



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METHOTREXATE
KAYNAKLI TESTİS HASARINA KARŞI E
VİTAMİNİNİN KISA SÜRELİ KORUYUCU
ETKİLERİ**

Şeyma KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON – 2015

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Şeyma KURT'un hazırladığı "Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı E Vitamininin Kısa Süreli Koruyucu Etkileri" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

Doç. Dr. Şafak ERSÖZ

Tarih: 25 / 02 /2015

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25/02/2015
Şeyma KURT

İTHAF

Bu yüksek lisans tezimi hayatımın her döneminde desteklerini benden esirgemeyen, büyük emek ve fedakarlıkla bugüne kadar benim için gerekli her türlü imkanı sağlayan değerli aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans danışmanlığımı üstlenen, her türlü desteğini ve bilgilerini bizimle paylaşan ve ihtiyacımız olduğunda hep yanımızda olacağına inandığım sevgili hocam Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU' na, yüksek lisansa başladığımız ilk günden bu yana desteğini ve bilgi birikimini bizden esirgemeyen anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Engin YENİLMEZ' e, yine çalışmamda büyük desteği olan Araş. Gör. Dr. A. Uğur AKMAN' a, hayatımın her döneminde görüşmek istediğim ve her zaman yanımda olan canım arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Fidan KOÇ' a, birlikte bu bölüme başladığımız arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Beyza AYAN' a, yardım ve katkılarından dolayı doktora öğrencileri Sibel TÜREDİ ve Hatice HANCI' ya, yüksek lisans tezim vasıtasıyla tanıştığım yardımlaşma ve dayanışmanın en güzel örneğini bana gösteren ve tezimin istatistik çalışmasında büyük emekleri geçen KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nazım Ercüment BEYHUN' a ve Araş. Gör. Volkan KARABACAK' a, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĞ ve Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU' na, bölümümüzden mezun oldukları halde bizden yardımlarını hala esirgemeyen Gülsen YILMAZ ve Cansu ÖZYILMAZ ALTUN' a, son olarak hayatımın her döneminde arkamda olduklarını bildiğim canım aileme ve hep yanımda desteğini hissettiğim sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Testis Embriyolojisi	4
4.2. Testis Anatomisi	5
4.3. Testis Histolojisi	7
4.3.1. Seminifer Tübüller	7
4.3.2. Seminifer Epitel	8
4.3.3. Sertoli ve Leydig Hücreleri	8
4.3.4. Spermatogenik Hücreler	10
4.3.5. Spermatogenez	11
4.3.5.1. Spermatogonial Faz (Spermatositogenez)	11
4.3.5.2. Spermatosit Fazı (Mayoz)	12
4.3.5.3. Spermiyogenez	12
4.3.6. Seminifer Epitel Siklusu	13
4.4. Apoptoz	14
4.4.1. Germ Hücrelerinde Apoptoz	15
4.5. Metotreksat	15
4.5.1. Etki Mekanizması	15
4.5.2. Yan Etkileri ve Toksisitesi	16

4.6. E Vitamini	17
4.7. Akım Sitometri	18
5. GEREÇ ve YÖNTEM	20
5.1. Deneysel Çalışma Planı	20
5.1.1. Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Temini	20
5.1.2. Sıçanların Çalışma Süresince Bakımı ve Laboratuvar Şartları	20
5.1.3. Çalışma Grupları	21
5.1.4. Testis Dokularının Elde Edilmesi	22
5.1.5. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı	22
5.1.6. Kesitlerin Alınması	23
5.1.7. Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin (H.E.) ile Boyanması	23
5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler	24
5.2.1. TUNEL Boyama	25
5.3. Akım Sitometrik Analiz	26
5.4. İstatiksel Analiz	26
6. BULGULAR	27
6.1. Testis Ağırlıklarına Ait Bulgular	27
6.2. Morfometrik Bulgular	27
6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular	27
6.3. Jhonsen Skorumu Sonuçları	28
6.4. Akım Sitometrik Değerlendirme	29
6.5. Histopatolojik Değerlendirmeler	29
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
8. KAYNAKLAR	38
9. ETİK KURUL ONAYI	47
10. ÖZGEÇMİŞ	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikleri	21
Tablo 2. Deney Gruplarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar	27
Tablo 3. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	28
Tablo 4. Çalışma Gruplarına Ait Jhonsen Skorlama Sistemi Değerlendirme Sonuçları	28
Tablo 5. Çalışma Gruplarına Ait Akım Sitometrik Değerlendirme Sonuçları	29
Tablo 6. Çalışma Gruplarına Ait Apoptotik İndeks Değerlendirme Sonuçları	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Metotreksat' ın Kimyasal Yapısı	16
Şekil 2. E Vitamininin Moleküler Yapısı	17

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Seminifer Tübülün Genel Histolojik Yapısı. İnterstisyel Alan (★), Leydig Hücresi (➡), Spermatogonyum (➡), Spermatozoonlar (▲) (H&E, X400)	11
Resim 2. A ve B, Deney Hayvanlarının Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler	20
Resim 3. Testislerin Çıkarılması (A). Testisin Makroskopik Görüntüsü (B)	22
Resim 4. Kontrol (A) ve E Vitamini (B) Gruplarına Ait Testis Dokuları. Kontrol Grubuna Ait Normal Yapıdaki Testis Dokusunda Seminifer Tübüller (★) ve Aralarındaki İnterstisyel Doku (▲) Görülmektedir (H&E, X400)	30
Resim 5. MTX (A) ve MTX+E (B) Vitamini Gruplarına Ait Testis Dokuları. Seminifer Tübülde Vakuoller (★) ve Lümene Dökülen Olgunlaşmamış Germ Hücreleri (➡) Dikkat Çekmektedir (H&E, X400)	30
Resim 6. Kontrol Grubuna Ait Testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400)	31
Resim 7. E Vitamini Grubuna Ait Testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400)	32
Resim 8. MTX Grubuna Ait Testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400)	32
Resim 9. MTX+ E Vitamini Grubuna Ait Testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400)	33

KISALTMALAR, SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AI	Apopitotik İndeks
AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
DHFR	Dihidrofolat Redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
H.E.	Hematoksilen ve Eozin
IM	Işık Mikroskobu
i.p.	İntraperitoneal
LH	Luteinize Edici Hormon
MTX	Metotreksat
PBS	Phosphate Buffer Solution
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SRY	Cinsiyet belirleyici bölge Y
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TdT	Terminal Deoxynucleotidy Transferase
THF	Tetrahidrofolat
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxyuridine Triphosphate Nick and Labeling Assay

Simgeler

cm	Santimetre
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
gr	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram

mL	Mililitre
mm	Milimetre
sn	Saniye
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
%	Yüzde

Formüller

H₂O₂ Hidrojen peroksit

1. ÖZET

Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı E Vitamininin Kısa Süreli Koruyucu Etkileri

Bu çalışmada sıçanlarda Metotreksat (MTX) kaynaklı testis hasarına karşı E vitamininin kısa süreli koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 32 adet erişkin erkek *Sprague dawley* tipi sıçan kullanıldı. Her grupta 8 adet sıçan bulunacak şekilde dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi (5 gün) boyunca intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik verildi. MTX grubuna sadece çalışmanın ilk günü 20 mg/kg i.p. olarak uygulandı. E vitamini grubuna 5 gün boyunca 100 mg/kg i.p. olarak uygulandı. Tedavi (MTX+E vitamini) grubundaki sıçanlara ise çalışmanın ilk günü 20 mg/kg i.p. MTX uygulandı ve daha sonra ilk günde dahil olmak üzere 5 gün boyunca 100 mg/kg i.p. olarak E vitamini uygulandı. Deney süresinin bitiminde tüm hayvanlar sakrifiye edilerek testisleri alındı. Testis doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Testisteki apoptozisi değerlendirmek için TUNEL tekniği kullanıldı. Testis doku örneklerinin bir kısmı ise enzimatik parçalama yöntemi ile süspansiyon haline getirildikten sonra akım sitometrik incelenmesi yapıldı.

Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda, kontrol grubu sıçanlarının testis yapısı normal olarak izlendi. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümenlerinde immatür germinal hücreler, bazal kompartımanında açılma ve germinal epitelde yer yer vakuolizasyon izlendi. Aynı grubun morfometrik ölçümlerinde, seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. MTX+E Vitamini grubundaki apoptoz indeksi ise MTX grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. MTX+E Vitamini grubunda testis histolojisinde MTX'in oluşturduğu bozuklukların önemli ölçüde düzeldiği belirlendi. E vitamini grubundaki tübüller normal yapıda izlendi. Akım sitometrik bulgularımızın da bu sonuçları desteklediğini belirledik.

Elde ettiğimiz bulgularımız MTX'in testiste yapısal bozukluklar oluşturduğunu; E vitamininin koruyucu etkisiyle, MTX' in testiste oluşturduğu bu hasarı düzelttiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Akım sitometri, E vitamini, Metotreksat, Sıçan, Testis

2. SUMMARY

Short-Term Protective Effects of Vitamin E Against Methotrexate-Induced Testis Damage in Rats

The aim of this study was to investigate short-term protective effects of vitamin E against MTX induced testis damage in rats.

In this experiment, thirty two male rats were used. They were divided into four groups of eight rats. Rats of control group were injected intraperitoneally (i.p.) with physiological saline for five days. Just for the first day of the experiment, 20 mg/kg of MTX was injected i.p. to the rats of MTX group. For five days, the rats of vitamin E were dosed by i.p. with 100 mg/kg of vitamin E. The rats of treatment group (MTX+vitamin E) were injected with 20 mg/kg of MTX on the first day of the study and for five days (including the first day) they were dosed by i.p. with 100 mg/kg of vitamin E. All animals were sacrificed and their testicles extracted at the end of the experimental period. Testicular tissue samples were evaluated histopathologically under light microscope. The TUNEL technique was used to determine apoptosis. A portion of the testicular tissue were suspended by means of enzymatic digestion and this solution was used for flow cytometric analysis.

Histopathologically, the structures of the testicular tissue in control group was observed normally. Testicular tissue in the MTX group exhibited dehiscence in some parts of basal membrane of seminiferous tubules, immature germinal cells in the lumen of the seminiferous tubules and places vacuolization in the germinal epithelium. The diameter of seminiferous tubules and thickness of germinal epithelium were both smaller than in the control group. The apoptotic index in the MTX+Vitamin E group showed significantly decreased when compared to the MTX group. In the MTX+Vitamin E group, methotrexate-induced testis damage was significantly reduced. The structures of the seminiferous tubules was observed normally in the vitamin E group. Flow cytometric data were supported by other data.

In summary, vitamin E reduces significantly the MTX-induced testicular damage.

Key Words: Flow cytometry, Methotrexate, Rats, Testis, Vitamin E

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Metotreksat (MTX) folik asit analogudur ve yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır (1, 2). Sitotoksik etkisi, doğrudan kanser hücreleri için seçici olmadığından proliferasyon hızı yüksek dokuları da etkiler (1). Lösemi lenfomaları başta olmak üzere meme kanseri, osteosarkom, baş ve boyun kanserleri, akciğer kanseri, üroepitelyal kanserler gibi solid organ tümörlerinin tedavisinde kullanılır (3). MTX deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini ve hücre bölünmesi için gerekli olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe eder (4). Bu işlevi DHF' ı tetrahidrofolata (THF) çevirerek yapar ve hem pürin hem de pirimidin sentezi azalır (2, 5). MTX pürin ve pirimidin metabolizmasını ve DNA sentezini de içeren birçok metabolik yolu etkiler. Böylece MTX' in hem tedavi edici etkisi hemde toksik etkileri meydana gelir (4).

MTX' in karaciğer, böbrek, ince barsak, kemik iliği, akciğer gibi organlar üzerinde önemli toksik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (6). Farelerde yapılan çalışmada germ hücrelerinde de MTX' e bağlı toksisitenin meydana geldiği belirtilmiştir (7). Bu yan etkilerin çoğunda reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif stres sonucu oluştuğu bilinmektedir (8, 9, 10).

E vitamini yağda çözünebilen, non-enzimatik, antioksidan olarak bilinen, vücut için en önemli vitaminlerden biridir (11). Biyolojik membranlar içinde yer alan E vitamini, oksidatif stresi inhibe eden doğal bir antioksidan olarak bildirilmiştir (12). Antioksidan etkisi doğrudan serbest radikalleri tutarak gerçekleşir (13). E vitamini hücre zarının yapı bütünlüğünü korur ve üreme fonksiyonlarını destekler. Oksidatif strese bağlı üreme sistemi hasarını, oksidatif hasarın yol açtığı anormal testis morfolojisini ve testis değişikliklerini engellediği belirtilmiştir (14).

Bu çalışmanın amacı, MTX uygulandıktan sonra kısa süreli verilen (5 gün) E vitamininin testisler üzerinde herhangi bir antiapoptotik veya antioksidatif etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Yapılan araştırmalar doğrultusunda kaynaklarda, MTX kaynaklı hasar oluşumuna karşı kısa süreli verilen E vitamininin testisler üzerinde olumlu bir etkisinin olup olmadığına dair bir bilgiye rastlanmadığından yapacağımız çalışmanın bu boşluğu dolduracağı ve E vitamininin antioksidan özelliği de düşünülerek olumlu sonuç alınacağı düşünülmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

Erkek genital organları iç genital organları ve dış genital organları olmak üzere ikiye ayrılır. Dış genital organları penis ve skrotum oluşturur. İç genital organları ise testis, epididimis, duktus deferens, vezikula seminalis, prostat ve bulboüretral bezler oluşturur (15).

4.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun kromozal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonla belirlenir. Gonadların erkek ve dişiliğe farklılaşmaları, yani gonadal cinsiyet, yedinci haftada olur ve XX, XY kompleksine bağlıdır.

Gonadlar üç yerden köken alarak gelişirler:

- 1- Posterior karın duvarını döşeyen sölom epiteli (mezotelyum)
- 2- Sölom epiteli altındaki mezenşim
- 3- İlkel cinsiyet hücreleri (primordial germ hücreleri) (16).

Gonadlar (testis ve over) bir çift uzunlamasına gonadal sırt şeklinde belirirler. İnsan embriyosunda primordial gonadın mezenşimal kısmı, embriyonun 10-12. dorsal segmentleri arasında gelişir. Primordial germ hücreleri epiblasttan köken alır ve primitif çizgi boyunca göç ederler. Gelişimin üçüncü haftasında ise allantoise yakın bir yerde yolk kesesinin duvarında endoderm hücrelerinin arasında ortaya çıkarlar. Germ hücreleri, dördüncü haftada ameboid hareket ederek son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar. Altıncı haftada ise genital sırtlara ulaşmış olurlar ve böylece farklılaşmamış olan fetal gonadlar gebeliğin altıncı haftasında ortaya çıkmış olurlar (17, 18).

