoksin, reaktif oksijen türleri, proinflamatuvar sitokinler (IL-1, TNF-a), kemokinler (MCP-1), seramidler, büyüme faktörleri, ışınlama ya da ozmotik stres gibi] strese maruz kalan hücreler, belirli sitoplazmik kinazları kapsayan fosforilasyon reaksiyonlarının bir kaskadını uyarır ve aktivasyon dolayısıyla JNK'nın fosforilasyonuna yol açar (96).

JNK sinyal ileti yolunun birden fazla izoformu vardır (JNK 1,2 ve 3). Bunlar, tek tek genler tarafından kodlanır ve alternatif mRNA zinciri daha büyük enzim heterojenitesine sebebiyet verebilir. JNK3'ün ifadesi büyük ölçüde merkezi sinir sistemiyle sınırlı olsa da, hem JNK1 hem de JNK2 pek çok dokuda birçok hücre tipinde yaygın olarak ifade edilir (97).

JNK sinyal ileti yolu 1, 2 ve 3 MAPKKK'ların (örneğin, MAPKKK1/2 ya da TGF- $\beta$  ile aktive edilen kinaz 1) etkilediği MKK 4 ve 7 tarafından aktive edilir. JNK, hücreler içinde çok farklı işlevlere sahiptir ancak en çok hücre sel ve çevresel streslere maruz kaldıktan sonra apoptozu tetikleme rolü ile bilinir. Klasik olarak, JNK c-Jun'ı fosforile eder. c-Fos ile c-Jun'ın bağlanması AP-1'in aktivasyonuna yol açar. Sonuçta hücre proliferasyonu teşvik edilmiş olur (98).

## **ERK Sinyal İleti Yolu**

ERK, MAPK süper ailesinin bir üyesidir (99,100). ERK grubu içinde sekiz izoformu vardır (ERK1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8). Bunlardan ERK1 ve ERK2 daha çok çalışılmıştır. ERK1 ve ERK2, hem bir treonin hem de bir çift özgül motif (Thr-Glu-Tyr) içinde bitişik bir tirozin artığının fosforilasyonu boyunca ikili özgül kinaz MEK1 ve MEK2 tarafından düzenlenir (99).

ERK1/2 Ras-Raf-MEK yolağının rol oynadığı farklı mekanizmalar yoluyla çeşitli stres uyarılarına yanıt olarak aktive edilir (99). ERK1/2 yüzeylerinde transkripsiyonel düzenleyiciler, apoptoz regülatörleri ve steroid hormon reseptörleri (örneğin, östrojen reseptörü (ER)  $\alpha$ ) bulunur (98).

Aktivasyonda, birkaç sitoplazmik hedef veya nükleusa göç, ERK enzimlerini fosforilleyebilir. ERK, c-fos ve karışık kökenli kinaz 1 (ELK1) de dahil çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve fosforiller. ERK1/2 ve diğer MAPK'lar sadece transkripsiyon faktörleri değil aynı zamanda membran proteinlerini de hedefler. ERK1/2'nin aktivasyonu hücre çoğalmasını artırır ve hücreleri apoptoza karşı koruyan genleri düzenler. Ayrıca transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna yol açar (91).

ERK MAPK yolağının aktivasyonunun, hücre bölünmesini teşvik ettiği bildirilmektedir. ERK'nın kısa süreli aktivasyonu, çoğalmayı teşvik için mitojenik bir yanıt verirken, uzun süreli aktivasyonu farklılaşmayı uyarır (91).

## **NÜKLEER FAKTÖR-KAPPA B (NF- $\kappa$ B)**

Nükleer faktör-kappa B inflamatuvar ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarını düzenlediği bilinen bir dizi spesifik transkripsiyon faktörüdür (101).

Nükleer faktör-kappa B, ilk olarak B hücrelerinde immünglobulin kappa hafif zincirini arttırıcı bir diziye bağlı olan bir protein olarak tespit edilmiştir (102,103). Bu dimerik transkripsiyon faktörü, stres cevapları, inflamasyon ve programlanmış hücre ölümüyle (apoptozis) alakalı genlerin büyük çeşitliliğini aktive edebilen farklı üyelerden oluşmaktadır (102).

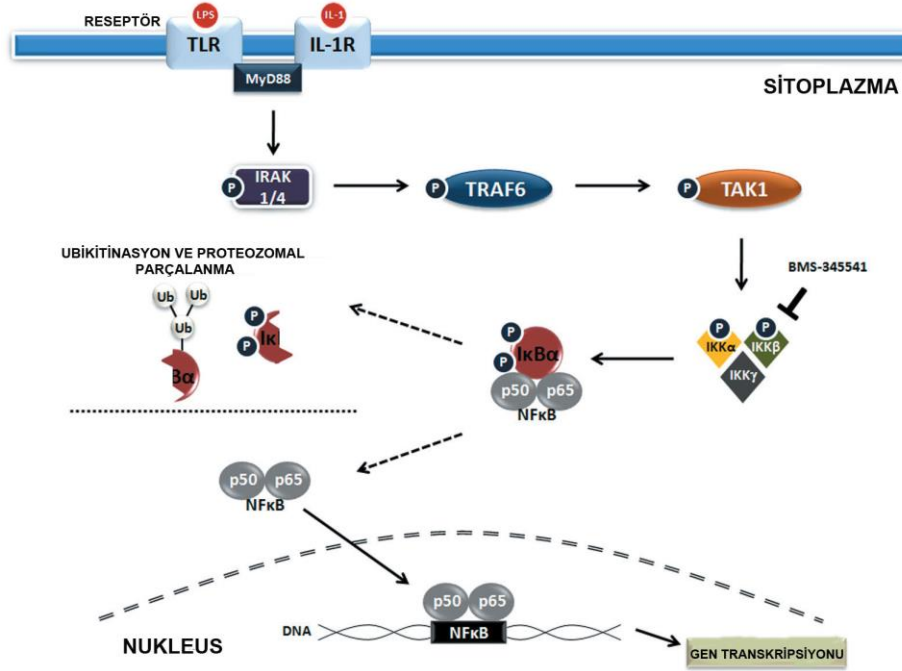
Nükleer faktör-kappa B sistemi redoks duyarlı bir mekanizmadır. Aktivasyonu, immün ve inflamatuvar yanıtları düzenler. NF-kB istirahat halindeki hücrelerde İnhibitör kappa B (I-kB)'ye bağlanarak sitoplazmada inaktif formda bulunur. Bununla birlikte, I-kB proteinleri uyarıldıktan sonra fosforile olur ve yıkılır. Daha sonra NF-kB nükleus içine geçer ve inflamatuvar genlerin ekspresyonunu tetikler (104).

Nükleer faktör-kappa B sinyal yolunun önemli bir özelliği NF-kB tarafından düzenlenen hedef genlerin sayısının yanısıra NF-kB aktivasyonunu uyarıcı hücre dışı ajan veya araçların çeşitliliğidir (105). Örneğin; bakteriyel toksinler, TNF- $\alpha$ , IL-1, T hücre mitojenleri, UV ışığı, iyonize radyasyon (IR) ve oksidatif stres NF-kB aktivasyonunu indükler (102).

Nükleer faktör-kappa B, beş farklı gen içeren [NF-kB1 (p80/p105), NF-kB2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel ve RelB], transkripsiyon faktörleriyle yakın ilişkili bir ailedir (103,106,107). Bu beş gen kendi sekansında bir Rel Homoloji Alanı (RHD) paylaşarak yedi gene yükselir. RHD, dimerizasyona, kendi inhibitörleriyle etkileşime ve DNA bağlanımına aracılık eder. NF-kB proteinlerinin iki türü vardır: 1) RelA, c-Rel ve RelB, onların olgun formlarında sentezlenir ve transkripsiyon aparatı ile etkileşim içinde olan bir transaktivasyon alanı içerir ve 2) NF-kB1-p105/p50 ve NF-kB2-p100/p52, bir ön-madde biçiminde sentezlenmektedir. Ön-madde formları (p100 ve p105), olgun proteinlerin (p50 ve p52) üretimi ile sonuçlanan proteozom tarafından proteoliz edilen C-terminal ankyrin tekrarı içerir. p50 ve p52 de DNA bağlanma alanı içerir ancak bir transaktivasyon alanından yoksundur (106,107).

Nükleer faktör-kappa B anahtar regülatörleri, NF-kB (I-kB) önleyicileridir. Bunlardan en yaygın olanları I-kB $\alpha$ , I-kB $\beta$  ve I-kB $\epsilon$ 'dur. I-kB proteinleri uyarıcıların yokluğunda sitoplazmada fonksiyonel NF-kB dimerlerine bağlanır ve nükleer translokasyonu önler. IL-1 reseptör (IL-1R) veya Toll Benzeri Reseptör (TLR) sinyal yoluyla, myeloid farklılaşma birincil yanıt geni 88 (MYD88) ve interlökin-1 reseptör ilişkili kinazın (IRAK) göçünü içeren bir kaskadı aktive edebilir. IRAK aktivasyonu, transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  ile aktifleşen kinaz 1'in (TAK1) aktifleşmesine yol açarak TNF-reseptör ilişkili faktör 6'nın (TRAF6) fosforilasyonunu sağlar. Bunun yanısıra I-kappaB kinaz kompleks (IKK) fosforilasyonu için de gereklidir. IKK, I-kB $\alpha$  proteinini fosforilledikten sonra proteozomla I-kappaB $\alpha$  parçalanır ve NF-kB'den ayrılır. Sonuçta ubiquitinasyon ve proteozomal parçalanma gerçekleşmiş olur. Daha sonra NF-kB proteini nükleusa doğru ilerler, burada spesifik DNA'ya

bağlanır ve sitokinler, kemokinler, matriks metaloproteinazları ve diğer inflamatuvar araçlarında içeren çoklu genlerin transkripsiyonunu başlatır (103, Şekil 10).



**Şekil 10: NF-κB sinyal ileti yolu (103)**

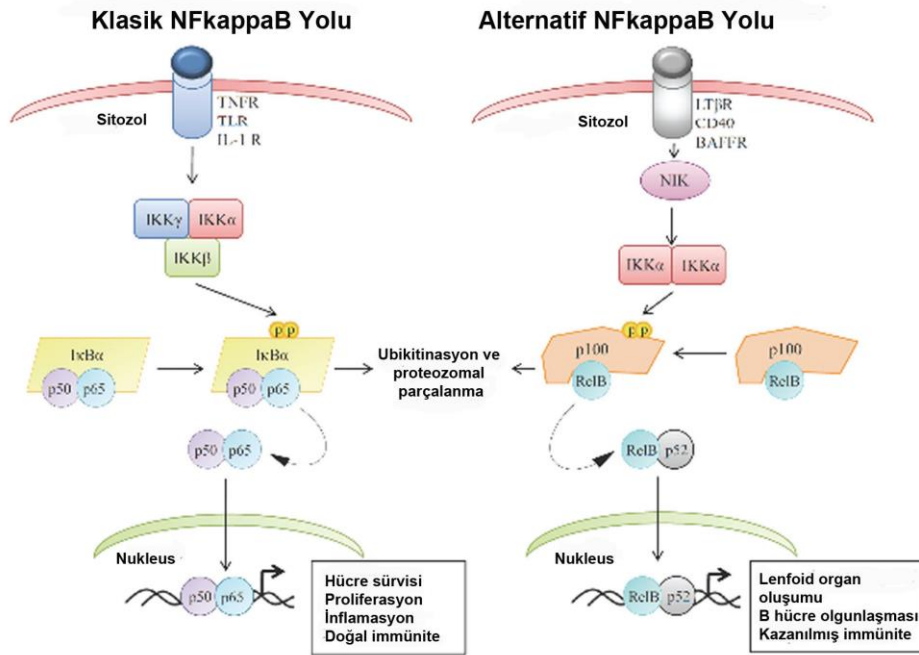
Nükleer faktör-kappa B aktivasyonu çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve tirozin kinazlar tarafından tetiklenen farklı sinyal yollarından kaynaklanabilir. Epidermal büyüme faktör reseptörü, insülin büyüme faktör reseptörü ve tümör nekroz faktör reseptörü aile üyelerinin gelişmiş ekspresyonu, NF-κB aktivasyonu için sorumlu olabilir. Ayrıca, Ras/MAPK ve P13K/Akt gibi diğer sinyal ileti yollarının aktivasyonu aynı zamanda NF-κB aktivasyonuna katılmaktadır (106).

Nükleer faktör-kappa B, immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinin yanı sıra karsinogenezde de önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre çoğalmasını uyarın, apoptozisi düzenleyen, anjiyogenezisi kolaylaştıran, invazyon ve metastazı uyarın çeşitli hedef genlerin ekspresyonuna neden olur (108,109). Ayrıca birçok kanser hücresi, kemoterapi ve radyoterapi direncine aracılık eden anormal veya yapıcı NF-κB aktivasyonunu gösterir. Bu nedenle NF-κB aktivasyon ve sinyal ileti yolunun engellenmesi potansiyel bir kanser tedavi stratejisi sunmaktadır. Ayrıca son zamanlardaki çalışmalar NF-κB'nin belirli ortamlarda tümör baskılayıcı bir rol oynayabildiğini göstermiştir (108).

Uyarana ve hücre tipine bağlı olarak NF-κB aktivasyonu iki farklı yolla teşvik edilir; klasik ve alternatif yollar. Her iki yolda da NF-κB aktivasyonu, ya katalitik kinazlar IKKα ve

IKK $\beta$  ve regülatör protein NEMO (IKK $\gamma$ ) tarafından veya IKK $\alpha$  homodimerleri tarafından oluşan IKK komplekslerinin aktivasyonuna aracılık eder. Klasik NF-kB yolu öncelikli olarak TNF reseptör aile üyeleri, Toll reseptör aile üyesi ve antijen reseptörleri gibi proinflamatuvar reseptörlerin uyarılması ile aktive edilir. Ayrıca bazı antikanser tedavilerde bu yolu etkinleştirir. Bu uyarılar I-kB $\alpha$  proteininin fosforilasyonunu ve daha sonra proteozomal parçalanmasını teşvik ederek IKK kompleksini aktive eder. Bu, hedef genlerin yükseltici bölgelere bağlanarak hücre yaşamı, proliferasyonu, inflamatuvar ve doğuştan gelen bağışıklığını kontrol altına alarak serbest NF-kB dimerlerinin nükleusa translokasyonunu sağlar (110, Şekil 11).

Alternatif NF-kB yolu LT $\beta$ R, CD40 ve BAFFR'nin de dahil olduğu ve lenfoid organların oluşumunda, B hücrelerinin olgunlaşmasında, adaptif bağışıklıkta önemli rol oynayan TNF reseptörlerinin uyarılmasıyla aktifleşir. Alternatif yolda NF-kB bağımlı kinazın (NIK) stabilizasyonu ve akümüasyonu IKK $\alpha$  homo dimerin aktivasyonunu tetikleyen önemli bir sinyaldir. Bunun aksine uyarıcı, alternatif NF-kB sinyal olaylarının negatif regülasyonunu teşvik eden NIK'ın proteozomal parçalanmasını indükler. Bu işlemden sonra NF-kB2/p100'ün (genellikle Rel B ile bağlantılı) fosforilasyonunu indükleyen IKK $\alpha$ , p52 oluşturmak için proteozom tarafından işlemi kendisi başlatır. Bu, hedef genin transkripsiyonunu düzenleyen nükleusun içine p52/RelB dimerlerinin translokasyonunu sağlar (110, Şekil 11).



Şekil 11: Klasik ve alternatif NF-kB sinyal ileti yolu (110)

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### **Etik Kurul Onayı**

Çalışmanın deneysel kısmı, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan onay alındıktan sonra (11.07.2013 tarih ve 2013.05.03 no'lu onay belgesi) (Ek-1) Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

### **Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması**

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilmiş ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 18 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Deney süresi boyunca tüm sıçanlar standart laboratuvar koşulları (22±1°C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip erkek sıçanlardan, ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde, üç grup oluşturuldu. Deneklerin gruplandırılması aşağıdaki şekilde düzenlendi;

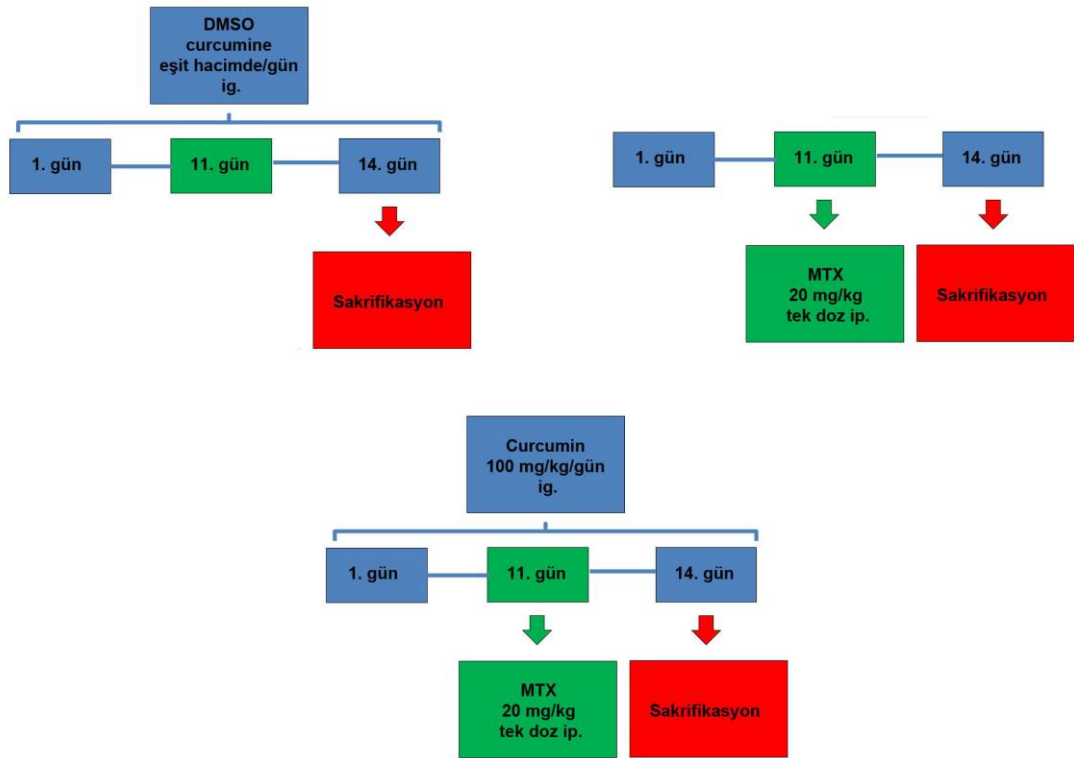
**Grup 1 (Kontrol):** Dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, Darmstadt, Almanya), intragastrik (ig.) yol ile 14 gün boyunca verildi (n=6).