Embriyonal gelişimin 7. haftasıyla birlikte embriyo, erkeklik ya da dişilik yönünde gelişmeye başlar. Genetik olarak ilkel germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY ise farklılaşmamış gonad testis yönünde gelişir. Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunan testis belirleyici geni (SRY) farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişmesini sağlayan testis belirleyici faktörü (TDF) kodlar. TDF'nin etkisi altında primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Yine TDF'nin etkisi ile primer seks kordonları medullanın derinlerine doğru ilerlemesine ve

testis veya medullar kordonların biçimlenmesine sebep olur. Testis kordonları gonadların hilusuna doğru ağ şeklinde birbirleri ile anastomoz yaparak, rete testis tübüllerinin oluşumunu sağlar. Primer seks kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantısı tunica albuginea denilen kalın fibröz kapsülün araya girmesi ile son bulur. Tunica albuginea 12. haftada gelişmiş olur (18, 19, 20, 21). Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mesorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tübülü rekti ve rete testise farklıdır (20).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları—testosteron ve andosteron- salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalin maskulin olarak farklılaşmasını indüklerler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lümen gelişir (20). Seminifer tübüller kanallara açılır. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur. Bunlar; testisin yüzey epitelinden gelişen destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve primordial germ hücrelerinden farklı spermogoniumlardır (18, 19, 20). Testisler ve skrotum dahil erkek dış genital yapılar ise 10- 15. haftalar arasında oluşur (18, 22).

4.2. Testis Anatomisi

Testisler erkekte temel üreme organı olup, testis torbası (skrotum) içinde yer alırlar. Skrotum içinde yer alan her bir testis tunika albuginea olarak adlandırılan kalın bir kapsül ile sarılıdır. Oval şekilde (herbiri 2.5×3×5 cm boyutlarında, 10-15 gr ağırlığında) çift olan testisler, erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar ile erkek seks hormonları olan androjenleri üretir (23). Testislerin dış ve iç iki yüzü (facies medialis, facies lateralis), ön ve arka iki kenarı (margo anterior, margo posterior), üst ve alt olmak üzere iki ucu (extremitas superior, extremitas inferior) vardır (24, 25).

Testis tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa ile sarılmıştır. Bu üç tabaka testis kapsülü olarak isimlendirilir.

İntrauterin hayatta karın boşluğunda yer alan testisler, doğumdan hemen önce kanalis inguinalisten geçerek skrotuma iner. Bu geçiş sırasında karın boşluğunda kendisini saran periton kesesini de beraberinde taşır. Doğumdan sonra bu kese periton boşluğuyla ilişkisini keserek tunika vajinalis adını alır. Tunika vajinalisin skrotumun iç yüzünü döşeyen parietal yaprağı (periorşium) ile testisin üzerini örten visseral yaprağı (epiorşium) arasında çok az miktarda seröz sıvı bulunur (24, 26). Testise gelen ve testisten çıkan damar ve sinirler de testisin skrotuma inişi sırasında onu takip ederler. Bu oluşumlar bir araya gelerek funikulus spermatikus denen bir kordon oluşturur. Funikulus spermatikus testisin skrotumda asılı durmasını sağlayan yapıdır (26, 27).

Testisin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup, visseral periton (epiorşium) ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı peritonla örtülüdür. Peritonsuz olan medial bölümüne epididimis tutunur ve buradan damar-sinirleri ve kanalları geçer (15).

Tunika albuginea, testisi saran mavimsi beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Bu tabakayı arka kenarı hariç olmak üzere epiorşium örter. Peritonun bulunmadığı arka kenara epididimis tutunur ve buradan testisin damarları girip çıkar. Tunika albuginea, arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denilir (28, 29). Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Tunika albugineanın iç yüzeyine tutunan bu uzantılar testisi lobüllere ayırır. Her lobül içinde de tubuli seminiferi kontorti denen kanalcıklar bulunur. Spermiumlar bu kanalcıkların duvarlarında gelişmelerini tamamlar. Seminifer tübüllerin başlangıç kısmı kıvrıntılı, son kısmı ise düzdür. Tubuli rekti denilen bu düz kısımlar mediastinum testisin fibröz dokusuna sokulur. Burada kanalların anastomozu sonucu rete testis denilen ağ oluşur. Rete testisi yapan kanalcıklar mediastinum testisin üst ucunda duktuli efferentes denilen kanallarla devam ederler. Duktuli efferentes ise tunika albugineayı delerek testislerden epididimise geçer (15).

Tunika vaskulosa, tunika albugineanın iç yüzeyinde bulunan damar ağ tabakasıdır. Tunika albugineanın iç yüzünü ve testis içindeki tüm lobüllerin yüzlerini örter (25). Testisler aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Herbir testisin arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis denilen venöz ağ

yaparlar. Bu venöz ağdan önce iki sonra bir vena testikularis oluşur. Sağ vena testikularis vena cava inferiora, sol vena testikularis ise vena renalis sinistraya açılır (26).

4.3. Testis Histolojisi

Testislerin iki yönlü görevleri hormon ve spermatozoon üretiminin sağlanmasıdır (22). Testisler hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bezlerdir (28). Spermium ve testis sıvısı ekzokrin salgısını, testosteron ise endokrin salgısını oluşturur. Bu sebeple de testisler hem üreme hem de hormon salınımı görevlerini yapar (29, 30). Testislerin içinde asılı pozisyonda durduğu deri ve fibromusküler bir yapı olan skrotum yağ dokusuna sahip olmadığından, damardan ve ter bezinden zengin olduğundan dolayı testis ısısının karın içinden daha düşük olmasını sağlar (22, 31).

Testisin ışık mikroskopik incelenmesinde, testisin en dışta kalın sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea ile çevrildiği görülür. Kapsülün iç kısmı tunika vaskuloza, kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan oluşur. Tunika albuginea testisin arka yüzeyinde kalınlaşarak mediastium testisi oluşturur. Buradan bezin içine doğru fibröz uzantılar yaparak testiste yaklaşık 250 adet testiküler piramidal bölmeleri oluşturur. Her bölmede 1-4 olmak üzere her testiste yaklaşık 250-1000 adet seminifer tübül yer alır. Seminifer tübüller arasını da interstisyel (ara) alan oluşturur. Her tübül bu piramidal bölme içinde kıvrımlar oluşturur. Bu tübüllerin ucu düz bir parça olarak devam ederek tübülüs rektus adını alır. Bunlar da birleşerek rete testisi oluşturur. Tübüller arasındaki interstisyel alanda kapillerler (kan ve lenf damarları), sinirler, Leydig hücreleri (interstisyel hü.) ve makrofajlar bulunur. Leydig hücreleri androjenleri salgılar (22).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her tübül 0.2 mm çapta, 30-70 cm uzunluktadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 m' dir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz

yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (22, 31).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal (seminifer) epitelden oluşur. Germinal epitel, sperm üretimini sağlayan spermatojenik hücreler ile gelişmekte olan sperm hücrelerinin beslenmelerinden sorumlu olup, bölünme yetenekleri bulunmayan destek yani Sertoli hücrelerinden oluşur (17, 22, 32).

4.3.2. Seminifer Epitel

Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir; Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan hücreler. Spermatogonik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Spermatozoon üretimi, spermatogenez olarak adlandırılır (22).