**Grup 2 (Metotreksat):** Metotreksat (20 mg/kg, Koçak Farma, Tekirdağ, Türkiye), tek doz intraperitoneal (ip.) olarak 11. gün verildi (n=6).

**Grup 3 (Metotreksat+Curcumin):** Curcumin (100 mg/kg, DMSO içinde çözülerek) ig. yol ile 14 gün ve 11. gün metotreksat (20 mg/kg) tek doz ip. olarak verildi (n=6).

Curcumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD), içinde rahat çözündüğü ve stabilitesini koruduğu bir solüsyon olan DMSO içinde çözülerek hazırlandı.

Kontrol grubuna ig. yol ile 14 gün boyunca DMSO (CMN ile eşit hacimde); 2. gruba ip. olarak 11. gün tek doz MTX (20 mg/kg); 3. gruba, ig. yol ile 14 gün boyunca CMN (100 mg/kg, DMSO içinde çözülerek) ve ek olarak yine 3. gruba ip. olarak 11. günde tek doz MTX (20 mg/kg) verildi ve CMN son dozundan 24 saat sonra ksilazin (Basilazin-baVET/ Bösensel-Almanya)-ketamin (Ketasol-Richter Pharma ag/Wels-Avusturya) anestezisi altında deney sonlandırıldı (Şekil 12). Bütün grupların testis doku örnekleri alındı ve bu örnekler histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda rutin işlemlere tabi tutuldu.



**Şekil 12: Deney protokolü**

Yine sakrifikasyon öncesi hayvanlardan kardiak ponksiyon yoluyla kan örnekleri alınarak serumda total testosteron, Trakya Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda



kimyasal immunoassay (Chemiluminescence Immunassay-Architect i2000SR, Abbott, ABD) yöntemi ile çalışıldı.

Ayrıca deney başında ve sonunda tüm deneklerin vücut ağırlık ölçümü takibi ve deney sonunda da testis ağırlık ölçümü yapıldı. Deney sonunda sakrifikasyon öncesi ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için testis ağırlık indeksi (TAİ) belirlendi.

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

### **Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması**

Histolojik incelemeler için alınan testis dokuları, %10'luk tamponlu formol ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokular çeşme suyunda yıkanarak, yükselen alkol serilerinden geçirilmesi suretiyle dehidratasyon işlemi yapıldı. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck, Darmstadt, Almanya) ile muamele edilerek önce yumuşak parafine (Merck), sonrasında ise sert parafine (Merck) alındı ve parafin bloklar elde edildi. Bu parafin bloklardan Leica RM-2245 silindirik mikrotom kullanılarak alınan 5 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak Hematoksilen+Eozin (H+E) boyası uygulandı. Entellan (DPX Mounting Medium, Atom Scientific Ltd, Manchester, İngiltere) ile kapatılarak kalıcı preparat haline getirildikten sonra, ışık mikroskopunda (Olympus BX51 trinoküler mikroskop, DP20 dijital kamera ataçmanlı, Japonya) incelenerek değişik büyütmelerde fotoğraflandırıldı.

Hematoksilen+Eozin boya prosedürü için; %10'luk tamponlu formol ile fikse edilip parafine gömülen testis dokularından elde edilen 5  $\mu\text{m}$  kalınlığındaki kesitler, lam üzerine alınarak dikey cam şalelere dizildi ve 1 gün kurumaya bırakıldı. Kuruyan kesitler deparafinizasyon işlemi için toluole (Merck, Darmstadt, Almanya) alındı. Parafini giderilen kesitler, alçalan alkol serilerinden (100°, 100°, 96°, 90°, 70°) geçirilerek suya indirildi. Suya indirilen kesitler nükleus boyaması için hematoksilene alındı. Kesitler hematoksilin boyamasından sonra morartma işlemi için 10 dk çeşme suyu altında bekletildi. İkinci olarak sitoplazma boyası olan eozine alındı ve sitoplazmanın boyanması sağlandı. Yükselen alkol serilerinden (70°, 90°, 96°, 100°, 100°) geçirilerek suyu alındı ve 10 dk toluolde (Merck, Darmstadt, Almanya) bırakıldıktan sonra entellan (DPX Mounting Medium, Atom Scientific Ltd, Manchester, İngiltere) kullanılarak kesitlerin üzeri lamelle kapatıldı ve kurumaya bırakıldı. Böylece kalıcı preparatlar elde edilmiş oldu.

Hematoksilen+Eozin boyanmış preparatlarda, testislerde seminifer tübül çapı, seminifer epitel kalınlığı ve iki tübül arasında kalan interstisyel alan genişliği; Görüntüleme Analiz Sistemi (Versiyon 2.11.5.1, Kameram-Argenit, İstanbul, Türkiye) kullanılarak x100 ve x400 büyütmede ölçüldü. Bu ölçümler, her hayvana ait üç testis kesitinde yuvarlak ya da yuvarlağa yakın rastgele seçilen 10 tübül olmak üzere toplam 30 tübülün enine kesiti değerlendirilerek yapıldı (19,111).

Germinal seri hücre değişiklikleri, histolojik olarak, her hayvana ait 6 testis kesiti x100 büyütmede incelenerek aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi: Ayrılma (spermatozit hücre kitlesinin seminifer epitelden kopup ayrılması), dökülme (germ hücre kümesinin seminifer epitelden ayrılıp lümeneye dökülmesi) ve vakuolizasyon (seminifer tübül içerisinde boşluklar oluşması). Her parametre için normal ve hasarlı tübüllerin ortalama yüzdesi belirlendi. Ortalama yüzde, her örnek için histolojik olarak hasarlı (vakuolizasyon, ayrılma, dökülme) ya da normal yuvarlak tübül sayısının aynı sahadaki total yuvarlak tübüllere bölünmesiyle elde edildi ve sonuç 100 ile çarpıldı. Her kesit için üç saha değerlendirilerek bunların ortalaması alındı (112).

### **İmmünohistokimya**

İmmünohistokimyasal olarak; NF-kB ve p38 MAPK proteinlerinin immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için, yine parafin bloklardan 5 µm kalınlığındaki kesitler, pozitif şarjlı lamlara alındı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda immünohistokimyasal işlemler uygulandı.

İmmünohistokimya prosedürü için; %10'luk tamponlu formol ile fikse edilip, parafine gömülen testis dokularından alınan 5µm'lik kesitler, bir gece 56°C etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyon işlemini takiben suya indirildi. Antijen geri kazanımı için kesitler, 15 dakika 10 mM'lık sitrik asit tamponunda (pH 6) mikrodalgada kaynatıldı. Oda sıcaklığında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için 15 dk hidrojen peroksit (Thermo Scientific/Lab Vision, Fremont, CA, ABD) ile muamele edildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS-phosphate buffer saline) ile yıkandıktan sonra, özgün olmayan antijenleri bloklamak için bloklama solüsyonunda (Ultra V Block-Thermo Scientific/Lab Vision) 5 dk oda sıcaklığında nemli çember içerisinde bekletildi. Daha sonra yine aynı çember içerisinde kesitler, primer antikor olarak NF-kB/p65 antikor (poliklonal tavşan antikor 1:100 oranında dilüe edilerek, Thermo Scientific/Lab Vision) ile 1 saat oda sıcaklığında veya fosfo (f)-p38 MAPK antikor (monoklonal tavşan 1:50 oranında dilüe

edilerek, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, ABD) ile gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Negatif kontrol için ise, kesitlere primer antikor yerine PBS damlatıldı. Bunu takiben PBS ile 3 kez yıkamanın ardından biotinlenmiş sekonder antikor (Biotinlated Goat Anti-Polyvalent, Thermo Scientific/Lab Vision) ile oda sıcaklığında 10 dk muamele edildi. Yine 3 kez PBS ile yıkama sonrasında, streptavidin peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific/Lab Vision) 10 dk uygulanarak kromojen olarak 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Thermo Scientific/Lab Vision) kullanıldı. Distile suda 5 dk yıkanan kesitlere daha sonra hematoksilin zıt boyama yapıldı. Tekrar sudan geçirilen kesitler su bazlı uygun kapatma solüsyonu (Vision Mount, Thermo Scientific/Lab Vision) ile kapatıldı (23,113,114).

Yapılan immünohistokimyasal işlemler sonucunda NF-kB immünoreaktivitesi, histolojik skorlama yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirmeler her bir hayvana ait preparatta testis kesitinde rastgele 5 alan seçilerek x400 büyütme kullanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX-51, Japonya) yapıldı. Skorlama, kesitlerde immünoreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi ( $P_i$ ) ve boyanma derecesi ( $i$ ) dikkate alınarak gerçekleştirildi. Boyanma derecesi 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Ortalama histolojik skor (H SCORE) her bir hayvana ait kesit için  $H SCORE = \sum i \times P_i$  formülü ile hesaplandı (114).

Fosfo-p38 MAPK immünopozitif boyanma indeksi için ise, x400 büyütmede her hayvana ait testis kesitinde 10 seminifer tübül rastgele seçilerek ışık mikroskopunda (Olympus BX-51, Japonya) değerlendirmesi yapıldı. Nükleusu kırmızı boyanan hücreler pozitif olarak değerlendirildi. Boyanan ve boyanmayan hücreler sayılarak her bir seminifer tübül için f-p38 MAPK indeksi, boyanan hücrelerin total hücrelere oranı alınıp 100 ile çarpılmasıyla (% olarak) hesaplandı. Daha sonra tübüllerin indekslerinin ortalamaları alınarak her bir hayvan için ortalama f-p38 MAPK indeksi belirlendi (115,116).

Mikroskopta yapılan tüm semikantitatif değerlendirmeler, birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından yapılarak ortalamaları alındı.

### **İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda SPSS 20.0 paket programı (Lisans no: 10240642) kullanılmış, değerler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak alınmıştır.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Deneklere ait verilerin normal dağılıma uygunluğu tek örneklem

üzerinden Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendikten sonra değerlerin normal dağılım göstermesi üzerine parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi (Tek Yönlü ANOVA) yapıldı. Gruplar arası farkı saptamada grup varyanslarının homojenliğine göre Tukey ya da Tamhane çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Deneklerdeki ağırlık değişimini belirlemek için, nonparametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı, gruplar arası farkı saptamak için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi yapıldı.

## BULGULAR

Ondört gün süren çalışmanın tamamlanmasıyla, kontrol, MTX ve MTX+CMN gruplarına ait deneklerden elde edilen kan örneklerinden serum testosteron değerleri ölçülerek karşılaştırması yapıldı. Yine deney sonunda alınan testis doku örnekleri, histolojik ve immünohistokimyasal düzeyde karşılaştırılarak incelendi. Ek olarak, denek ağırlıkları deney başında ve sonunda ölçülerek ağırlık değişimi, testis ağırlıkları da deney sonunda ölçülerek testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı hesaplandı.

Gözlemlerimiz;

**Grup 1 (Kontrol, n=6):** 14 gün boyunca ig. yol ile DMSO verilen grup,

**Grup 2 (Metotreksat, n=6):** 11. gün ip. olarak tek doz MTX (20 mg/kg) verilen grup,

**Grup 3 (Metotreksat+Curcumin, n=6):** 14 gün boyunca ig. yol ile CMN (100 mg/kg, DMSO içinde çözülerek) ve 11. gün ip. olarak tek doz MTX (20 mg/kg) verilen grup bulguları olarak değerlendirildi.

## HAYVAN AĞIRLIK BULGULARI

Deneyin başında ve sonunda deneklerin vücut ağırlıkları ölçülmesi sonucunda, kontrol grubundaki deneklere kıyasla MTX verilen deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlenirken ( $P<0.05$ , Tablo 1) sağ ve sol testislerin ağırlıklarında ve testis ağırlığı/vücut

ağırlığı oranında bir değişim gözlenmedi ( $P>0.05$ ). MTX+CMN grubunda ise MTX grubu ile karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarındaki düşüşte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü (Tablo 1).

**Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlıkları (VA) değişimi, testis ağırlıkları, testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranları ( $TAİ=TA/VA \times 100$ ) ve serum testosteron değerlerinin karşılaştırılması**

Parametre	Kontrol (n=6)	Metotreksat (n=6)	Metotreksat+Curcumin (n=6)
VA değişimi (g)	13.17±5.00	-21.50±6.16*	-9.33±4.18*,†
Testis ağırlığı (sağ)	1.26±0.07	1.26±0.06	1.25±0.10
Testis ağırlığı (sol)	1.26±0.07	1.27±0.06	1.27±0.09
Testis ağırlığı (TA) toplam	2.52±0.14	2.53±0.12	2.52±0.19
TAİ=TA/VAx100	0.97±0.04	0.94±0.06	0.94±0.03
Serum testosteron (ng/ml)	1.97±0.27	0.25±0.11**	0.80±0.14**,††

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

\* $P<0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $P<0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında

† $P<0.05$  metotreksat ile karşılaştırıldığında

†† $P<0.001$  metotreksat ile karşılaştırıldığında

## SERUM TESTOSTERON DÜZEYİ BULGULARI

Deney sonunda tüm deneklerden kardiyak fonksiyon sonucunda elde edilen kan örneklerinden serum testosteron değerleri ölçülmüştür. Kontrol grubu ile MTX grubu karşılaştırıldığında serum testosteron değerlerinin anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. CMN verilerek tedavi edilen grupta ise serum testosteron değerlerinin MTX grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.001$ , Tablo 1).

## MORFOMETRİK BULGULAR

Deney sonunda tüm gruplardaki deneklerden elde edilen testis dokularından H+E ile boyanmış, her hayvana ait preparatlarda seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı ve interstisyel alan ölçülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTX grubunda seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığının anlamlı olarak azaldığı, interstisyel alan genişliğinin ise anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir ( $P<0.001$ , Tablo 2). CMN verilmesiyle, MTX grubuna göre seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığının anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlenirken ( $P<0.05$ , Tablo 2), interstisyel alan genişliğinin ise anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir ( $P<0.001$ , Tablo 2).

**Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarının seminifer tübül çapı, seminifer epitel kalınlığı ve interstisyel alan genişliğinin karşılaştırılması**

Parametre	Kontrol (n=6)	Metotreksat (n=6)	Metotreksat+Curcumin (n=6)
Seminifer tübül çapı ( $\mu\text{m}$ )	280.20±6.91	250.65±5.55**	267.67±3.01*,†
Seminifer tübül epitel kalınlığı ( $\mu\text{m}$ )	63.23±0.84	48.80±1.26**	58.27±2.33*,†
İnterstisyel alan genişliği ( $\mu\text{m}$ )	22.16±1.80	39.53±2.20**	30.22±1.60**,†

Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

\* $P<0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $P<0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında

† $P<0.001$  metotreksat ile karşılaştırıldığında

## MORFOLOJİK BULGULAR

### Histolojik Bulgular

**Kontrol grubuna ait bulgular:** Kontrol grubu deneklerinden alınan ve H+E ile boyanan testis doku kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, dışta bağ dokudan yapılmış tunika albuginea ile kuşatılmış, düzgün sınırlı ve çok katlı bir epitel tabakası ile döşeli

seminifer túbüller, normal görünümünü idi (Şekil 13). Túbül çapları ve epitel kalınlıkları değerlendirildiğinde sırasıyla ortalama 280.20 µm ve 63.23 µm olduğu belirlendi (Tablo 2). Seminifer túbül epitelini meydana getiren iki tip hücreden proliferen olan spermatogenetik seri hücreleri ve proliferen olmayan destekleyici Sertoli hücrelerinin düzenli dizildikleri gözlemlendi (Şekil 13-16). Bu túbüllerin duvarlarında bazal lamina üzerine yerleşen, oval nükleuslara sahip spermatogoniumlar ve Sertoli hücreleri yer almaktaydı. Primer spermatositlerler çoğunlukla büyük yuvarlak nükleusa ve ayırt edici kromatin yapısına sahip olarak spermatogoniumların hemen üzerinde bulunmaktaydı. Daha küçük olan sekonder spermatositlere ise primer spermatositlerin üzerinde nadir olarak rastlandı. Spermatidler, bir ya da iki tabaka halinde lümene yakın yerleşen hücreler olarak izlenmekteydi. Bu hücreler, yuvarlak hücrelerden oluşmuş erken ve lümene uzanan kuyruklarıyla belirgin olan geç spermatidler olarak ayırt edildi. Çoğu semifer túbüllerin lümeninde spermiyumlara rastlandı. Her bir semifer túbülde bazal laminanın dış kısmında túbülün yavaş peristaltik hareketinden sorumlu myoid hücreler izlendi. Komşu túbüller arasında kalan interstisyel sahada kümeler halinde yer alan, poligonal şekilli, küçük yuvarlak nükleusları ve eozinofilik boyanan sitoplazmaları ile Leydig hücreleri normal histolojik yapıda gözlemlendi (Şekil 15,16). Ek olarak, interstisyel alan genişliği ölçüldüğünde ortalama ve 22.16 µm olduğu belirlendi (Tablo 2).

**Metotreksat grubuna ait bulgular:** MTX (20 mg/kg ip tek doz) verilen deneklerden alınan ve H+E ile boyanan testis doku kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, semifer túbül çapları ve epitel kalınlığında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $P<0.001$ , Tablo 2). Epitel kalınlığında azalma, daha çok olgunlaşmasını tamamlamayan hücrelerin döküldüğü semifer túbüllerde gözlemlendi. Ayrıca, semifer túbüllerde Sertoli hücreleri arasında yer alan germinal seri hücre kayıpları ile düzeninde (organizasyonunda) bozulma ve túbüllerde yer yer vakuolizasyon görüldü. Hasarlanmış çoğu túbülde primer spermatositlerden itibaren ayrılmalara veya lümeninde olgunlaşma sürecini tamamlamamış dökülmüş hücrelere rastlandı. Bazı semifer túbüllerin bazal laminalarında ondülasyonlar değişik şiddette izlenirken bazılarında germinal seri hücreleri ile arasında boşlukların oluştuğu gözlemlendi. Sertoli hücreleri yapısında bir değişiklik gözlenmedi. İnterstisyel alanda yer yer ödem ve düzensizlikle birlikte hücre kayıpları olduğu görüldü (Şekil 17-21). Ek olarak, interstisyel alan genişliğinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptandı ( $P<0.001$ , Tablo 2). Bu alanlarda inflamatuvar hücre artışına rastlanmadı.

**Metotreksat+Curcumin grubuna ait bulgular:** 14 gün boyunca CMN (100 mg/kg) ve 11. gün tek doz MTX (20 mg/kg) verilen deneklerden elde edilen, H+E ile boyanan testis



doku kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, seminifer tübül çap ve epitel kalınlıklarında MTX grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak bir artış meydana geldiği ( $P<0.001$ ; Tablo 2) belirlendi. MTX verilen grupta saptanan, seminifer tübül epitelinde organizasyon bozukluğu, vakuolizasyon, lümeninde dökülmüş hücrelerin bulunması gibi bulguların belirgin oranda azaldığı gözlemlendi. İnterstisyel alanda düzensizlik ve hücre kayıplarının MTX grubuna göre azaldığı, ödemin de gerilediği görüldü. İnterstisyel alan genişliğinde de anlamlı azalma tespit edildi ( $P<0.001$ , Tablo 2, Şekil 22-25).

Tüm gruplara ait açıklanan seminifer tübül histolojik yapı değişikliklerinin belirlendiği skor sonuçları Tablo 3'te özetlenmiştir.

**Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarında seminifer tübüllerin histolojik yapı değişikliklerinin karşılaştırılması**

Seminifer tübül yüzdesi	Kontrol (n=6)	Metotreksat (n=6)	Metotreksat+Curcumin (n=6)
Normal	95.01±1.04	31.08±6.17**	67.14±4.83**,††
Ayrılan	3.03±0.87	27.84±4.13**	14.26±1.82**,†
Dökülen	0.80±0.32	25.28±6.24*	11.17±1.89**,†
Vakuolize	1.16±0.51	22.23±3.66**	10.18±1.93**,††

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

\* $P<0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $P<0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında

† $P<0.05$  metotreksat ile karşılaştırıldığında

†† $P<0.001$  metotreksat ile karşılaştırıldığında

### İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait testis dokularında uygulanan NF-kB immünoaktivitesi ve f-p38 indeksi sırasıyla H SCORE ve seminifer tübülde f-p38 pozitif hücre sayısı (%) değerlendirilerek Tablo 4'te özetlenmiştir.

**NF-kB immünoaktivite bulguları:** Testis seminifer tübül kesitlerinde NF-kB immünoaktivitesi AEC kromojen ile kırmızı renkte sitoplazmik boyanma karakteri gösterdi. Kontrol grubu testis seminifer tübül kesitlerinde, primer spermatositlerde çoğunlukla zayıf şiddette, spermatidlerde çok zayıf şiddette boyanma izlenirken spermatogoniumlar ve Sertoli

hücrelerinde ise boyanma gözlenmedi. Benzer şekilde interstisyel alanda Leydig hücrelerinde de boyanma gözlenmedi (Şekil 26,27). MTX grubu seminifer tübül kesiti incelendiğinde, özellikle primer spermatositlerde güçlü ve spermatidlerde orta-güçlü şiddette boyanma gözlenirken spermatogoniumlarda boyanma çoğunlukla zayıf veya orta şiddetteydi. Sertoli hücrelerinin yer yer zayıf ve Leydig hücrelerinin de zayıf-orta şiddette immünoreaktivite gösterdiği izlendi. NF-kB immünoreaktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü ( $P<0.001$ , Şekil 28-30). MTX+CMN grubu seminifer tübül kesiti incelendiğinde ise, NF-kB immünoreaktivitesi MTX grubu ile karşılaştırıldığında belirgin oranda ( $P<0.001$ ) azalmıştı. Boyanma, primer spermatositlerde orta derecede devam etmekteyken spermatid ve spermatogoniumlarda çoğunlukla zayıf şiddette gözlemlendi. Leydig hücrelerinde zayıf şiddette boyanmaya rastlanırken, Sertoli hücrelerinde boyanma gözlenmedi (Tablo 4, Şekil 31-33). Negatif kontrolde de herhangi bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 34).

**f-p38 MAPK immünopozitif boyanma bulguları:** Testis seminifer tübül kesitlerinde f-p38 MAPK immünopozitif boyanma, AEC kromojen ile kırmızı renkte nükleer boyanma karakteri gösterdi. Kontrol grubu testis seminifer tübül kesitlerinde boyanma zayıf şiddette bazı seminifer tübüllerde spermatogonium ve Sertoli hücrelerinde gözlenirken, çoğu tübülde ise, primer spermatositlerde izlendi (Şekil 35). MTX grubu seminifer tübül kesiti incelendiğinde, benzer boyanma paterni güçlü şiddette görülürken immünopozitif hücre sayısı anlamlı olarak artmıştı ( $P<0.001$ , Şekil 36). MTX+CMN grubunda da, artmış olan f-p38 MAPK immünopozitif hücre sayısında anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ( $P<0.001$ , Tablo 4, Şekil 37). Negatif kontrolde de herhangi bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 38).

**Tablo 4. Kontrol ve deney gruplarının NF-kB immünoreaktivitesi ve f-p38 MAPK indeksinin karşılaştırılması**

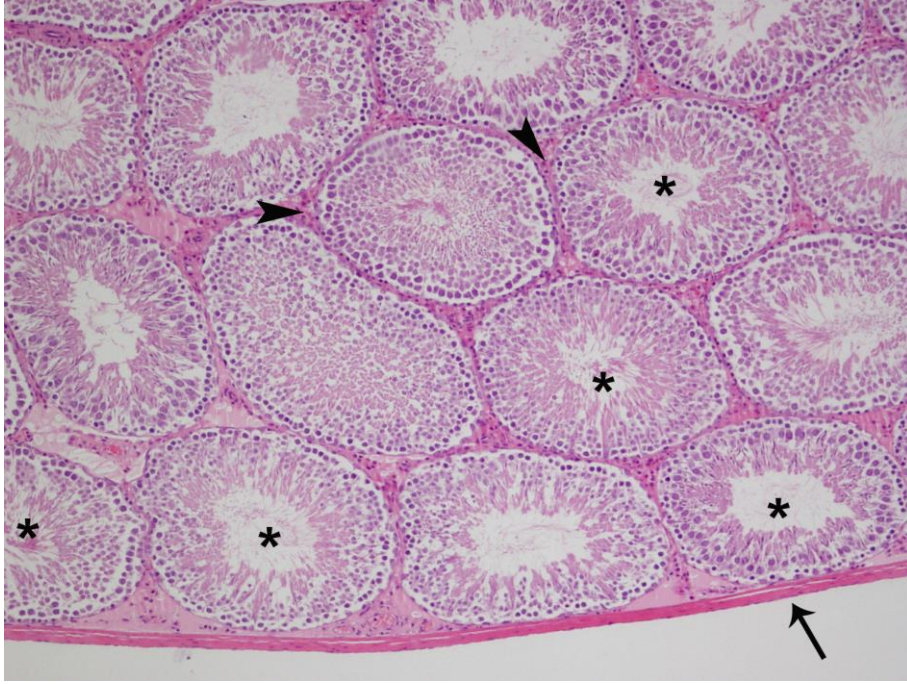
Parametre	Kontrol (n=6)	Metotreksat (n=6)	Metotreksat+Curcumin (n=6)
NF-kB	86.67±13.66	237.50±18.37**	150.00±17.89**,*†
f-p38 MAPK indeksi (%)	3.24±1.11	12.55±2.40**	7.39±1.35*†

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

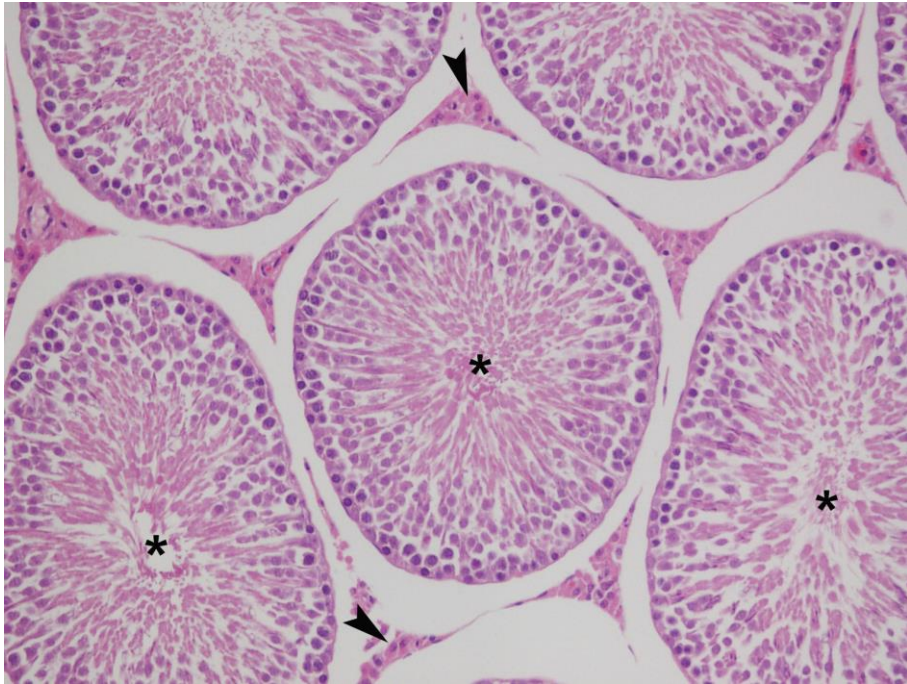
\* $P<0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $P<0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında

† $P<0.001$  metotreksat ile karşılaştırıldığında



Şekil 13. Kontrol grubuna ait testis kesitinde normal yapıda tunika albuginea (ok), spermatogenezin farklı aşamalarında olan seminifer tübüller (yıldız) ve interstisyel saha (ok başı) gözlenmektedir. H+E, x100.



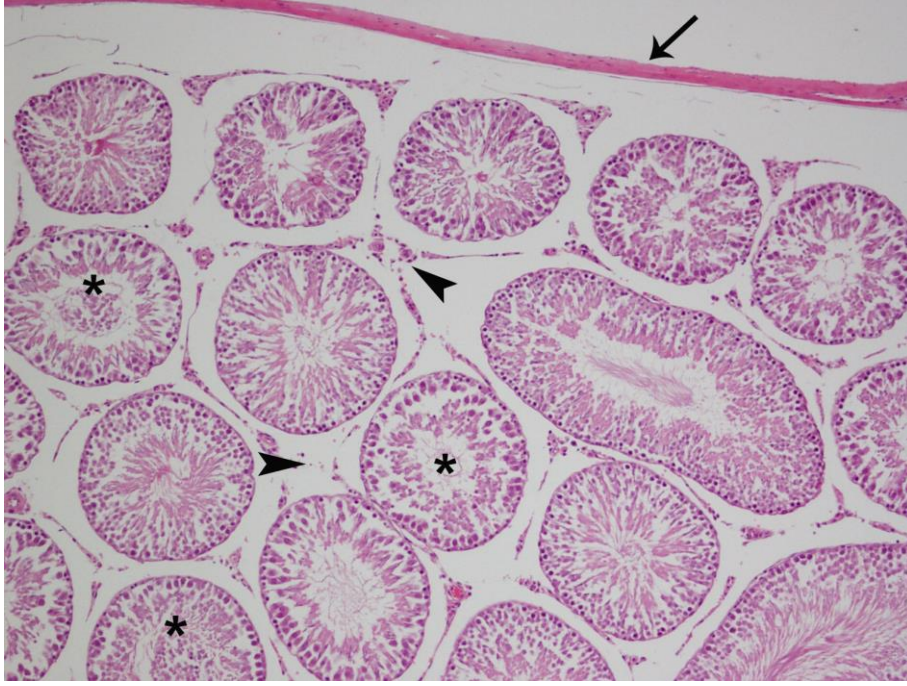
Şekil 14. Kontrol grubuna ait testis kesitinde spermatogenezin aktif olduğu, düzgün sınırlara sahip, normal yapıda seminifer tübüller (yıldız) ve aralarında yer alan interstisyel alan (ok başı) izlenmektedir. H+E, x200.



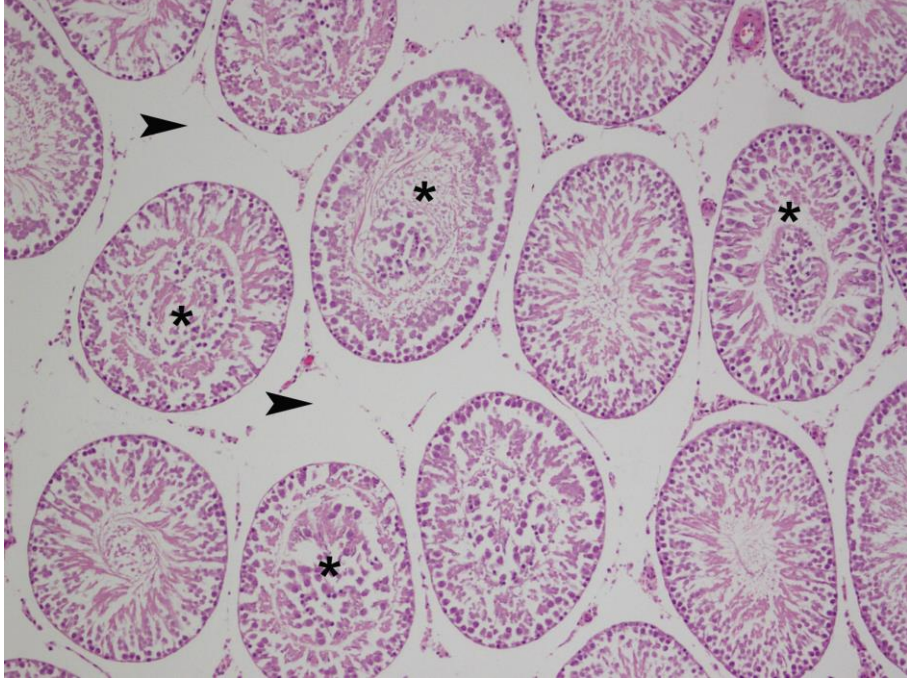
Şekil 15. Kontrol grubuna ait testis kesitinde spermatogenezin aktif olduğu, düzenli yerleşime sahip germinal seri hücreleri (GSH) ile Sertoli hücrelerinin (SH) yer aldığı normal yapıda bir seminifer tübül (yıldız) ve interstisyel alanın bir kısmı (ok başı) görülmektedir. Tübüllerin etrafında myoid hücreler (My) iğ şeklindeki nükleusları ile dikkati çekmektedir. H+E, x400.



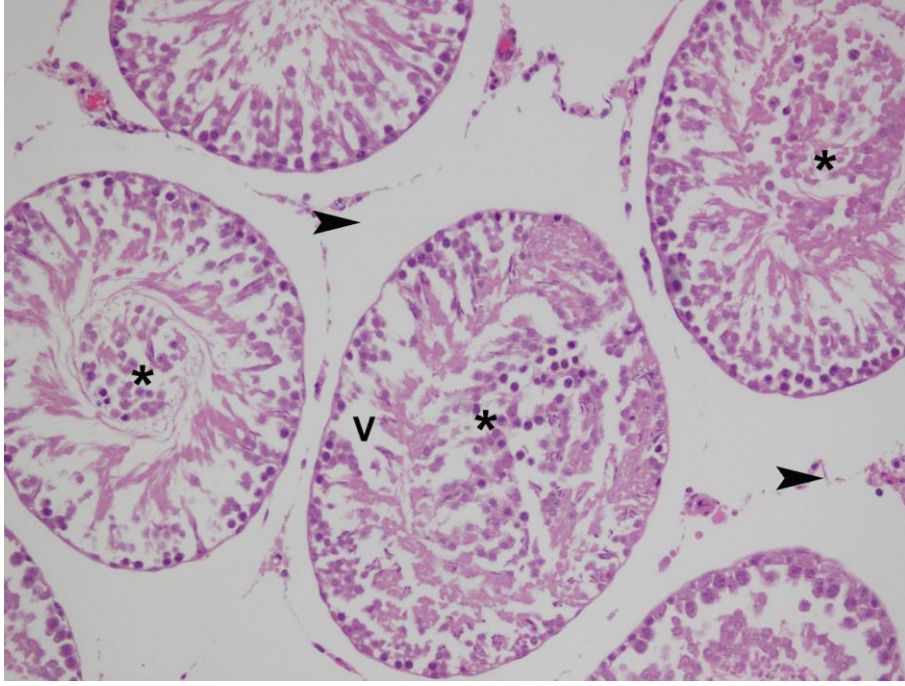
Şekil 16. Kontrol grubuna ait testis kesitinde normal yapıda seminifer tübüllerde primer spermatositler (PS) belirgin bir şekilde gözlenirken, tübüllerden birinde primer spermatositlerin bölünme aşamasında (ok) olduğu dikkati çekmektedir ve interstisyel alanda Leydig hücreleri (ok başı) görülmektedir. H+E, x400.