4.3.3. Sertoli ve Leydig Hücreleri

Seminifer tübüllerde bulunan bir diğer hücre de Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Işık mikroskopunda, Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, bunun sebebi ise spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantılardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar kaba endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiği bildirilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nükleusta çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir nükleolus ve az miktarda heterokromatin görülür. Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, içine kanda bulunan metaryallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur.

Spermatozidler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri sıkı bağlantılar (gap junction) denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Sertoli hücrelerinin başlıca en az dört önemli fonksiyonu vardır:

- Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi
- Fagositoz: Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir ve sindirilir.
- Sekresyon: Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.
- Anti-Müllerian Hormon üretimi: Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallardan köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, X-ışını ışınımı gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenez seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler. Memelilerde spermatozoonların salınımı muhtemelen hücre hareketlerinin bir sonucudur. Bu hareket Sertoli hücrelerinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlanır.

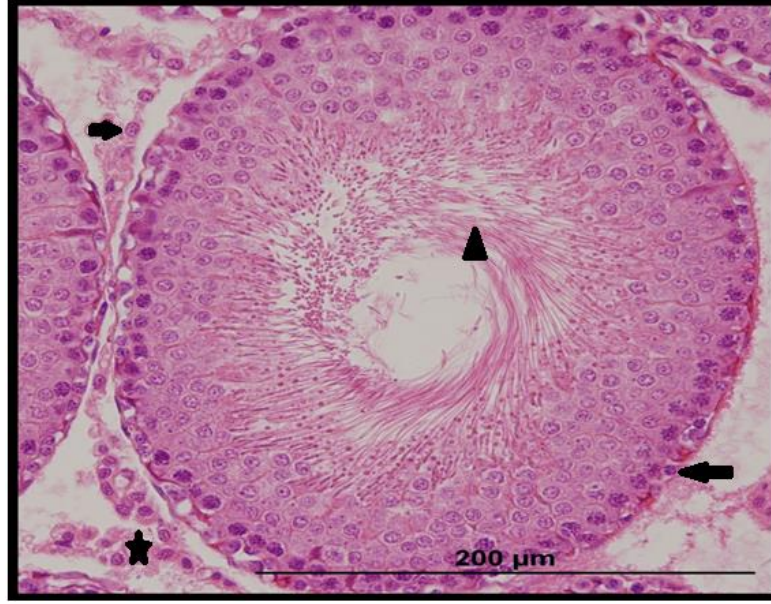
Testisin seminifer tübülleri arasındaki interstisyel dokuda bağ dokusu, sinirler, kan ve lenfatik damarlar bulunmaktadır. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan

proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organda alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının birleşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir. Bunlar arasında fibroblast, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, Mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nukleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur.

Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreleri hamileliğin 18. haftasına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan lüteinize edici hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar (22, 33).

4.3.4. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler düzenli olarak bölünen hücrelerdir. Bu bölünmeler sonunda olgun spermelere farklılaşırlar. Seminifer tübülü döşeyen spermatogenik hücreler, dört-sekiz katlı tabaka içeren çok katlı epiteli oluştururlar. Bu hücreler bazalden lümene doğru; spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar olarak dizilirler (Resim 1) (34, 35, 36).



Resim 1. Seminifer Tübülün Genel Histolojik Yapısı. İnterstisyel Alan (★), Leydig Hücresi (→), Spermatogonyum (←), Spermatozoonlar (▲) (H&E, X400).

4.3.5. Spermatogenez

İnsan vücudundaki hücreyel farklılaşma olaylarından biri, spermatogoniumdan olgun spermiumun geliştiği süreç olan spermatogenezdir. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir.

4.3.5.1. Spermatogonial Faz (Spermatositogenez)

Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogoniumlar, küçük diploid germ hücreleridir, puberteye kadar bölünmezler. Pubertede spermatositogenez başlar, spermatogoniumlar mitoz bölünme ile çoğalarak, yerlerine yeni gelecek spermatogoniumları ve en nihayetinde primer spermatositleri oluşturur. Spermatogoniumlar 3 tipe ayrılır. Birincisi koyu tip A spermatogoniumlardır. Bunlar koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik nükleuslara sahip, küçük hücrelerdir. Seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler. Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem koyu tip A spermatogoniumları, hem de açık tip A hücreleri meydana getirirler. İkincisi açık tip A spermatogoniumlardır. Ökromatik nükleuslarının soluk görüntüleri dışında, koyu tip A hücrelerle aynı özelliklere sahiptirler. Bunlar testosteron etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yeni açık tip A hücreleri ve tip B hücreleri meydana getirirler. Üçüncüsü ise tip B spermatogoniumlardır. Oval yerine

yuvarlak olan nükleusları dışında açık tip A spermatogoniumlara benzerler. Mitozla bölünerek primer spermatozoidleri meydana getirirler.

4.3.5.2. Spermatozoid Fazı (Mayoz)

Her bir primer spermatozoid mayoz başlamadan önce DNA' larını replike ederler, diploid kromozoma ve $4n$ miktarda DNA' ya sahip olur. Art arda gelen iki mayoz bölünme, hem kromozom sayısında, hem de DNA miktarında azalma ile sonuçlanır. Birinci mayoz bölünme sonunda, $2n$ miktarda DNA' ya ve haploid kromozom sayısına sahip iki adet sekonder spermatozoid oluşur. İkinci mayoz bölünme ile her bir sekonder spermatozoidten haploid (n) miktarda DNA' ya ve aynı miktarda kromozoma sahip iki adet spermatid oluşur. Dolayısıyla, iki mayoz sonunda, dört adet haploid spermatid meydana gelir.

Oldukça kısa süre yaşayan sekonder spermatozoidler, seminifer epitelde kolayca izlenemez. Primer spermatozoidin yarısı büyüklüğündeki bu hücreler, $2n$ miktarda DNA' ya sahiptir, kromozomlarını replike etmeden hemen ikinci mayoz bölünmeye girer. Her bir sekonder spermatozoid, her biri iki kromatide sahip 22 otozomal kromozomla, bir adet X veya Y kromozomuna sahiptir. İkinci mayoz bölünme tamamlandığında, nükleer membranlar yeniden oluşur; bir sekonder spermatozoidten, her biri 22 adet tek zincirli kromozoma ve n DNA miktarına sahip iki haploid spermatid meydana gelir.

4.3.5.3. Spermiojeniz

Spermatidler, hücreler arası sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlıdır. Haploid spermatidler, olgun spermiumu meydana getirecek olan ve spermiojeniz olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecine girerler. Yoğun bir yeniden yapılanma süreci olan spermiojeniz dört dönemden oluşur.

1. Golgi Dönemi: Bu aşamada, spermatidin granüllü endoplazmik retikulumunda hidrolitik enzimler oluşur, bunlar Golgi komplekslerinde modifiye olur ve küçük pre-akrozomal granüller olarak paketlenir. Glikoproteinden zengin olan bu granüller birbirleriyle birleşerek akrozomal vezikülü oluşturur. Nükleus membranı ile ilişkili olan bu vezikülün yerleşimi, gelişen spermiumun ön kutbunu belirler. Aynı zamanda bu aşamada, sentrioller jukstanükleer bölgeden, akrozom vezikülünün zıt kutbuna, yani spermatidin posterior kutbuna göç ederler. Sentriollerin biri, sperm kuyruğunun

aksonemini oluşturan dokuz periferik ve iki santral (9+2) mikrotübül oluşumunu başlatırken, diğeri nükleus ile kuyruğu birleştiren bağlantı parçasını meydana getirir. Sentiollerin bu göçü, başka bir hücre tipinde görülmez.