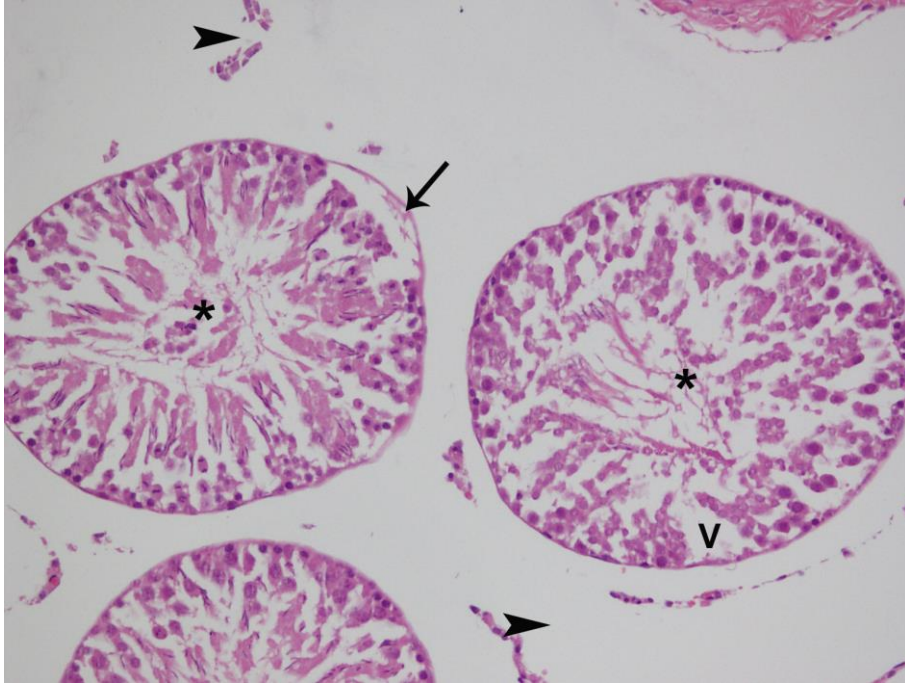
Şekil 17. Metotreksat grubuna ait testis kesitinde yapısı değişmemiş tunika albuginea (ok), çapları küçülmüş, hasarlanmış seminifer tübüller (yıldız) ve aralarında genişlemiş interstisyel saha (ok başı) dikkati çekmektedir. H+E, x100.



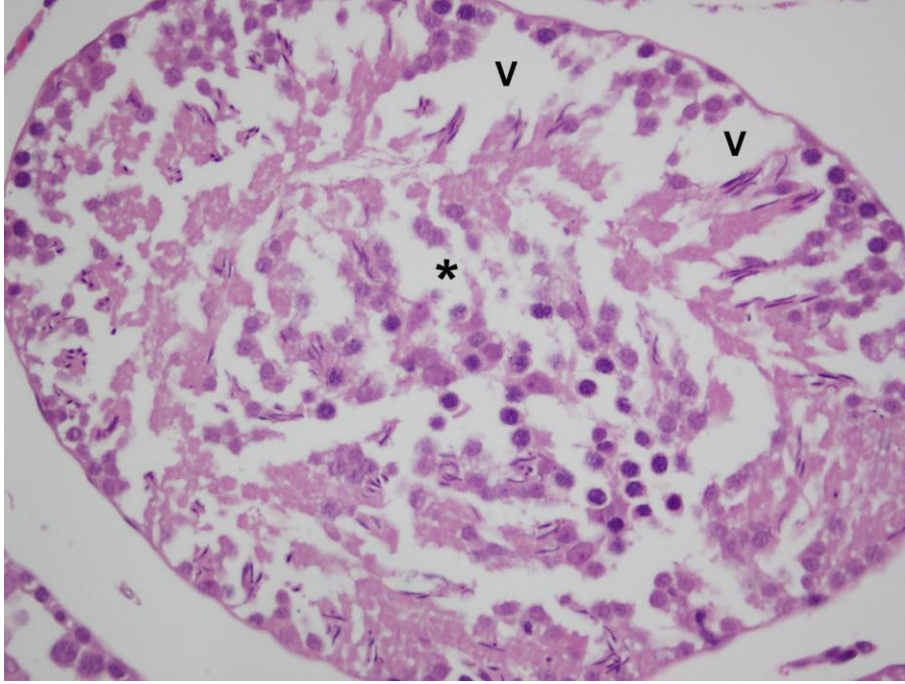
Şekil 18. Metotreksat grubuna ait testis kesitinde germinal seri hücreleri arasında vakuolizasyon veya ayrılmanın meydana geldiği seminifer tübüllerin lümenlerinde dökülmüş immatür hücrelerin bulunduğu (yıldız) göze çarpmaktadır. Ek olarak, interstisyel alanda genişleme (ok başı) görülmektedir. H+E, x100.



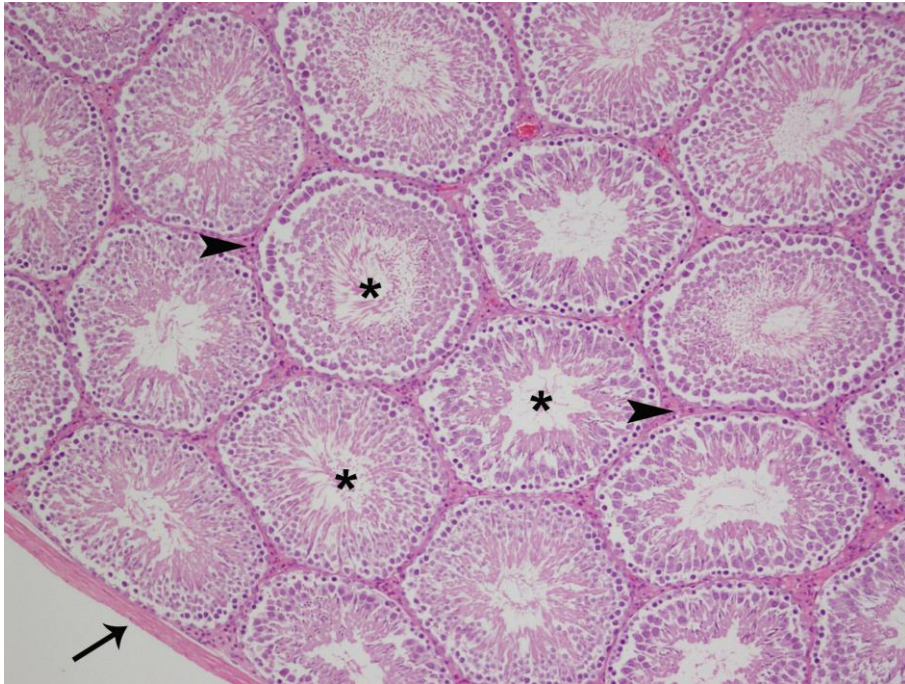
Şekil 19. Metotreksat grubuna ait testis kesitinde germinal seri hücrelerinin disorganize bir şekilde yerleştiği ve hücreler arasında vakuolizasyon (V) ile lümenlerinde dökülmüş immatür hücrelerin bulunduğu (yıldız) seminifer tübüller yer almaktadır. Ek olarak, interstisyel alanda genişleme (ok başı) ve düzensizlik ile hücre kayıpları görülmektedir. H+E, x200.



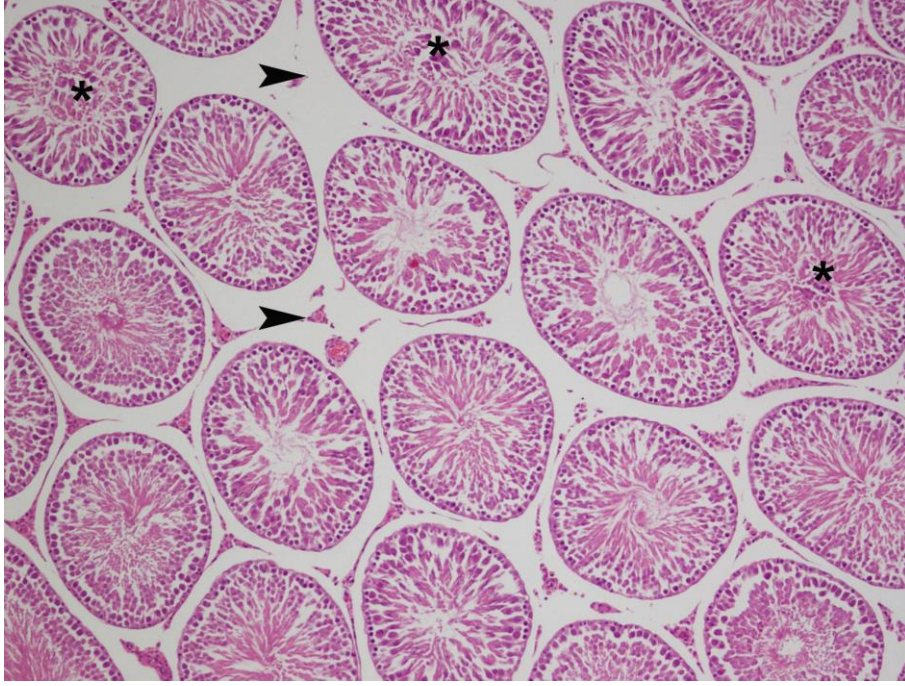
Şekil 20. Metotreksat grubuna ait testis kesitinde germinal seri hücrelerinin disorganize bir şekilde yerleştiği ve hücreler arasında vakuolizasyon (V) ile lümenlerinde dökülmüş immatür hücrelerin bulunduğu (yıldız) seminifer tübüller yer almaktadır. Tübüllerden birinde bazal laminada ayrılma (ok) dikkati çekmektedir. Ek olarak, interstisyel alanda genişleme (ok başı) ve düzensizlik ile hücre kayıpları görülmektedir. H+E, x200.



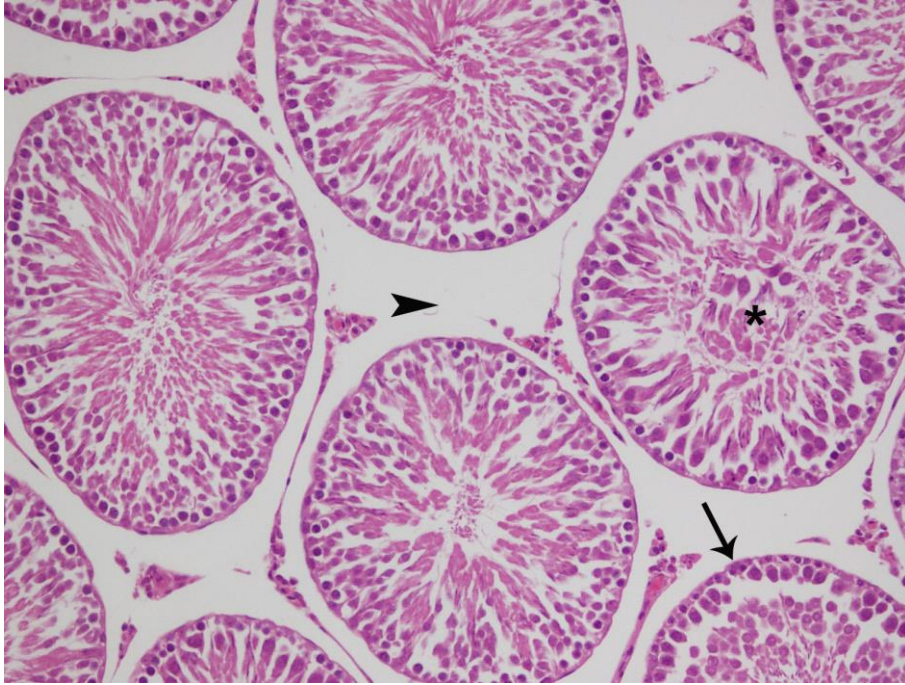
Şekil 21. Metotreksat grubuna ait seminifer tübülden geçen kesitte germinal seri hücrelerinin disorganize bir şekilde yerleştiği ve hücreler arasında vakuolizasyon (V) ile lümeninde dökülmüş immatür hücrelerin bulunduğu (yıldız) gözlenmektedir. H+E, x400.



Şekil 22. Metotreksat+Curcumin grubuna ait testis kesitinde normal yapıda tunika albuginea (ok) ile normal ya da normale yakın seminifer tübüller (yıldız) ve interstisyel saha (ok başı) gözlenmektedir. H+E, x100.

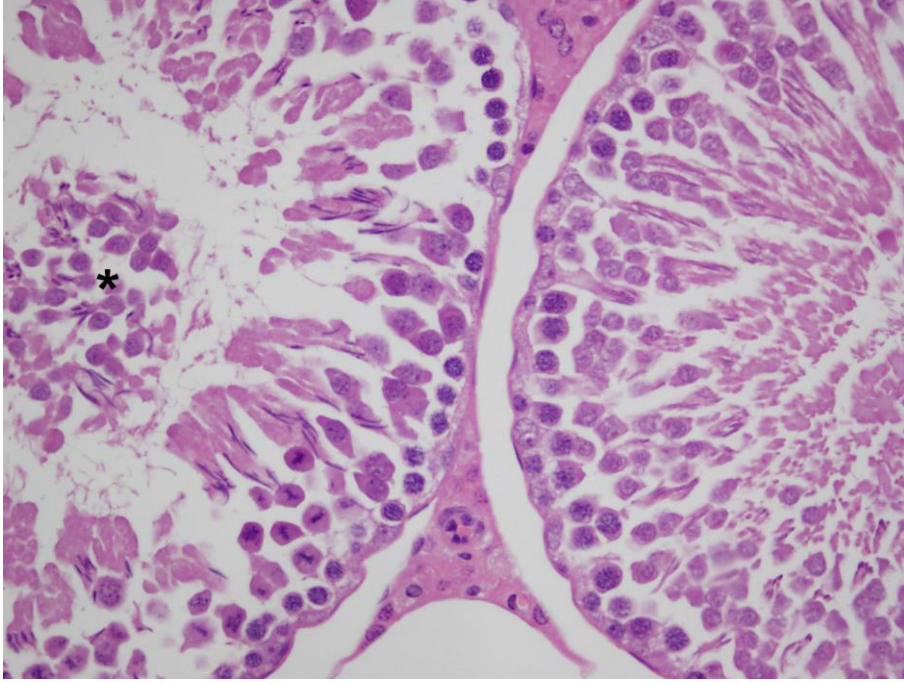


**Şekil 23.** Metotreksat+Curcumin grubuna ait testis kesitinde normal seminifer tübüller yanında lümeneye dökülmüş immatür hücrelerin yer aldığı ve ayrılmanın meydana geldiği seminifer tübüller (yıldız) de az sayıda göze çarpmaktadır. İnterstisyel sahada genişlemeler (ok başı) azalmış olarak gözlenmektedir. H+E, x100.

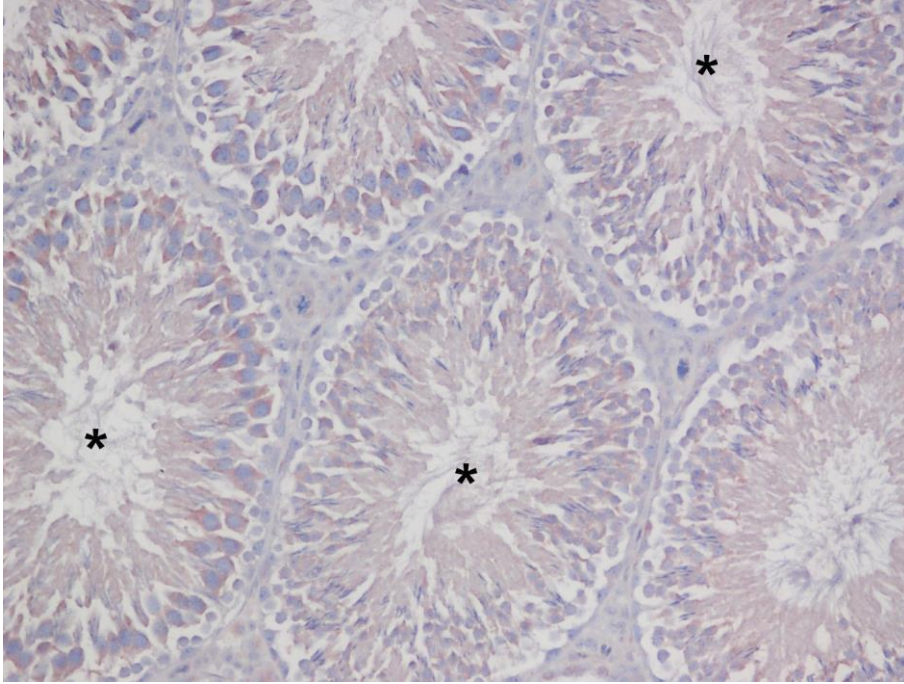


**Şekil 24.** Metotreksat+Curcumin grubuna ait testis kesitinde normal ve spermatogenezin aktif olduğu seminifer tübüller yanında lümeneye dökülmüş immatür hücrelerin yer aldığı bir (yıldız) ve ayrılmanın meydana geldiği bir seminifer tübül (ok) görülmektedir. İnterstisyel sahada genişleme (ok başı) azalmış olarak gözlenmektedir. H+E, x200.

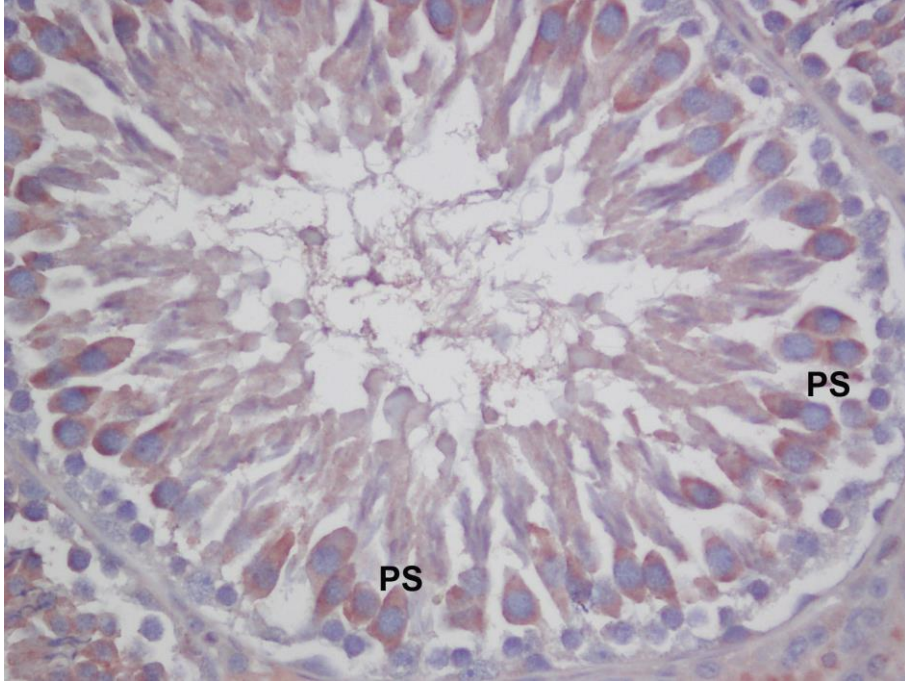




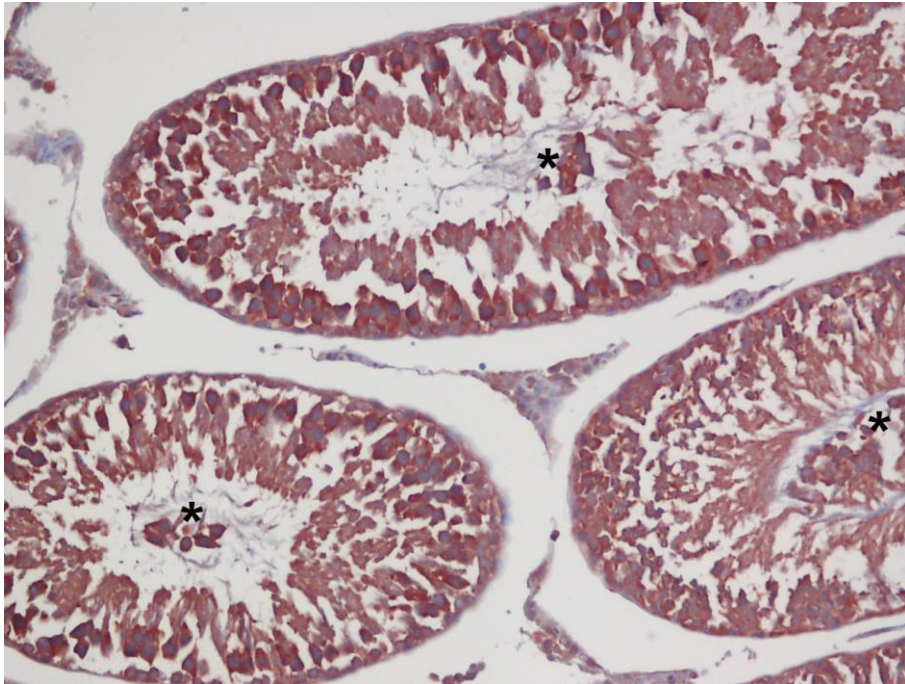
Şekil 25. Metotreksat+Curcumin grubuna ait iki seminifer tübülden geçen kesitte birinin lümeninde dökülmüş immatür hücrelerin bulunduğu (yıldız) ve diğerinde ise spermatogenezin aktif olduğu görülmektedir. H+E, x400.



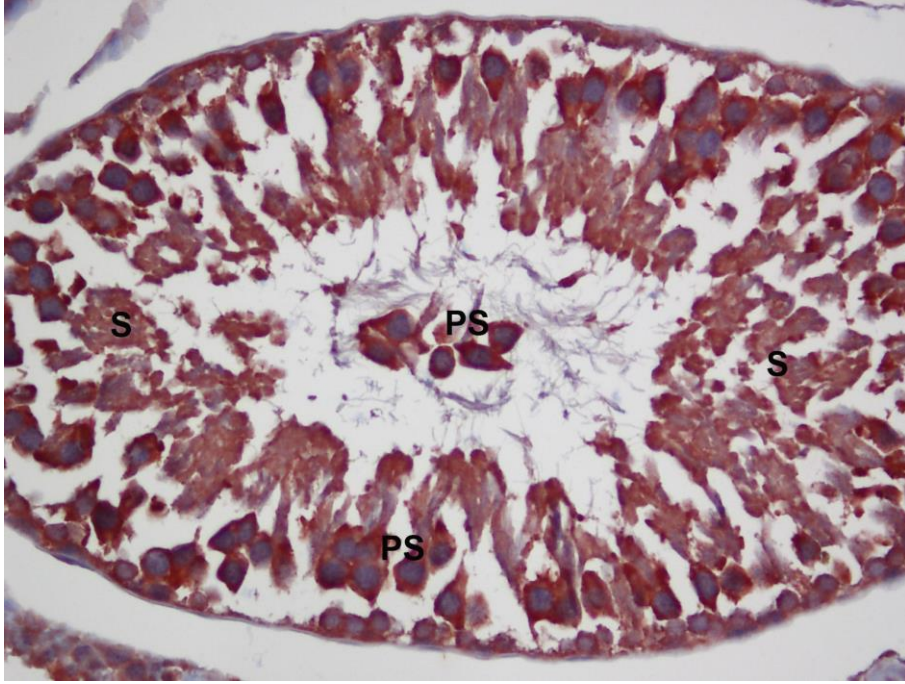
Şekil 26. Kontrol grubuna ait testis kesitinde zayıf immünoreaktivite gösteren primer spermatositler ve spermatidlerin bulunduğu seminifer tübüller (yıldız) gözlenmektedir. NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, x200.



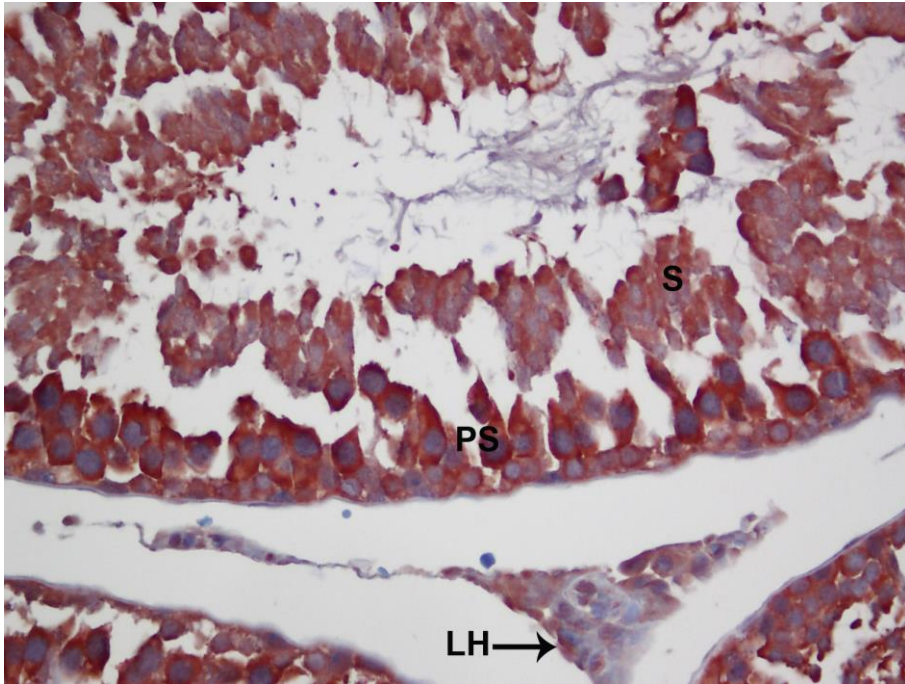
Şekil 27. Kontrol grubuna ait seminifer tübülde zayıf immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (PS) belirgin bir şekilde gözlenmektedir. NF-kB, hematoxilen zıt boyaması, x400.



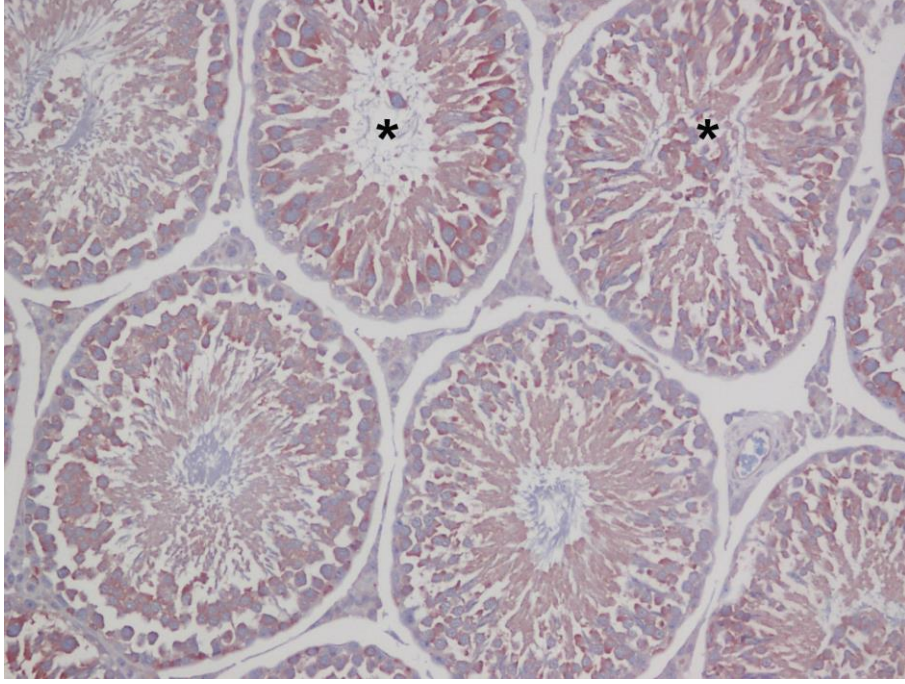
Şekil 28. Metotrexat grubuna ait olgunlaşmamış hücrelerin lümene döküldüğü üç seminifer tübülde (yıldız) güçlü immünoreaktivite gösteren primer spermatositler ve spermatidler gözlenmektedir. NF-kB, hematoxilen zıt boyaması, x200.



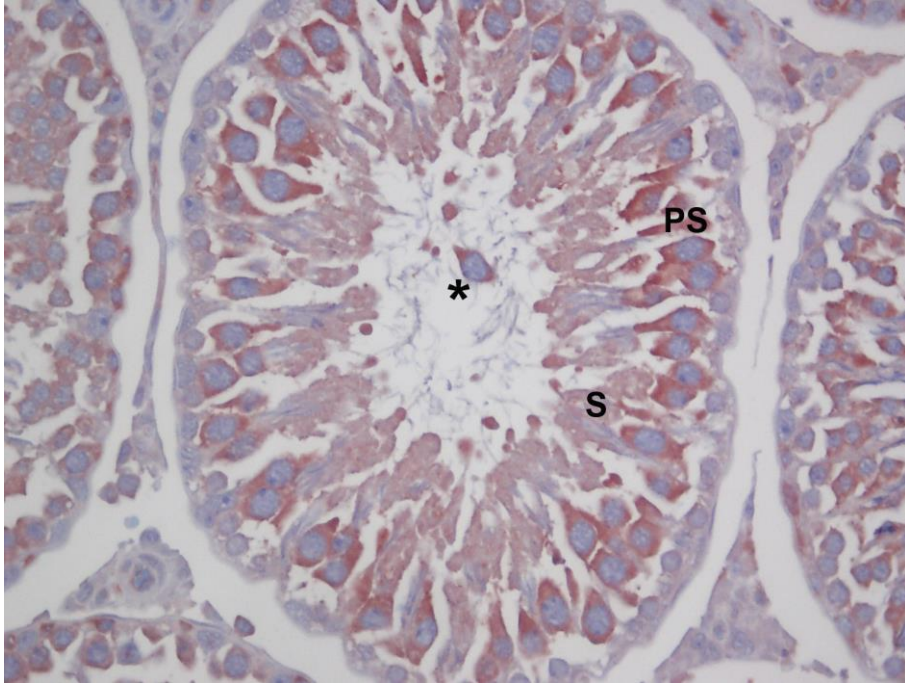
Şekil 29. Şekil 28’de yer alan seminifer tübüllerden biri büyük büyütmede incelendiğinde, güçlü immünoreaktivite gösteren primer spermatozitler (PS) ve spermatozidler (S) gözlenmektedir. NF-kB, hematozilen zıt boyaması, x400.



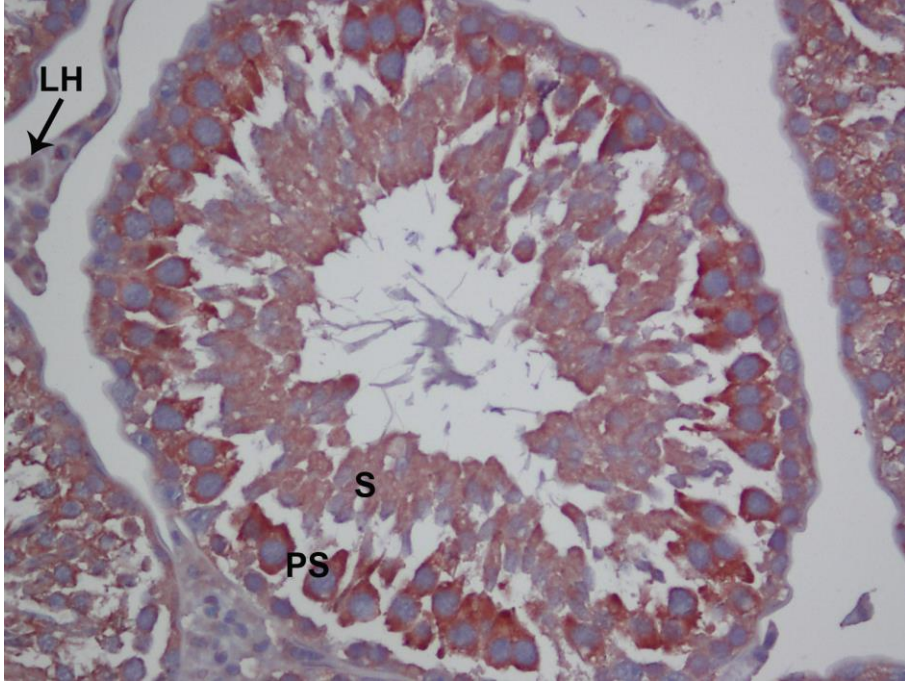
Şekil 30. Metotreksat grubuna ait seminifer tübülde güçlü immünoreaktivite gösteren primer spermatozitler (PS) ve spermatozidler (S) ile orta derecede immünoreaktivite gösteren Leydig hücresi (LH) gözlenmektedir. NF-kB, hematozilen zıt boyaması, x400.



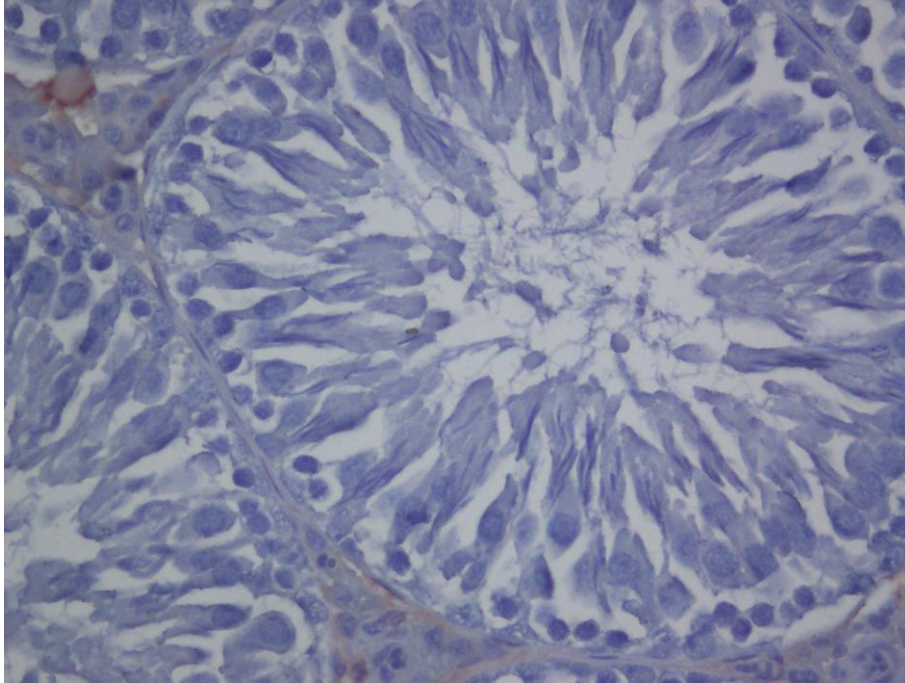
**Şekil 31. Metotreksat+Curcumin grubuna ait testis kesitinde lümenine olgunlaşmamış hücrelerin döküldüğü seminifer tübüllerde (yıldız) orta derecede immünoaktivite gösteren primer spermatositler ve zayıf derecede immünoaktivite gösteren spermatidler gözlenmektedir. NF-kB, hematoxilen zıt boyaması, x200.**



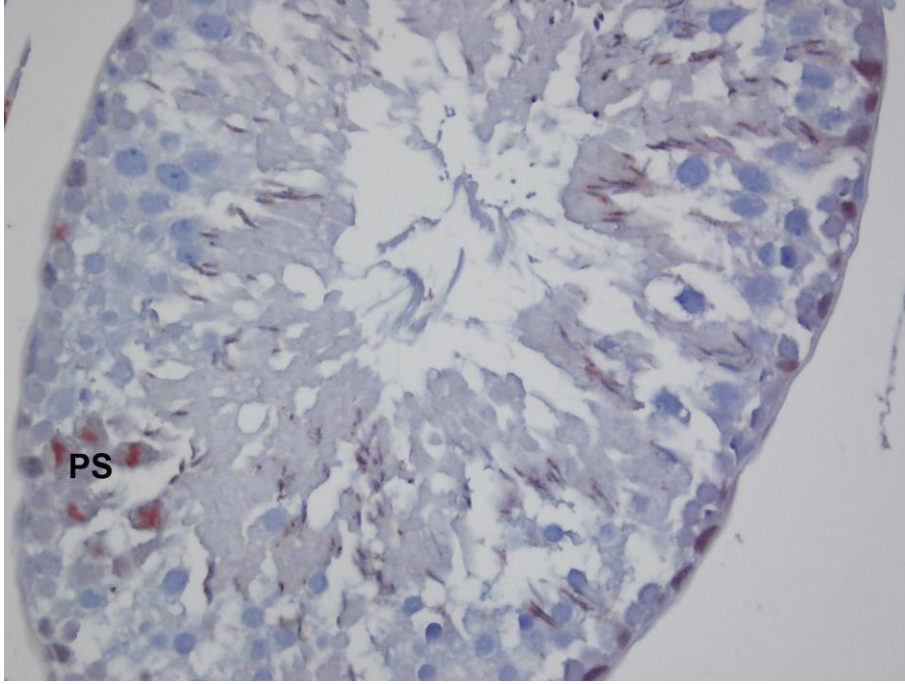
**Şekil 32. Şekil 31’de yer alan seminifer tübüllerden (yıldız) biri büyük büyütmede incelendiğinde, lümenine olgunlaşmamış hücrelerin döküldüğü, orta derecede immünoaktivite gösteren primer spermatositler ve zayıf derecede immünoaktivite gösteren spermatidler görülmektedir. NF-kB, hematoxilen zıt boyaması, x400.**