2. Cep (Kep-şapka) Dönemi: Bu aşamada boyutu büyüyen akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerine doğru akrozom adını alır. Akrozom, altındaki nükleer membranla kısmen ilişkilidir, bu bölgedeki membran normalde var olan nükleer porlarını kaybeder ve kalınlaşır.

3. Akrozom Dönemi: Nükleusun kromatini yoğunlaşır, nükleus yassılaştır ve spesifik şeklini alır. Nükleus ve üzerindeki akrozom, üstteki plazma membranının hemen altına doğru hareket ederken, sitoplazma posterior tarafa doğru yer değiştirir. Mitokondriler sitoplazmanın arka kısmına doğru hareket ederek, heliks şeklinde fibrilleri sarar. Spermium hareketi için gereken enerjinin sağlanmasında mitokondriler anahtar rol oynar. Bu bölge spermium kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinde iki longitudinal piramit ve çok sayıda bağlantı biriminden oluşan fibröz bir kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal fibrilini sarar ve hemen hemen kuyruğun sonuna kadar uzanarak esas parçayı oluşturur. Fibröz kılıfın distalinde kalan kısa kuyruk parçası ise son parça adını alır.

4. Olgunlaşma Dönemi: Bu aşama fazla sitoplazmayı azaltmaya yönelik bir işlemdir. Sertoli hücreleri fazla sitoplazmayı fagosite eder. Hücreler arası köprüler, bu fagosite edilen artık cisimlerde kalırlar. Dolayısıyla spermatidler artık birbirlerine bağlı değildirler. Farklılaşma işlemi sona eren spermiumun tübül lümenine salınması işlemine spermiasyon adı verilir.

4.3.6. Seminifer Epitel Siklusu

Farklılaşan spermatogenik hücreler, seminifer epitel içinde rastgele dağılmazlar, belli hücre tipleri bir arada bulunurlar. Bu gruplaşmalar, hücreler arasındaki köprüler nedeni ile oluşur. Bütün farklılaşma aşamaları, seminifer tübülde belirli bir zamanda meydana gelir (37). İnsan ve sıçanlarda spermatogenez süreci çok benzer olmasına karşın bazı farklılıklar içermektedir. Erkek sıçanlarda testislerin skrotuma inmesiyle beraber ilk sperm üretimi yaklaşık 45. günde başlar ancak optimum üretim 75 günde gerçekleşir (38). İnsanda spermatogenezin altı aşamada gerçekleştiği ve yaklaşık 74 gün

sürdüğü görülürken sıçanlarda spermatogenez süreci yaklaşık olarak 53 gün sürer (37, 39). Sıçanlarda her bir tübülün uzunluğu boyunca farklı aşamalar bir düzen içerisinde art arda izlenebilir. Ancak insanlarda tübül duvarı boyunca her bir bölge farklı aşamalarda olabilir, yani alınacak enine bir kesitte aynı tübül içinde değişik aşamalara rastlamak mümkündür (37). İnsanlarda her spermatogenez siklusu 12-16 gün alırken, sıçanlarda ise spermatogenez 15. günde başlamasına rağmen sperm üretimi 45 günde başlar ve her siklus yaklaşık olarak 12 gün sürer (37, 40, 41).

4.4. Apoptoz

Önemli morfojenetik işlemlerden biri olan, vücut işlevleri ve sağlık için en az hücre çoğalması kadar önemli olan programlı hücre ölümüne apoptoz denir (22, 42). Apoptoz hücrenin hayat çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde ve hücre DNA' sında meydana gelen mutasyonlar kanser hücrelerinin oluşumuna neden olabileceği için bu hasarlı hücrelerin programlı olarak öldürülmesinde görev alır (42). Apoptoz ilk defa, gelişen embriyoda keşfedilmiştir. Embriyonun şekillenmesi (morfojeniz) için programlı hücre ölümü temel bir olaydır (22). Apoptoz olayı embriyonik aşamada kalmayıp ergin aşamasında da devam etmektedir (42).

Apoptozda, hücre ve çekirdeği, hacmini küçülterek yoğunlaşmaya başlar, hücre büzülür, hücre yüzeyinde kabarcıklar oluşur ve DNA' da kopmalar meydana gelir (22, 42). Memelilerde T ve B lenfositlerde apoptoz olayı görülmektedir. Programlı hücre ölümü kanser, AIDS, immün hastalıklar ve merkezi sinir sisteminin dejeneratif hastalıklarında rol oynayabilir.

Apoptotik hücreler genellikle mononükleer fagositik sistem hücrelerince fagosite edilirler (42). Apoptoz sırasında sitoplazmik büyük veziküller (kabarcıklar) oluşur ve bunlar hücre yüzeyinden ayrılırlar. Bu ayrılmış parçalar plazma zarı ile çevrilidir; böylece tüm hücre kalıntıları, başlıca makrofajlar tarafından kolayca yutulurlar ya da fagosite edilirler. Bununla birlikte, apoptotik parçalar makrofajda yangı olayını başlatacak moleküller üretilmesine neden olmazlar (22).

Apoptoz mekanizmalarında meydana gelen sapmaların kanser oluşumuna yol açtığı yapılan bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Apoptoz aynı zamanda kanserli,

enfekte olmuş ve yaşlanmış hücrelerin vücuttan atılmasını sağlayan ve sağlıklı bir yaşam için gerekli olan bir işlemdir (42).

Apoptoz mekanizmaları hakkında belirli bir genetik kontrol altında gerçekleşen programlı hücre ölümü ile ilgili olarak birkaç mekanizma açıklanmıştır.

1. Kaspazlar aracılığı ile hücre ölümü
2. Ölüm sinyalleri aracılığı ile hücre ölümü
3. Kaspaz aktivitesi olmadan hücre ölümü
4. Apoptozda görev yapan diğer proteinler (43).

4.4.1. Germ Hücrelerinde Apoptoz

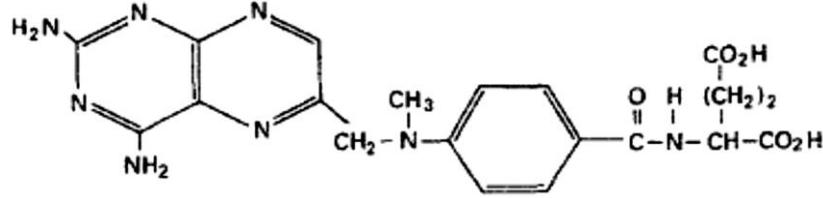
Spermatogenezde birçok türde ortak olan bir özellik, germ hücrelerinin çoğunluğunun farklı gelişim aşamalarında, apoptoz yoluyla ölümüdür. Germ hücrelerinin yaşaması ya da ölmesi, son derece kompleks bir sinyal ağı tarafından belirlenir. Bcl-2 ailesinde yer alan proteinler, germ hücresi homeostazisi için yaşamsal olan bir sinyal yolunu oluşturur. Bu ailenin bazı üyeleri (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1) hücrenin yaşaması yönünde sinyal iletirken, diğer bazı üyeleri (Bax, Bak ve Bim) ise ters uyarıyı yapar. Apoptoz, germ hücrelerinin sayısının ve Sertoli hücreleri ile aralarındaki oranın belirlenmesinde çok önemli bir faktördür. Hücrelerin ne kadarının apoptoz yoluyla ölüme gittikleri tam olarak belli değildir. Herhangi bir aşamada gelişimlerini tamamlayamayan veya hasar gören germ hücreleri de selektif olarak apoptozla yok edilir. Radyasyon, toksik maddeler, gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) antagonisti ile yapılan tedaviler, ısı ve stres apoptozu hızlandırabilir (37).

4.5. Metotreksat

4.5.1. Etki Mekanizması

İlk olarak 1948 yılında çocuklarda akut lösemi tedavisinde kullanılan Metotreksat (MTX), bir folik asit antagonistidir (44). Hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeni ile kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır (45). MTX, 40 yılı aşkın süredir lösemiler, solid tümörler, psöriasis, sarkoidoz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, vaskulit, romatoid artrit ve diğer bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılır. S fazındaki hücreleri etkileyen MTX dihidrofolat analogudur. MTX geri

dönüşümsüz olarak, hücre replikasyonunda anahtar enzim olan dihidrofolat redüktazı inhibe eder. Buna bağlı olarak pürin ve pirimidin yapımında gerekli tetrahidrofolat sentezi inhibe olur. Apoptozla sonuçlanan DNA defektleri, pürin ve pirimidin sentezinin inhibe edilmesi ile oluşur (46, 47, 48). MTX' in kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir:



Şekil 1. Metotreksat' ın Kimyasal Yapısı (2).

4.5.2. Yan Etkileri ve Toksikitesi

Sitotoksik ilaçlar yalnız kanser hücelerine karşı değil, malign ve sağlıklı bütün hızlı bölünen hücreleri de etkilerler. Bu nedenle de yaygın toksik etkiler içerirler (49). MTX toksisitesinin mekanizması hala tam anlaşılammıştır. Ancak bazı yan etkiler; pürin, pirimidin, poliamin ve folik asid gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Kremer ve ark. ilk kez romatoid artritli karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamatlarının birikmesine, folik asid eksikliğinin eşlik ettiğini göstermiştir (50).

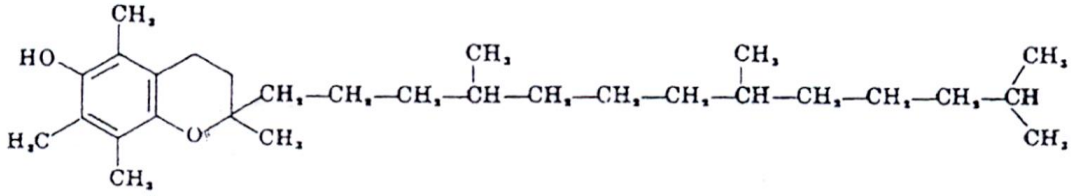
Metotreksat tedavisi esnasında ortaya çıkan toksik etkinin şiddeti değişkenlik göstermektedir. Bulantı, kusma, alopesi, dermatit, interstisyel pnömoni, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi istenmeyen etkilerin özellikle dozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (51-55). MTX' in uzun süre kullanımları ile hepatotoksisite, nefrotoksisite, pulmoner infiltrasyon ve fibrozise yol açtığı görülmektedir (56). MTX'in hepatotoksisite ve nefrotoksisite ile ilgili mekanizması konusunda en çok değinilen konu oksidatif stres (glutasyon seviyelerinin azalması) olmuştur (8).

Üreme sistemi hasarı ile ilgili oligospermi ve menstruel bozukluklar, oogenez ve spermatogenezde defektler, düşük ve teratojenite gibi yan etkileri bildirilmiştir (4, 55). Kemoterapi sonucu artan serbest radikaller testis dokusunda hasara neden olup, spermatogenezi olumsuz etkilemektedir (57). Modi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada MTX' in insan gonadlarında apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (58). MTX'

in testiküler toksisiteye etkisi doğrudan olabildiği gibi oksidatif stresle de indüklenebilir (59).

4.6. E Vitamini

E vitamini yağda eriyen, tokoferol ve tokrienol türevlerini kapsayan, zincir kırıcı antioksidan etkili bir vitamindir (60). E vitamininin ilk izole edilme tarihi 1936 yılındadır (61). E vitamininin aktif olan biyolojik şekline tokoferol denir ve 8 adet doğal olarak bulunan tokoferol vardır. Bunların içerisinde en yaygın olanı α -tokoferoldür (60). Alfa tokoferol antioksidanlardan biridir ve reaktif oksijen partiküllerinin meydana getirdiği hasarları önlemek için vücut tarafından geliştirilen antioksidan savunma sistemlerinde görev alır (62, 63). E vitamininin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir:



Şekil 2. E Vitamininin Moleküler Yapısı

Alfa-tokoferol oksijeni bağlayarak oluşabilecek hasarların önüne geçer. Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle meydana gelen lipid peroksidasyonunun nötralize edilmesinde E vitamini en etkili rolü oynar (64). Kanseri önleyici etkisinin yanında, DNA sentezinde rolü olduğu ve bağışıklık sistemi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (65).

Alfa-tokoferol anne sütünde oldukça fazladır. Özellikle doymamış bitkisel yağlarda, yeşil sebze ve meyvelerde, fındık, ceviz ve bademde zengin olarak bulunmaktadır (76).

İnce bağırsakların üst kısmından emilen E vitamini, lenf içerisinde şilomikronlarla taşınır (65). En çok yağ dokusunda olmak üzere tüm dokularda depolanır (67).

Günlük E vitamini ihtiyacının 10-12 mg olduğu ve çeşitli hastalıklarda 50-100 mg' dan 4000 mg' a kadar olan dozların tedavilerde kullanıldığı bilinmektedir (64). E vitamini yetersizliğinde sıçanlarda karaciğer nekrozuna ve bağışıklık sisteminin önemli

derecede etkilenmesine sebep olduğu bilinmektedir. E vitamininin çoğu enfeksiyona karşı direnci arttırdığı bilinmektedir (65).

4.7. Akım Sitometri

Doksanlı yılların tıp dünyasına kazandırdığı, tıbbın vazgeçilmez bir parçası haline gelen lazer teknolojisi tedavinin yanında, diagnoz ve prognoz alanlarında da hizmetimize girdi.

Akım sitometri, tek bir hücrenin birçok özelliklerinin aynı anda ölçümüne izin veren bir teknolojidir. Bu ölçümler hareket eden bir sıvı akımında (sanayide 500-4000 hücre hızla) yapılır. Floresan mikroskobuna göre çok daha hızlı, hassas ve kalitatif çok parametrelili analizler elde edilmesini sağlar. Genel olarak "Modern bir akım sitometri birkaç dalga boyu üzerinde reaksiyonları analiz edebilme kabiliyetine sahip bir spektrum analizörüdür." denilebilir.

Akım sitometri bir hücre hakkında şu tür bilgileri verebilir:

1. Relatif büyüklük
2. Relatif granülarite
3. Relatif floresan yoğunluğu.

Hücrelerin kabiliyetine göre optik-elektronik bağlama sistemi kullanan akım sitometri hücrenin merceklene lazer ışığının etkileşimini kaydeder:

1. Düşen ışığın yansıtması
2. Floresan yayma

Hücrenin ışığı yayması hücre ebadı, iç yapısı ve pürüzlülüğü ile yakından ilgilidir. Floresan yoğunluğu ise hedef antijenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Daha fazla floresan daha fazla hücre demektir.