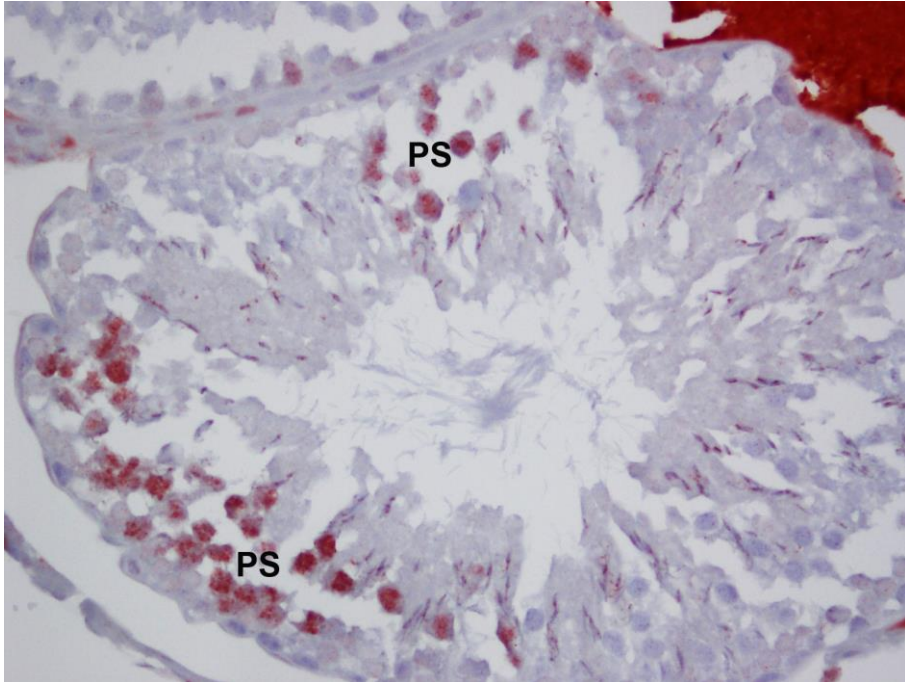
Şekil 33. Metotreksat+Curcumin grubuna ait seminifer tübülde orta derecede immünoreaktivite gösteren primer spermatositler (PS) ve zayıf derecede immünoreaktivite gösteren spermatidler (S) ile Leydig hücreleri (LH) gözlenmektedir. NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, x400.



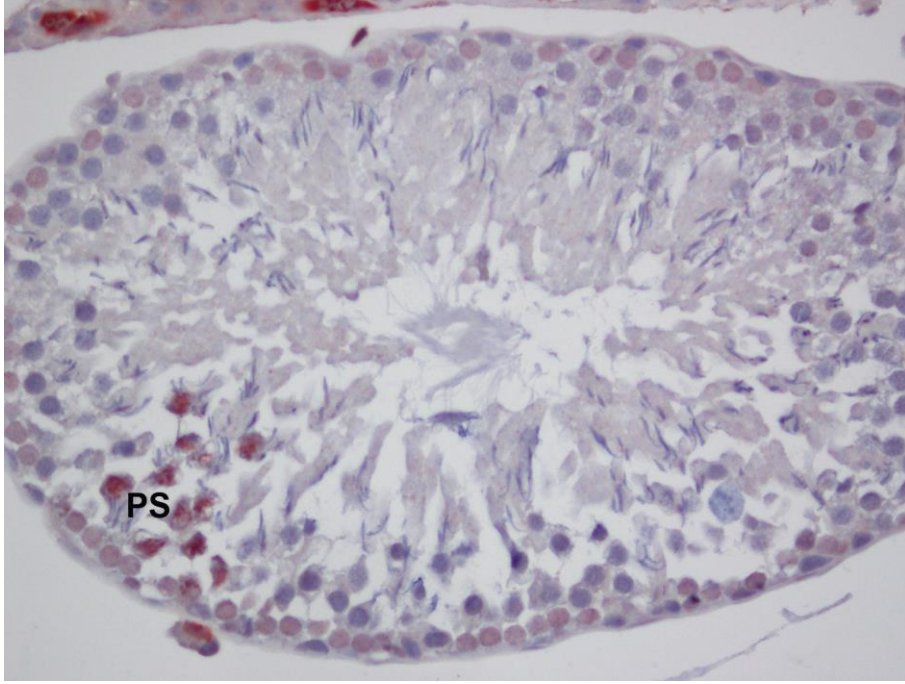
Şekil 34. Testis kesitinde seminifer tübülün NF-kB için negatif boyanması gözlenmektedir. Negatif, hematoksilen zıt boyaması, x400



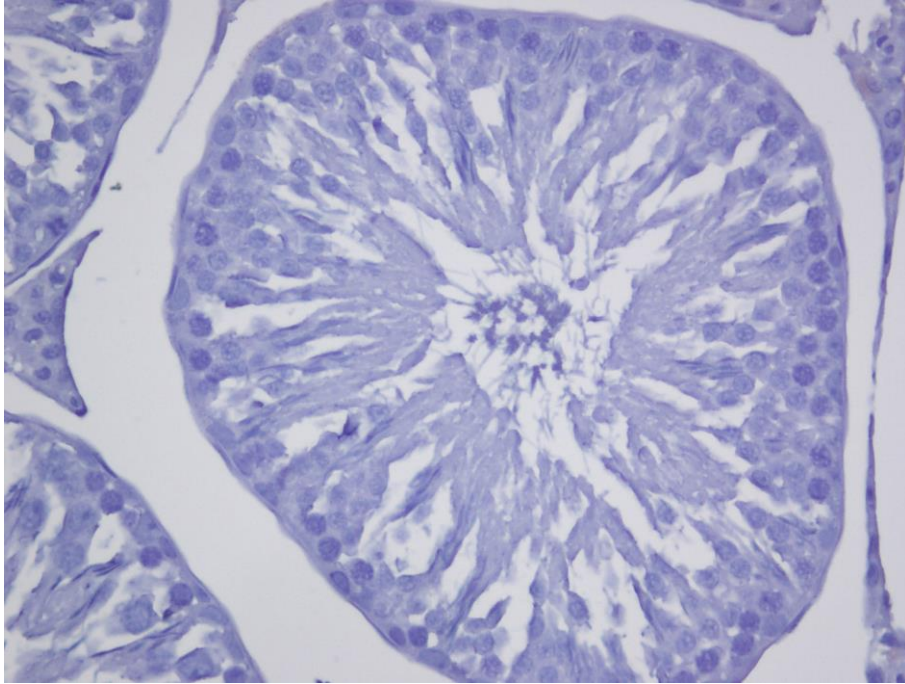
**Şekil 35.** Kontrol grubuna ait seminifer tübülde zayıf şiddette immünopozitif boyanan primer spermatoisitler (PS) gözlenmektedir. f-p38 MAPK, hematoksilen zıt boyaması, x400.



**Şekil 36.** Metotrexat grubuna ait seminifer tübülde güçlü immünopozitif boyanan primer spermatoisitler (PS) gözlenmektedir. f-p38 MAPK, hematoksilen zıt boyaması, x400.



**Şekil 37.** Metotreksat+Curcumin grubuna ait seminifer tübülde orta derecede immüno pozitif boyanma gösteren primer spermatozidler (PS) gözlenmektedir. f-p38 MAPK, hematozilen zıt boyaması, x400.



**Şekil 38.** Testis kesitinde seminifer tübülün f-p38 MAPK için negatif boyanması gözlenmektedir. Negatif, hematozilen zıt boyaması, x400.

## TARTIŞMA

Kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan en etkili yöntemlerden birisidir, ancak kısa ve uzun vadede çok sayıda toksisiteye neden olmaktadır (117). Kemoterapide kullanılan ilaçlar diğer farmasötik ilaçlardan çok daha toksiktir ve bu ilaçların birçoğu, normal ya da kanserli olsun, bölünen tüm hücreler üzerine sitotoksik etki gösterir (19). Bu etkiler, ilacın DNA replikasyonu, tamiri, kromozom ayrılması gibi aşamalara etki etmesiyle DNA hasarı şeklinde ortaya çıkmaktadır (118). Yine çoğu kemoterapötik ilaç, kan-testis bariyerini geçip germ hücrelerinin sayısını azaltarak bu hücelere zarar verir ya da testiküler interstisyel dokuda hyalinizasyon ve fibrozise neden olur. Kemoterapötiklerin spermatogenez üzerine bu zararlı etkileri, ilacın çeşidine, dozuna, tedavi öncesi semen kalitesine ve spermatogenetik siklusun evresine bağlıdır (119).

Kemoterapide yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçlardan bir tanesi de MTX'tir (19,53,120). Kanser tedavisi dışında psöriyazis ve romatoid artrit gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (2). Antimetabolitler olarak bilinen ilaç grubunda yer alan MTX, bir folik asit antagonistidir (48,121). Sentez aşamasındaki hücreleri etkileyerek hücre replikasyonunda önemli bir enzim olan DHFR'ye bağlanır ve THF sentezini inhibe eder (19). THF; DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli olan bir koenzimdir. THF'nin inhibisyonuyla birlikte bu moleküllerin sentezi durur ve sonuçta timidilat, pürin/pirimidin nükleotidleri ve aminoasitlerin sentezinde azalma gerçekleşir. Bu da nükleik asit ve protein sentezinin engellenmesine neden olur (57).



Yapılan çalışmalarda, MTX'in erkek üreme sisteminde ciddi hasara yol açarak, spermatogenezi etkilediği, testislerdeki seminifer tübüllerin (5,19,55,122) ve Leydig hücrelerinin morfolojisini bozduğu (123); seminifer tübül çapı (5,19), germinal seri hücre çapları (19,123) ve seminifer epitel kalınlığını (50) azalttığı, buna karşın interstisyel alan (5,19), tübüler bazal lamina ve (5) kapsül kalınlığını arttırdığı (50), testosteron seviyesini düşürdüğü (19,50,124) ve sperm sayısını azaltarak anormal başlı sperm sayısını arttırdığı (125) gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, seminifer tübül epitelinde çok çekirdekli dev hücrelere de rastlandığı bildirilen morfolojik bozukluklardandır (126). Elektron mikroskopik (EM) çalışmalarda spermatosit ve spermatidlerde apoptozis görülmüş ancak spermatogoniumların sağlam kaldığı bildirilmiştir (7). Yine başka bir EM çalışmasında da seminifer tübüllerin bazal laminalarında kalınlaşma ve düzensizlik olduğu, Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasındaki mesafenin arttığı, Sertoli hücrelerinin sitoplazmik dansite artışı ile birlikte hücre içinde çeşitli büyüklüklerde vakuolizasyonların görüldüğü, düz endoplazmik retikulum sistemlerinin genişlediği ve nükleusunda heterokromatin kümeleşmenin meydana geldiği gösterilmiştir. Leydig hücrelerinde ise herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (126).

Literatürde, MTX'in neden olduğu testis hasarına karşı çok sayıda koruyucu maddenin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (5,18,19,55,127). Bu deneysel çalışmada, MTX'e bağlı olarak gelişen testis hasarında CMN'nin koruyucu etkisinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak araştırılması amaçlandı.

Tüm gruplarda deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları ölçüldü. MTX grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. MTX+CMN grubu MTX grubu ile karşılaştırıldığında, MTX grubunda görülen kilo kaybının anlamlı olarak daha az olduğu gözlemlendi. MTX grubundaki bu ağırlık kaybı, birçok çalışmayla desteklenmektedir (50,124,128,129). Ancak Padmanabhan ve ark.'nın (125) yaptığı bir çalışmada, 5 ve 10 haftalık iki grup oluşturulmuş ve farelere haftada bir kez olmak üzere 5, 10, 20 ve 40 mg/kg MTX verilmiştir. Deneyin başında ve sonunda hayvan ağırlıkları ölçülmüş ve karşılaştırma yapıldığında 5 haftalık grubun hiçbir dozunda bizim çalışmamızın tersine anlamlı bir farklılık görülmezken, 10 haftalık grupta aynı dozlar kullanıldığında bizim çalışmamızla benzer olarak vücut ağırlıklarında anlamlı oranda bir azalma olduğu görülmüştür. Yine Padmanabhan ve ark.'nın (127) farelerle yaptığı başka bir çalışmada, 10 hafta boyunca haftada bir 20 mg/kg MTX verilen grupta deney sonunda vücut ağırlıkları ölçüldüğünde kontrole göre bir miktar azalma olduğu bulunmuştur. Ancak bu azalma anlamlı kabul edilmemiştir.

Deneklerden alınan testisler (sağ ve sol testis ayrı ayrı) tartıldı ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda her üç grupta da herhangi bir değişiklik saptanmadı. Yine, toplam testis ağırlığı değerlendirildiğinde benzer sonuçlar tespit edildi. Bazı çalışmalarda toplam testis ağırlığı ölçülerek değerlendirilmiş ve bizim sonucumuza benzer olarak bir farklılığa rastlanmamıştır (50,125,127,128). Testis ağırlığında bir farklılık olmaması MTX'in testislerde seminifer tübül çapını azaltmasına karşın interstisyel alanda ödeme neden olmasıyla kompanse edilmiş olabilir. Ancak yapılan bir çalışmada, MTX verilen grupta kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (126).

Toplam testis ağırlığı/toplam vücut ağırlığı oranına El-Sheikh ve ark.'nın (124) yaptığı çalışmada 20 mg/kg tek doz MTX verilen sıçanlarda, 9. günün sonunda bakılmış ve bu oranın anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Padmanabhan ve ark.'nın (125,127) yaptığı çalışmalarda ise TAİ değerlerinde bir anlamlılığa rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, TAİ istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bir farklılık göstermediği tespit edildi.

Spermatogenezde önemli rol oynayan testosteron seviyelerinin MTX'e bağlı olarak azaldığı, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (50,124,130). Buna karşılık, değişiklik olmadığını bildiren Oufi ve ark.'nın (19) yaptığı bir çalışma da bulunmaktadır. Bu çalışmada, tek doz 20 mg/kg MTX verilen farelerde 6 hafta sonra deney sonlandırılarak testosteron seviyelerine bakılmış ve MTX grubunda anlamlı bir azalma olmadığı gözlenmiştir. Aynı zamanda Leydig hücrelerinde de bir değişikliğe rastlanmadığı bildirilmiştir. Testosteron seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmaması da buna bağlanmıştır. MTX'in testis dokusu üzerine olan etkisinin geri dönüşümlü olabileceği yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (7). Bu bilgiler ışığında Oufi ve ark.'nın (19) yaptığı çalışmada testosteron seviyelerindeki anlamlı olmayan değişiklik, deney süresinin uzunluğuna bağlı olarak yan etkilerin geri dönmüş olabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda, serum testosteron seviyeleri ölçülerek karşılaştırıldığında, MTX grubunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Yapılan bazı çalışmalarda germinal seri hücreleriyle birlikte Leydig hücrelerinin boyutlarında ve yapılarında değişiklik olduğu rapor edilmiştir (50,123). Testosteron seviyesindeki bu azalmanın, Leydig hücrelerinde bildirilen bu değişikliklere bağlı olarak meydana gelen hasar sonucu ortaya çıkmış olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda H+E boyanmış histolojik kesitlerde seminifer tübül çapları, seminifer tübül epitel kalınlığı ve interstisyel alan genişliği ölçülerek gruplar arası karşılaştırması yapıldı.

Seminifer tübül çapları ölçülüp karşılaştırıldığında, MTX grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma gözlendi. Bizim alımamızdaki gibi tek doz 20 mg/kg MTX kullanılan bazı çalışmalarda da seminifer tübül çaplarının azaldığı gösterilmiştir (5,19). Günlük ve haftalık olarak düşük dozların uygulandığı çalışmalarda da yine seminifer tübül çaplarının azaldığı bununla birlikte seminifer epitelde de hasar olduğu bildirilmiştir (50,123).

Metotreksat'ın DHFR'yi inhibe ederek etki gösterdiği bilinmektedir (53). DNA'nın normal sentezi için gereken başlıca enzim olan DHFR'nin inhibisyonu nedeniyle primer/sekonder spermatozoidlerin DNA replikasyonu başarısız olduktan sonra seminifer tübüllerin hücresel içerik miktarının anlamlı olarak değiştiği, böylece mitozda gecikme, anormal protein sentezi ve hücre genişlemesinin meydana geldiği, yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, seminifer tübülde yer alan tüm hücrelerin ve Leydig hücrelerinin çapları ölçülmüş, primer/sekonder spermatozoidlerin ve spermatidlerin kontrole göre anlamlı olarak küçüldüğü, Sertoli hücrelerinde ise bir değişiklik olmadığı grlmtir (123). Shrestha ve ark. da (131) MTX verdikleri sıçanların seminifer epitelinde primer spermatozoidlerin ve spermatidlerin çaplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Bizim alımamızda da, seminifer epitel kalınlıkları ölçülüp tüm gruplar karşılaştırıldığında, MTX verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Bu azalmanın, hücre çaplarının azalmasıyla ve/veya MTX'in dolaylı olarak yaptığı DNA hasarı nedeniyle olgunlamadan lümene atılan seminifer epitel hücrelerinin yokluğundan kaynaklanabileceği dnld. Bizim sonuçlarımızla paralel olan bazı çalışmalar mevcuttur. Nouri ve ark.'nın (50) yaptığı bir çalışmada, 14 ve 28 gün boyunca haftalık 1mg/kg MTX verilen sıçanlarda seminifer epitel kalınlığı ölçüldüğünde MTX grubunda kontrol grubuna göre 14. ve 28. günlerde anlamlı bir azalma olduğu grlmtir. Sukhotnik ve ark.'nın (122) yapmış olduğu bir çalışmada ise sıçanlarda iki farklı MTX grubu oluşturulmuştur. İki gruba da tek doz ip. olarak 20 mg/kg MTX verilmiştir. Bir grup 2. günde diğer grup 4. günde sakrifiye edilmiştir. Bu grupların seminifer epitel kalınlıkları ölçülmüş ve karılatırılmıtır. Dördüncü günde hem kontrol hem de 2. gün grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenirken, 2. gün grubundaki azalma kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. Seminifer tübül çap ve epitel kalınlığının birlikte azalması, seminifer epitelde yer alan hücre çaplarının azalması ve hasarı sonucu ortaya çıkan, birbiriyle bağlantılı olabilecek parametreler olarak değerlendirildi.