Modern akım sitometrilere ışık kaynağı lazer ışını, akışkanlar hücre özelliklerini bozmayan izotonik sıvılar, optik elemanlar yansıtıcı ve alıcı dedektörler, bilgi işlem merkezi ise bilgisayarlardır. Lazer ışınının akışkan sıvı ile kesiştiği yer olan akış kamerası özel quartz' dan yapılmıştır. Elektronik ölçmenin ana temeli lazer ışığı ile etkileşime giren hücreden ortaya çıkan uyarılardır. Bütün uyarılar lazer ışınından geçen

bir partikülün saniye saniye hikayesidir. Uyarının yüksekliği lazer ışınına engel olan hücreden elde edilen maksimum sinyaldir. Bu sinyaller analogdan bilgisayarın kullanabileceği bir şekile yani dijitale çevirilir.

Kanserli hücre tanısında, AIDS hastalarının kanında CD4 lenfosit seviyesinin izlenmesinde, DNA analizinde, hücre yüzey markerları analizinde akım sitometri kullanılır (68).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deneysel Çalışma Planı

5.1.1. Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Temini

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi (KTÜ), Hayvan Deneyle Yel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve çalışmaya bu süreçten sonra başlandı (Tarih: 18.12.2013, Sayı: 700). Çalışmada kullanılan sıçanlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Çalışmada, 200-250 gr ağırlığında *Sprague dawley* cinsi 32 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenmesi, barınması ve deney süresince takibi için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan odalar kullanıldı. Çalışmada kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandığı için, deney sırasında sıçanlarda çevresel değişikliklerden kaynaklanan stres veya uyum problemi yaşanmadı.

5.1.2. Sıçanların Çalışma Süresince Bakımı ve Laboratuvar Şartları

Sıçanlar çalışma süresince, her zamanki beslenme ve barınma koşullarında bulundular. Deney süresi boyunca laboratuvardaki sıcaklık ortalama 22 ± 2 °C, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak tutuldu. Sıçanların bulunduğu ortama 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma koşulları sağlandı. Sıçanlara içme suyu olarak, cerrahi araştırma merkezinde normal şartlarda da kullanılan çeşme suyu verildi ve standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi ilave bir besin kullanılmadı. Çalışma süresince sıçanların barınmasında standart Tip III kafesler kullanıldı (Resim 2).



Resim 2. A ve B, Deney Hayvanlarının Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler.

5.1.3. Çalışma Grupları

Çalışma dört gruptan oluşturuldu ve her bir grupta eşit sayıda olacak şekilde sıçanlar rastgele olarak gruplara ayrıldı. Grupların özellikleri ve çalışma sırasında gruplardaki sıçanlara uygulanan işlemler Tablo 1’ de verilmiştir.

1. Grup: Kontrol grubu sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara deney süresi (5 gün) boyunca intraperitoneal (i. p.) olarak serum fizyolojik verilip çalışma süresince kendi kafeslerinde serbestçe beslenmeleri sağlandı.

2. Grup: MTX grubu sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara sadece deneyin ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. olarak uygulandı.

3. Grup: E vitamini grubu sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini i.p. olarak verildi.

4. Grup: MTX+E vitamini grubu sıçanlar (n=8): Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. olarak uygulandı ve deney süresince ilk günde dahil olmak üzere 100 mg/kg E vitamini i.p. olarak uygulandı.

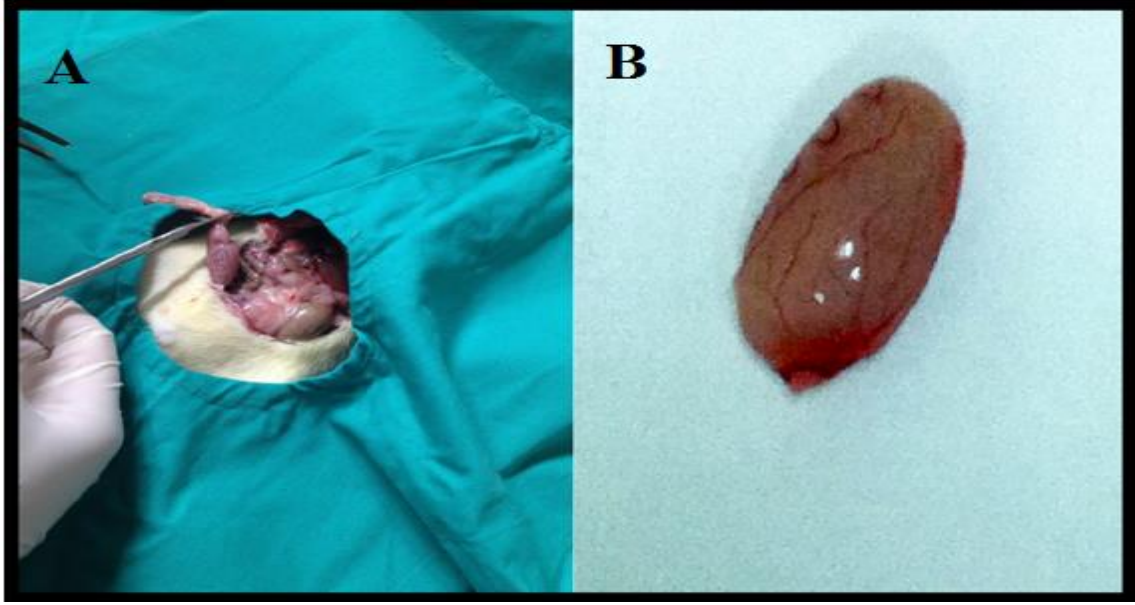
Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikler

Gruplar	Uygulama	Denek Sayısı
1. Grup (Kontrol Grubu)	5 gün boyunca sadece serum fizyolojik verildi.	8
2. Grup (MTX Grubu)	Sadece çalışmanın ilk günü 20 mg/kg MTX i.p. uygulandı.	8
3. Grup (E Vitamini Grubu)	5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini i.p. verildi.	8
4. Grup (MTX+E Vitamini Grubu)	Sadece çalışmanın ilk günü 20 mg/kg MTX (i.p.) ve 5 gün boyunca 100 mg/kg E vitamini(i.p.) uygulandı	8

Çalışmanın deney aşaması ve dokuların elde edilmesi işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi’nde özel olarak hazırlanmış hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Uygulamalar her gün aynı saatler arasında (saat 11.00-12.00 arasında) yapıldı. Deney süresinin bitiminde (5 gün sonunda) sıçanlar kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edildi.

5.1.4. Testis Dokularının Elde Edilmesi

Tüm sıçanlar deney süresinin bitiminde (5 gün sonunda) anestezi altındayken kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edilerek steril şartlar altında testisler çıkarıldı (Resim 3). Trimlenerek etrafındaki dokularından iyice temizlenen testisler hassas terazide tartıldı. Veriler alındıktan sonra, sağ testisler vertikal olarak ikiye bölündü ve testislerin yarısı histolojik incelemeler için Bouin solüsyonu tespitine alındı.



Resim 3. Testislerin Çıkarılması (A). Testisin Makroskopik Görünümü (B).

5.1.5. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı

Bouin fiksatifini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi (75 mL) formaldehit (%37, 75 mL) ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit (5 mL) eklenerek tekrar karıştırıldı (69).

Bouin fiksatifine alınan testisler 18 saat ışık almayan kuru ortam ve oda sıcaklığında saklanıp sırasıyla sudan uzaklaştırma, şeffaflaştırma ve parafinden geçirilme işlemlerinden sonra blok haline getirildi.