Seminifer tübül çap ve epitel kalınlığına ek olarak, interstisyel alan genişlikleri de ölçülüp karşılaştırıldığında, MTX grubunda anlamlı bir artış olduğu saptandı. Oufi ve

ark.'nın (19) yaptığı çalışmada bu bulguyla paralel olarak, MTX grubunda interstisyel alan genişliğinde artış olduğu rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada da benzer şekilde, araştırmacılar tarafından 17 gün boyunca her gün 12,5 mikrogram MTX verilen sıçanların histolojik kesitlerinde interstisyel alan ölçüldüğünde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (123). Nouri ve ark.'nın (50) yaptığı bir çalışmada ise, 14 ve 28 gün boyunca haftalık 1mg/kg MTX verilen sıçanlarda interstisyel alan ölçüldüğünde 14. günde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken 28. günde MTX grubunda intersitisyel alan genişliğinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir.

Seminifer tübüllerin histolojik yapı değişiklikleri değerlendirildiğinde, normal, ayrılan, dökülen ve vakuolize seminifer tübüllerin sayıları belirlenerek gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. MTX grubunda, normal seminifer tübüllerin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, ayrılan, dökülen ve vakuolize seminifer tübüllerin ise istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı. Padmanabhan ve ark.'nın (125,127) yaptığı çalışmalar da bizim bu sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

Metotreksat'ın testiste yaptığı histolojik hasarlar, birçok çalışmayla benzer olarak (5,6,7), seminifer tübüllerde organizasyon bozukluğu, tübül lümenine dökülen henüz olgunlaşmamış seminifer epitel hücreleri, tübüllerde yer yer vakuolizasyon, tübüller arası interstisyel alanda artış ile birlikte ödem ve hücre kayıpları, bazal laminada ondülasyon şeklinde gözlemlendi. Sertoli hücrelerinde bir değişiklik görülmedi ve interstisyel alanda da inflamatuvar hücre artışına rastlanmadı.

Metotreksat+Curcumin grubunda, MTX grubuna göre sağ ve sol testis, toplam testis ağırlıkları ve TAİ değerlerinde bir fark görülmedi. Serum testosteron seviyeleri, seminifer tübül çapı ve seminifer epitel kalınlığı MTX grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak daha yüksek olduğu, interstisyel alan genişliğinin ise daha az olduğu belirlendi. Kontrol grubunda seminifer tübüllerin normal yapıda olduğu gözlenirken, MTX'in yan etkilerini azaltmak amacıyla CMN verilen grupta, bazı tübüllerde dökülme, ayrılma, vakuolizasyon gibi hasarlara rastlansa da MTX grubuna göre oldukça normal bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi.

Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin kökünden elde edilen (76) antioksidan, antikanserijen, antiinflamatuvar (132,133,72) aktiviteleri çeşitli çalışmalarda bildirilmiş olan ve baharat olarak ta kullanılan (72,76) bir bitkidir. Malignitelere karşı olan kemopreventif özelliği de ayrı bir ilgi konusu olmuştur (72). CMN'nin MTX'in testis ve testis dışı dokularda yan etkilerini azalttığına dair bazı çalışmalar yapılmıştır (129,134,135). Başka ajanlarla

oluşturulan testis hasarı üzerine olan koruyucu etkisi de çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir (23,46,136,137).

Çalışmamızda ayrıca testiste NF-kB immünoreaktivitesi ve f-p38 MAPK immünopozitif boyanması incelendi. NF-kB immünoreaktivitesi, MTX grubunda özellikle primer spermatositlerde güçlü, spermatidlerde güçlü-orta şiddette gözlemlendi. Spermatogoniumlarda ise zayıf-orta şiddetteydi. Sertoli hücrelerinin de yer yer zayıf şiddette immünoreaktivite gösterdiği görüldü. f-p38 MAPK immünopozitif boyanması MTX grubunda değerlendirildiğinde, boyanma bazı seminifer tübüllerde spermatogonium ve Sertoli hücrelerinde gözlenirken, çoğu seminifer tübülde primer spermatositlerde izlendi. MTX+CMN grubunda, NF-kB immünoreaktivitesi ve f-p38 immünopozitif boyanan hücre sayısının MTX grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü. MTX ile yapılan testis hasarında NF-kB aktivasyon artışı, daha önce gösterilmiştir (124). Yine, bizim çalışmamızdaki p38 immünoreaktivite artışıyla uyumlu olarak, Kim ve ark.'nın (11) yaptığı bronşiyal hücre kültürü çalışmasında MTX, p38 MAPK sinyal artışına neden olmuştur. NF-kB ve p38 MAPK sinyal artışı MTX dışındaki testis hasarlarında da bildirilmiştir (23).

Nükleer faktör-kappa B, inflamatuvar ve doğuştan gelen bağışıklık cevapları da dahil olmak üzere bilinen bir dizi spesifik transkripsiyon faktörüdür (101). NF-kB, ilk olarak B hücrelerinde immünglobulin kappa hafif zincirini arttırıcı bir diziye bağlı olan bir protein olarak tespit edilmiştir (102,103). Bu dimerik transkripsiyon faktörü, stres cevapları, inflamasyon ve programlanmış hücre ölümüyle (apoptozis) alakalı genlerin büyük çeşitliliğini aktive edebilen farklı üyelerden oluşmaktadır (102).

p38 MAPK, inflamatuvar cevapta önemli rol oynayan yaygın ve yüksek oranda korunmuş bir proteindir (8,92). Oksidatif stresi de içeren çeşitli hücrel stresler ile aktive olabilen ve sonuçta hücrede serbest oksijen radikallerinin artmasına yol açan bir kinazdır. Buna ek olarak, çoğunlukla inflamasyon ve apoptozis ile ilgilidir (8-10).

van't Land ve ark.'nın (16) intestinal sıçan hücre serilerinde yapmış olduğu çalışmada, MTX kaynaklı NF-kB aktivasyonunun CMN ile azaltılabileceği bildirilmiştir. Camacho-Barquero ve ark.'nın (25) yaptığı bir kolit çalışmasında ise CMN'nin kolonda f-p38 sinyalini azalttığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da CMN'nin MTX grubuyla karşılaştırıldığında belirgin olarak NF-kB ve p38 MAPK aktivasyonlarını azalttığı tespit edildi.

Birçok alanda yaygın olarak kullanılan MTX'in neden olduğu testis hasarını, değişik alanlarda koruyucu etkisi kanıtlanmış olan CMN'nin, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda azaltabileceği ve dolayısıyla erkekte infertilite tedavisine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

## SONUÇLAR

Metotreksat'ın neden olduğu testis hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu düşünölen CMN'nin etkinliğinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak gösterilmesinin amaçlandığı bu çalışmada; aynı biyolojik ve fizyolojik koşullar altında tutulan *Wistar albino* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=6), MTX grubu (n=6) ve MTX+CMN grubu (n=6) olmak üzere üç farklı grup oluşturuldu ve denekler CMN son dozundan 24 saat sonra anestezi altında sakrifiye edildi.

Her üç grubunun bulguları birbiri ile karşılaştırıldığında;

1. Vücut ağırlıklarının MTX grubunda kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, MTX+CMN grubunda ise MTX grubuna göre vücut ağırlıklarındaki düşüşte anlamlı bir azalma tespit edildi.
2. Testis ağırlıklarında ve testis ağırlık indekslerinde (TAİ) bir değişiklik saptanmadı.
3. Seminifer tüböl çap ve epitel kalınlığının kontrole göre MTX grubunda anlamlı olarak azalırken, interstisyel alan genişliğinin arttığı, MTX+CMN grubunda ise, MTX'e göre seminifer tüböl çap ve epitel kalınlığı azalmasında anlamlı bir artış olurken, interstisyel alan genişliği artışında da anlamlı bir azalma tespit edildi.
4. Serum testosteron seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre MTX grubunda anlamlı olarak azaldığı, MTX+CMN grubu MTX grubu ile karşılaştırıldığında ise, bu azalmanın anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı.

5. Seminifer tübül histolojik hasar skoru yapıldı ve kontrol grubuna göre MTX grubunda ayrılma, dökülme ve vakuolizasyon gösteren histolojik olarak hasarlı seminifer tübül sayısının arttığı, MTX+CMN grubunda MTX grubuna göre bu hasarlı tübül sayısı artışının anlamlı olarak azaldığı belirlendi.
6. NF-kB immünoreaktivitesi ve f-p38 immünopozitif hücre sayısının MTX grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği, MTX+CMN grubunda ise bu artışın MTX grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak, MTX uygulamasından önce verilen CMN'nin MTX'in oluşturduğu testis hasarını azaltmada NF-kB ve p38 MAPK sinyal yolları üzerinden etkili olabileceği, dolayısıyla klinikte yaygın olarak kullanılan bir antimetabolit olan MTX'in kullanılması durumunda tedaviye CMN eklenmesinin yararlı olabileceği kanısına varıldı.



## ÖZET

Metotreksat (MTX), kemik iliği, bağırsak mukozası, gonadlar gibi yüksek çoğalma gücüne sahip dokular üzerine yan etkileri olan ve yaygın kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Bu çalışmada MTX'in yol açtığı testis hasarına karşı curcumin (CMN)'nin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Onsekiz adet Wistar albino erkek sıçan herbirinde altı adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna intragastrik (ig.) yolla 14 gün boyunca dimetilsülfoksit (DMSO, CMN ile eşit hacimde); 2. gruba, intraperitoneal (ip.) olarak 11. gün tek doz MTX (20 mg/kg); 3. gruba, ig. yol ile 14 gün boyunca CMN (100 mg/kg/gün, DMSO içinde çözülerek) ve ek olarak yine 3. gruba, ip. olarak 11. günde tek doz MTX (20 mg/kg) verildi ve CMN son dozundan 24 saat sonra sakrifiye edilerek testis dokuları histolojik ve immünohistokimyasal olarak çalışıldı. İntrakardiyak ponksiyon yoluyla kan örnekleri alınarak serumda total testosteron değerleri saptandı. Deneklerin vücut ve testis ağırlıkları ölçülerek testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı hesaplandı. Ek olarak, testis dokularında seminifer tübül çap ve epitel kalınlığı ile interstisyel alan genişliği ölçüldü.

Hayvan ağırlıkları, serum testosteron seviyeleri, seminifer tübül çap ve epitel kalınlığının MTX grubunda kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, testis ağırlıklarında ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranında bir değişiklik olmadığı, histolojik olarak hasarlı seminifer tübül sayısının ve interstisyel alan genişliğinin anlamlı olarak arttığı görüldü. Buna ek olarak, NF-kB immünoreaktivitesi ve p38 MAPK immünopozitif hücre sayısında kontrole göre bir artış olduğu saptandı.

Curcumin, MTX'in neden olduğu vücut ağırlıkları, serum testosteron seviyeleri, seminifer tübül çap ve epitel kalınlığındaki azalmayı önlerken, histolojik olarak hasarlı seminifer tübül sayısı ve interstisyel alan genişlik artışını anlamlı olarak azalttı. Bundan başka, artmış olan NF-kB immünoreaktivitesi ve f-p38 MAPK immünopozitif hücre sayısında azalmaya neden oldu.

Sonuç olarak, CMN'nin MTX'in neden olduğu testis hasarını NF-kB ve p38 MAPK yolu üzerinden etki göstererek azaltabileceği kanısındayız.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksat, Curcumin, Testis, Nükleer faktör-kappa B, p38

## **PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AGAINST METHOTREXATE-INDUCED TESTICULAR DAMAGE**

### **SUMMARY**

Methotrexate (MTX) is a chemotherapeutic agent which is commonly used and which has side effects on tissues with high proliferation potential such as bone marrow, intestinal mucosa and gonads. In this study, it is aimed to investigate the protective effects of curcumin (CMN) against to MTX-induced testis damage.

Eighteen Wistar albino male rats were subdivided into three groups having each six rats in. To control group, during 14 days intragastric (ig.) dimethylsulfoxide (DMSO, with same volume of CMN); to 2. group, during 11 days, intraperitoneal(ip.) single dose MTX (20mg/kg); to 3. group, during 14 days, ig. CMN (100 mg/kg/day, dissolved in DMSO) and additionally to 3. group, during 11 days, ip. single dose MTX (20 mg/kg) were administered. Twenty four hours later than last dose of CMN, rats were sacrificed and testis tissues were analysed for histological and immunohistochemical methods. Intracardiac blood samples were analysed for total testosterone value in serum. After weights of body and testis were measured, testis weight/body weight ratio was calculated. In addition, seminiferous tubules diameter, epithelium thickness and interstitial space diameter were measured.

The weights of animals, serum testosterone levels and seminiferous tubules diameter and epithelial thickness were decreased significantly in MTX group in comparison with

control group whereas, weights of testis and testis weights/body weights ratios were not changed. The number of histologically damaged seminiferous tubules and interstitial space diameter were increased significantly. In addition to this, immunoreactivity of NF-kB and p-p38 MAPK immunopositive cell numbers increased in MTX group comparing to control group.

Curcumin protects the decrease on MTX-induced body weights, serum testosterone levels, seminiferous tubules diameter and epithelial thickness, whereas reduced the increase in histologically damaged seminiferous tubules number and interstitial space diameter. Moreover, it caused reduction in the increased immunoreactivity of NF-kB and numbers of p-p38 MAPK immunopositive cells.

In conclusion, we are of the opinion that CMN could reduce MTX-induced testicular damage via the inhibition of NF-kB and p38 MAPK signaling pathway.

**Key words:** Methotrexate, Curcumin, Testis, Nuclear factor-kappa B, p38

## KAYNAKLAR

1. Dökmeçi İ. Antikanser İlaçlar. Dökmeçi İ (Editör). Farmakolojide temel kavramlar. 1. basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000.s.976-1008.
2. Sargın AK, Oğuz EO, Can B, Saran Y. Fare böbreğinde metotreksatın oluşturduğu morfolojik değişiklikler. Anadolu Üni Bil Tek Der 2009;10(1):197-203.
3. Türker A, Kayaalp SO. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastikler. Kayaalp SO (Editör). Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık, 2002.s.380-415.
4. Sener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N et al. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. Cell Biol Toxicol 2006;22(1):47-60.
5. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Hum Exp Toxicol 2011;30(8):897-903.
6. Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarci M, Meydan S, Oztürk OH, Koç A. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. Toxicol Ind Health 2010;26(7):433-8.
7. Işık A, Işılav L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. Sıçan testisinde metotreksatın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. Ank Üni Tıp Fak Mecmuası 1997;50(3):125-9.
8. Stambe C, Atkins RC, Tesch GH, Kapoun AM, Hill PA, Schreiner GF et al. Blockade of p38 $\alpha$  MAPK ameliorates acute inflammatory renal injury in rat anti-GBM glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 2003;14(2):338-51.

9. Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:717-26.
10. Haddad JJ. Mitogen-activated protein kinases and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol* 2004;73(5):359-77.
11. Kim YJ, Song M, Ryu JC. Inflammation in methotrexate-induced pulmonary toxicity occurs via the p38 MAPK pathway. *Toxicology* 2009;256:183-190.
12. Cho HW, Park SK, Heo KW, Hur DY. Methotrexate induces apoptosis in nasal polyps via caspase cascades and both mitochondria-mediated and p38 mitogen-activated protein kinases/Jun N-terminal kinase pathways. *Am J Rhinol Allergy* 2013;27(1):e26-31.
13. King TJ, Georgiou KR, Cool JC, Scherer MA, Ang ES, Foster BK et al. Methotrexate chemotherapy promotes osteoclast formation in the long bone of rats via increased pro-inflammatory cytokines and enhanced NF-kB activation. *Am J Pathol* 2012;181(1):121-9.
14. Beutheu Youmba S, Belmonte L, Galas L, Boukhattala N, Bôle-Feysot C, Déchelotte P et al. Methotrexate modulates tight junctions through NF-kB, MEK, and JNK pathways. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54(4):463-70.
15. Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Adhikary A, Manna K, Dey S et al. Pomegrate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf-2-NF-kB pathways. *J Nutr Biochem* 2013;24(12):2040-50.
16. van't Land B, Blijlevens NM, Marteiijn J, Timal S, Donnelly JP, de Witte TJ et al. Role of curcumin and the inhibition of NF-kB in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia* 2004;18(2):276-84.
17. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Otlu A. Metotreksatın neden olduğu testiküler hasara karşı klorojenik asitin koruyucu etkileri. *Türk Klin J Med Sci* 2010;30(2):507-13.
18. Yulug E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effect of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. *Sci World J* 2013;2013:489659.
19. Oufi HG, Al-Shawi NN. The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *Eur J Pharmacol* 2014;730:36-40.
20. Itokawa H, Shi Q, Akiyama T, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin Med* 2008;17;3:11.

21. Nagpal M, Sood S. Role of curcumin in systemic and oral health: An verview. *J Nat Sci Biol Med* 2013;4(1):3-7.
22. Priyadarsini KI. Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radic Biol Med* 1997;23(6):838-43.
23. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 2009;24(7):1717-25.
24. Bhaumik S, Jyothi MD, Khar A. Differential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells. *FEBS Lett* 2000;483(1):78-82.
25. Camacho-Barquero L, Villegas I, Sánchez-Calvo JM, Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Motilva V et al. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol* 2007;7(3):333-42.
26. Song WB, Wang YY, Meng FS, Zhang QH, Zeng JY, Xiao LP ve ark. Curcumin protects intestinal mucosal barrier function of rat enteritis via activation of MKP-1 and attenuation of p38 and NF- $\kappa$ B activation. *PLoS One* 2010;24:5(9):e12969.
27. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek üreme sistemi (çeviri: Y. Aytekin). Aytekin Y, Solakoğlu S (Editörler). *Temel histoloji*. İstanbul: Barış Kitabevi;2006:s.431-446.
28. Sancak B. ve ark. Fonksiyonel anatomi. 1. baskı. Ankara: Metu pres; Şubat 1999:322-4.
29. Yıldırım M. Resimli sistematik anatomi. İstanbul: Nobel Kitabevleri; 2013:582-3.
30. Şeftalioğlu A. Genel insan embriyolojisi. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1991:7-9.
31. Özyalvaçlı ME. Varikoselli infertil hastalarda internal spermatik ven duvarında nos izoformlarının ekspresyonu ve periferik ven ile karşılaştırılması (tez). İstanbul. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Üroloji Kliniği. 2009.
32. Sargın SY, Arpalı E. Spermatogenez. Çelik Ö. (Editör). *Yardımcı Üreme Teknikleri*. Adana: Nobel Kitabevleri; 2011.s.57-60.
33. Erdoğan D, Görgün M, Hatipoğlu MT, Ilgaz C. Özel histoloji. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2007:156-59.

34. Lane AH, Donahoe PK. New insights into Mullerian inhibiting substance and its mechanism of action. *J Endocrinol* 1998;158(1):1-6.
35. Mittwoch U. Sex determination in mythology and history. *Arg Bras Endocrinol Metabol* 2005;49(1):7-13.
36. Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A. Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(3):814-7.
37. Tosun M, Aktan M, Duman S, Erdoğan E, Taşkapu H. İntrauterin dönemde dişi ve erkek gonadal yapıların gelişimine etkin olan faktörler. *Türk Klin Tıp Bil* 2000;20:40-46.
38. Moore KL, Persaud TVN. Ürogenital sistem (çeviri: S. Polat). Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Editörler). *İnsan embriyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2002:323-25,329.
39. Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). *Langman medikal embriyoloji*. 11. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2011:246-48.
40. Quinn A, Kopman P. The molecular genetics of sex determination and sex reversal in mammals. *Semin Reprod Med* 2012;30(5):351-363.
41. Dansuk R. Kadın genital sisteminin embriyolojisi ve cinsel farklılaşma. *Türk pediatri arşivi* 2011;46(1):115-7.
42. Petorak İ. *Medikal embriyoloji*. İstanbul: Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 1984:221-22.
43. Nourashrafeddin S, Aarabi M, Miryounesi M, Ebrahimzadeh-Vesal R, Zarghami N, Modarressi MH et al. Expression analysis of PAWP during mouse embryonic stem cell-based spermatogenesis in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014;50(5):475-81.
44. Banerjee A, Mana S, Saha SK. Morphological characterization of testicular cells, spermatogenesis and formation of spermatophores in a fish ectoparasite *Argulus bengalensis* Ramakrishna, 1951 (Crustacea: Branchiura). *Tissue Cell* 2014;46(1):59-69.
45. Grimaldi P, Di Giacomo D, Geremia R. The endocannabinoid system and spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:192.



46. Gümüşel A. Adolesan çağdaki sıçanların epididiminden alınan spermelere ve testis leydig hücrelerine sigara dumanının ve kurkumin antioksidanının etkilerinin mikroskopik incelenmesi (tez). İstanbul. İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2013.
47. Ross MH, Pawlina W. Erkek üreme sistemi (çeviri: N. Demir). Baykal B (Editör). Histoloji konu anlatımı ve atlas, ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile. Ankara: Palme Yayınları; 2014.s.787-8.
48. Çağlar Y, Özgür H, Matur İ, Yenilmez ED, Tuli A, Gönluşen G et al. Ultrastructural evaluation of the effect of N-Acetylcysteine on methotrexate nephrotoxicity in rats. *Histol histopathol* 2013;28(7):865-74.
49. Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Işık I, Dilekoz E. Light and electron microscope examination of the effects of methotrexate on the endosalpinx. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;120(1):96-103.
50. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia* 2009;41(2):105-10.
51. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanism involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27(5):277-92.
52. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 1998;16(4):283-93.
53. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 1985;76(3):907-12.
54. Uzar E. Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidan/antioksidanların durumu: kafeik asit fenetil ester'in antioksidan koruyucu etkisi (tez). Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi. Tıp Fakültesi. Nöroloji Anabilim Dalı. 2006.
55. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of  $\beta$ -carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 2009;92(6):2028-33.
56. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 2006;21(1):42-7.

57. Chamber BA, Amrein PC, Druker B, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE et al. Chemotherapy of neoplastic diseases. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (Editörler). Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: Mc Graw Hill Co; 2006.s.1338-9.
58. Kose E, Sapmaz HI, Sarihan E, Vardi N, Turkoz Y, Ekinci N. Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: A biochemical and histological study. *Sci World J* 2012;2012:987508.
59. Taminiou JA, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small-intestine epithelium to methotrexate. *Gut* 1980;21(6):486-92.
60. Koppelman T, Pollak Y, Mogilner J, Bejar J, Coran AG, Sukhotnik I. Dietary L-arginine supplementation reduces Methotrexate-induced intestinal mucosal injury in rat. *BMC Gastroenterol* 2012;12:41.
61. Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, Silverman AK. Methotrexate and reproduction in men; case report and recommendation. *J Am Acad Dermatol* 1993;29(5 Pt 2):913-6.
62. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem* 1999;47(10):4297-300.
63. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991;57(1):1-7.
64. Purwar B, Shrivastava A, Arora N, Kumar A, Saxena Y. Effect of curcumin on gastric emptying of albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2012;56(2):168-73.
65. Khalafalla RE, Müller U, Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Desouky AY, Alber G ve ark. Effect of curcumin (diferuloylmethane) on eimeria tenella sporozoites in vitro. *Parasitol Res* 2011;108(4):879-86.
66. Minassi A, Sánchez-Duffhues G, Collado JA, Muñoz E, Appendino G. Dissecting the pharmacophore of curcumin. which structural element is critical for which action? *J Nat Prod* 2013;76(6):1105-12.
67. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999;27(4):486-94.
68. Choudhary D, Chandra C, Kale RK. Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *J Ethnopharmacol* 1999;64(1):1-7.

69. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Diaz-Alperi J, Ramirez A. The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34(1):37-46.
70. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci* 2006;78(18):2081-7.
71. Lev-Ari S, Starr A, Vexler A, Karaush V, Loew V, Greif J et al. Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity. *Anticancer Res* 2006;26(6B):4423-30.
72. Choudhuri T, Pal S, Aggarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett* 2002;512(1-3):334-40.
73. Sinha D, Biswas J, Sung B, Aggarwal BB, Bishayee A. Chemopreventive and chemotherapeutic potential of curcumin in breast cancer. *Curr Drug Targets* 2012; 13(14):1799-819.
74. Kuhar M, Imran S, Singh N. Curcumin and quercetin combined with cisplatin to induce apoptosis in human laryngeal carcinoma Hep-2 cells through the mitochondrial pathway. *J Cancer Mol* 2007;3(4):121-8.
75. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: Molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *J Mol Signal* 2007;2:10.
76. Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1994;54(22):5841-7.
77. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1997;116(2):197-203.
78. Chuang SE, Kuo ML, Hsu CH, Chen CR, Lin JK, Lai GM et al. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21(2):331-5.
79. Padmaja S, Raju TN. Antioxidant effect of curcumin in selenium induced cataract of Wistar rats. *Indian J Exp Biol* 2004;42(6):601-3.
80. Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21(2A):873-8.

81. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikula J, Sikora E et al. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Lett* 1998;433(3):287-93.
82. Khopde SM, Priyadarsini KI, Guha SN, Satav JG, Venkatesan P, Rao MNA. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by tetrahydrocurcumin: possible mechanisms by pulse radiolysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64(3):503-9.
83. Ligterink W. MAP kinases in plant signal transduction: how many, and what for? *Results Probl Cell Differ* 2000;27:11-27.
84. Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* 2005;10(7):339-46.
85. Jonak C, Ligterink W, Hirt H. MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:204-13.
86. Tatebayashi K, Takekawa M, Saito H. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J* 2003;22(14):3624-34.
87. Chen RE, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1311-40.
88. Yu H. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage. *Chin J Cancer Res* 2012;24(2):83-9.
89. Li XN, Su J, Zhao L, Xiang JB, Wang W, Liu F et al. The p38 MAPK inhibitor JLU1124 inhibits the inflammatory response induced by lipopolysaccharide through the MAPK-NF- $\kappa$ B pathway in RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol* 2013;17(3):785-92.
90. Deacon K, Mistry P, Chernoff J, Blank JL, Patel R. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol Biol Cell* 2003;14(5):2071-87.
91. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005;6:322-7.
92. Williams AS, Issa R, Durham A, Leung SY, Kapoun A, Medicherla S et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2008;600(1-3):117-22.

93. Olson JM, Hallahan AR. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med* 2004;10(3):125-9.
94. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer* 2013;4(9-10):401-8.
95. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 2010;429(3):403–17.
96. Ikezumi Y, Hurst L, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Macrophage-mediated renal injury is dependent on signaling via the JNK pathway. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(7):1775-84.
97. Ma FY, Liu J, Nikolic-Paterson DJ. The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology. *Braz J Med Biol Res* 2009;42(1):29-37.
98. Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* 2009;11(5):209.
99. Zhuang S. and Schnellmann R. G. A Death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319(3):991-7.
100. Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B. ERK in learning and memory: A review of recent research. *Int J Mol Sci* 2010;11(1):222-32.
101. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2(4):301-10.
102. Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF- $\kappa$ B in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2002;2(11):1509-20.
103. De Souza JAC, Junior CR, Garlet GP, Nogueira AVB, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J App Oral Sci* 2010;20(2):128-38.
104. Kim KS, Lee DS, Bae GS, Park SJ, Kang DG, Lee HS ve ark. The inhibition of JNK MAPK and NF- $\kappa$ B signaling by tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. *Eur J Pharmacol* 2013;721(1-3):267-76.
105. Tsoulfas G, Geller DA. NF- $\kappa$ B in transplantation: friend or foe? *Transpl Infect Dis* 2001;3(4):212–9.

106. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446(5):475-82.
107. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev* 2004;18(18):2195-224.
108. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF- $\kappa$ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007;29(1):19-35.
109. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF- $\kappa$ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13(5):738-47.
110. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF- $\kappa$ B signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res* 2011;1(5):629-49.
111. Kanter M, Topcu-Tarladacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol* 2010;41(2-3):121-8.
112. Orazizadeh M, Khorsandi L, Absalan F, Hashemitabar M, Daneshi E. Effect of beta-carotene on titanium oxide nanoparticles-induced testicular toxicity in mice. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(5):561-8.
113. Günaydin B, Yıldırım A, Zemheri E, Özkanlı Ş, Göçer S, Keskin SK et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and HIF-1 $\alpha$  in renal cell carcinoma. *Turkish J Urology* 2012;38(1):1-7.
114. Uz YH, Murk W, Bozkurt I, Kizilay G, Arici A, Kayisli UA. Increased c-Jun N-terminal kinase activation in human endometriotic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 2011;135(1):83-91.
115. Altay B, Cetinkalp S, Doganavşargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril* 2003;80(2):828-31.
116. Orazizadeh M, Khorsandi LS, Hashemitabar M. Toxic effects of dexamethasone on mouse testicular germ cells. *Andrologia* 2010;42(4):247-53.
117. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001;7(4):394-403.
118. Witt KL, Bishop JB. Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. *Mutat Res* 1996;355(1-2):209-34.
119. Giwercman A, Petersen PM. Cancer and male infertility. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14:453-471.

120. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006;11(6):694-703.
121. Dilek K. Günümüzde en sık kullanılan immünsüpresif ajanların özellikleri. *ANKEM Derg* 2002;16(3):099-202.
122. Sukhotnik I, Nativ O, Roitburt A, Bejar D, Coran AG, Mogilner JG et al. Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat. *Pediatr Surg Int* 2013;29(2):179-84.
123. 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;50(1):33-5.
124. El-Sheikh AA, Morsy MA, Al-Taher AY. Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life Sci* 2014;119(1-2):40-6.
125. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat Res* 2008;655(1-2):59-67.
126. Bükücü NK. Sıçan testisinde metotreksatın yaptığı hasara karşı Vitamin E ve L-Karnitin'in etkisi (tez). Gaziantep. Gaziantep Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2013.
127. 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. *Mutat Res* 2009;673(1):43-52.
128. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR et al. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol* 2008;27(7):547-52.
129. Atal S. Erişkin erkek sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarında curcuminin etkisi (tez). Eskişehir. Osmangazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2014.
130. Atashfaraz E, Farokhi F, Najafi G. Protective effect of ethyl pyruvate on epididymal sperm characteristics, oxidative stress and testosterone level in methotrexate treated mice. *J Reprod Infertil* 2013;14(4):190-6.
131. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D. Effect of methotrexate (mtx) administration on spermatogenesis: An experimental on animal model. *Nepal Med Coll J* 2007;9(4):230-3.

132. Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK. Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: Participation of nitric oxide and TNF-alpha. *Phytother Res* 2007;21(3):278-83.
133. Araújo CC, Leon LL. Biological activation of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(5):723-8.
134. Hemeida RA, Mohafez OM. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst* 2008;20(2):141-8.
135. Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Rifaai RA, Hassan MK. Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Adv Pharmacol Sci* 2013;2013:387071.
136. Glombik K, Basta-Kaim A, Sikora-Polaczek M, Kubera M, Starowicz G, Styma J. Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *Pharmacol Rep* 2014;66(5):782-7.
137. Kanter M, Aktaş C, Erboğa M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(9):1578-85.



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Erkek genital sistem .....	4
Şekil 2: Seminifer Tübül Epiteli .....	6
Şekil 3: Spermiogenezis ve olgun spermium .....	10
Şekil 4: MTX ve DHF'nin yapısal formülü .....	12
Şekil 5: Curcumin .....	15
Şekil 6: Curcuminin Biyolojik Etkileri .....	15
Şekil 7: Curcuminin kimyasal formülü .....	16
Şekil 8: Tipik MAPK sinyal yolağı .....	17
Şekil 9: Memelilerde MAPK sinyal yolağı diyagramı .....	18
Şekil 10: NF-kB Sinyal İleti Yolu .....	23
Şekil 11: Klasik ve Alternatif NF-kB Sinyal İleti Yolu .....	24
Şekil 12: Deney Protokolü .....	26
Şekil 13: Kontrol grubu, H+E, X100 .....	37
Şekil 14: Kontrol, H+E, X200 .....	37
Şekil 15: Kontrol, H+E, X400 .....	38
Şekil 16: Kontrol, H+E, X400 .....	38
Şekil 17: MTX, H+E, X100 .....	39
Şekil 18: MTX, H+E, X100 .....	39
Şekil 19: MTX, H+E, X200 .....	40
Şekil 20: MTX, H+E, X200 .....	40
Şekil 21: MTX, H+E, X400 .....	41

Şekil 22: MTX+CMN, H+E, X100.....	41
Şekil 23: MTX+CMN, H+E, X200.....	42
Şekil 24: MTX+CMN, H+E, X200.....	42
Şekil 25: MTX+CMN, H+E, X400.....	43
Şekil 26: Kontrol, NF-kB , hematoksilen zıt boyaması, X200 .....	43
Şekil 27: Kontrol, NF-kB , hematoksilen zıt boyaması, X400 .....	44
Şekil 28: MTX, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	44
Şekil 29: MTX, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	45
Şekil 30: MTX, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	45
Şekil 31: MTX+CMN, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X200 .....	46
Şekil 32: MTX+CMN, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X400 .....	46
Şekil 33: MTX+CMN, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X400 .....	47
Şekil 34: Negatif, NF-kB, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	47
Şekil 35: Kontrol grubu, f-p38 MAPK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	48
Şekil 36: MTX, f-p38 MAPK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	48
Şekil 37: MTX+CMN, f-p38 MAPK, hematoksilen zıt boyaması, X400 .....	49
Şekil 38: Negatif, f-p38 MAPK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	49

## **Tablolar**

<b>Tablo 1.</b> Kontrol ve deney gruplarının vücut ağırlıkları (VA) değişimi, testis ağırlıkları, testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranları ( $TAİ=TA/VA \times 100$ ) ve serum tetosteron değerlerinin karşılaştırılması .....	32
<b>Tablo 2.</b> Kontrol ve deney gruplarının seminifer tübül çapı, seminifer epitel kalınlığı ve interstisyel alan genişliğinin karşılaştırılması.....	33
<b>Tablo 3.</b> Kontrol ve deney gruplarında seminifer tübüllerin histolojik yapı değişikliklerinin karşılaştırılması .....	35
<b>Tablo 4.</b> Kontrol ve deney gruplarının NF-kB immünoaktivitesi ve f-p38 MAPK indeksinin karşılaştırılması .....	36

## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmit'te doğdum. Orta öğrenimimi 2006 yılında İzmit Çelik Halat Lisesinde tamamladım. 2007 yılında Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde eğitime başladım. 2011 yılında mezun oldum. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansına başladım. Aynı Anabilim Dalında eğitime devam etmekteyim.

## **EKLER**

## Ek-1

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI**

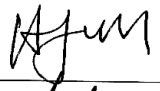


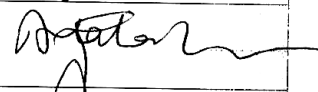
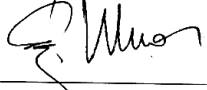
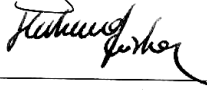
**EDİRNE**

**Oturum Sayısı: 05**

**Karar Tarihi: 11.07.2013**

**KARAR NO: 2013.05.03**

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'un yaptığı Biol. Leyla AKSUT'un Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2013/50 protokol nolu "Metotreksatin Neden Olduğu Testis Hasarına Karşı Curcuminin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	-	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	