Doku takibi aşamasında aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. % 70' lik alkol 1 gün
2. % 90'lık alkol 1 gün
3. % 96'lık alkol 1 gün

4. % 100'lük alkol 1 gün
5. % 100'lük alkol 1 saat
6. Ksilen 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde önce 58 °C' lik etüvde üç kez 15 dakika, sonrasında ise 2 saat bekletildi.
8. Dokular oda sıcaklığında bloklandı.

5.1.6. Kesitlerin Alınması

Kesitler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarındaki mevcut mikrotom ile alındı. Dokuya kadar 20µm' lik kesitler alınarak dokunun parafini atıldı. Dokuya ulaşıldığında 5 µm' lik kesitler alındı. Kesitler benmari içindeki 45 °C' lik sıcak su üzerine koyularak kırışıklıkların açılması sağlandı ve lam üzerine yerleştirildi.

5.1.7. Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin (H.E) ile Boyanması

Tüm dokulardan kesitlerin alınması tamamlandıktan sonra boyama işlemine başlandı. Boyama sırasında H.E. boyaları kullanıldı. Tüm kesitlerin parafini 58°C'lik etüvde iyice eritildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Ksilen 5 dakika
2. Ksilen 5 dakika
3. %100'lük alkol 5 dakika
4. %96'lık alkol 5 dakika
5. %70'lik alkol 5 dakika
6. Distile su 2-3 dakika
7. Hematoksilen 35 saniye
8. Musluk suyu 5 dakika
9. Asit alkol 1 kez batırılıp çıkartıldı
10. Distile su 1 dakika
11. Amonyaklı su 10 saniye
12. Distile su 1 dakika
13. Eozin 30 saniye
14. Distile su 1 dakika

15. % 70'lik alkol 5 dakika
16. % 96'lık alkol 5 dakika
17. %100'lük alkol 5 dakika
18. Ksilen 5 dakika
19. Ksilen 5 dakika
20. Entellan ile kapatma.

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü tübül sayısı Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (IM) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan Olympus BX51 (Japan) fotomikroskoplu IM'de incelendi ve resimler dijital ortama aktarıldı.

Testis seminifer tübülünde hasar değerlendirmesi için Johnsen skora sistemi kullanıldı (70, 71).

Johnsen skora sistemi (70)

- 10 : Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var
- 9 : Germinal epitelyum disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var
- 8 : Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10'dan az spermatozoa var
- 7 : Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var
- 6 : Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az
- 5 : Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var
- 4 : Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5'den az
- 3 : Germ hücre olarak sadece spermatogonia var
- 2 : Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
- 1 : Seminifer tübül içinde hiç hücre yok

5.2. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler

Testisteki apoptozu değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nükleuslu TUNEL (+) hücreler

apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Her testiste en az 10 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı bakılıp Apoptotik yüzde (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı (72).

5.2.1. TUNEL Boyama

TUNEL tekniği için In situ cell death detection kit, POD kiti kullanıldı. Lam üzerine alınan 5 µ' luk kesitler 1 saat 60 °C' lik etüvde bekletildikten sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

1. Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
2. %100 etanol 2x5 dk
3. %95 etanol 2x5 dk
4. %70 etanol 2x5dk
5. Distile su ile yıkanır.
6. Oda ısısında 20 µg/ml Proteinase K 15 dk
7. PBS (Phosphate Buffer Solution)'de yıkanır.
8. %3 H₂O₂'de 15 dk
9. Distile su ile yıkanır.
10. PBS'de 2x5 dk
11. Oda ısısında Large Volume UV (Ultraviyole ışın) block 10 dk
12. 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplanır, 37 °C'lik etüvde 1,5 saat nemli ortamda tutulur.
13. PBS'de yıkanır.
14. 100 µ converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplanır ve 37 °C'lik etüvde inkübe edilir.
15. PBS'de 3x5 yıkanır.
16. 100 µl DAP ile 5 dk karanlıkta oda ısısında beklenir.
17. Distile suda 1x2 kez yıkanır.
18. Hematoksilen ile 15 sn boyanır ve çeşme suyu ile yıkanır.
19. %70 etanol 2x5dk
20. %95 etanol 2x5 dk
21. %100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk

23. Kurutulup entellan ile kapatılır.

5.3. Akım Sitometrik Analiz

Parafin bloklardan elde edilen doku örnekleri mekanik ve enzimatik parçalama yöntemi kullanılarak PBS tamponu ile süspansiyon haline getirildikten sonra akım sitometrik incelemesi yapılmıştır. Coulter Epics Elite Akım Sitometri cihazında Multicycle AV Hücre Analiz Programı ile her bir örnekten en az 5 000 hücre sayılarak veriler elde edildi.

5.4. İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences version 13.1, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ve Microsoft® Excel (for windows XP) kullanıldı. Her bir gruba ait sayısal veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldı. Tüm sonuçların karşılaştırılmasında $p < 0.05$ olasılık değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Testis Ağırlıklarına ait Bulgular

Deney gruplarına ait sıçanların testis ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 2' de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda tüm grupların (Kontrol, MTX, E Vitamini, MTX+E Vitamini Grupları) testis ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (One Way ANOVA, $p=0.63$).

Tablo 2. Deney Gruplarının Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Testis Ağırlıkları (gr)*
Kontrol Grubu (n:8)	1.3125 ± 0.1246
MTX Grubu (n:8)	1.2625 ± 0.1598
E Vitamini Grubu (n:8)	1.2250 ± 0.1388
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	1.3000 ± 0.1603

*: Tüm gruplar için testis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.63$).

6.2. Morfometrik Bulgular

6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına ait Bulgular

Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığına ait ölçüm sonuçları Tablo 3' te verilmiştir. Germinal epitel kalınlığından elde edilen istatistiksel sonuçlara göre; kontrol grubundan elde edilen sonuçlar E vitamini grubu hariç diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmaktadır. E vitamini grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tukey HSD, $p=0.615$). MTX grubu ile MTX+E Vitamini gruplarından elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tukey HSD, $p=0.143$). MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma olmuştur (Tukey HSD, $p<0.001$)

Seminifer tübül çapından elde edilen istatistiksel sonuçlara göre; MTX grubundan elde edilen sonuçlar diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaktadır. Kontrol grubu ile hem E vitamini grubu hem de MTX+E Vitamini grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tamhane, E vitamini grubu için $p=0.996$, MTX+E Vitamini grubu için $p=0.377$). MTX+E vitamini

grubundan elde edilen sonuçlar MTX grubuna göre anlamlı şekilde artmaktadır (Tamhane Testi, $p<0.05$).

Tablo 3. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Seminifer Tübül Çapı (μm)	Germinal Epitel Kalınlığı (μm)
Kontrol Grubu (n:8)	271.81 \pm 2.79	82.31 \pm 2.72
MTX Grubu (n:8)	242.03 ^a \pm 10.45	64.33* \pm 5.51
E Vitamini Grubu (n:8)	271.15 \pm 2.00	79.45 \pm 3.39
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	264.79 ^b \pm 9.37	69.49** \pm 6.11

^a: MTX grubundaki değerler diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$).

^b: MTX+E Vitamini grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$).

*: MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$).

** : MTX grubu ile MTX+E Vitamini grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

6.3. Johnsen Skorlama Sonuçları

Deney gruplarının testis hasar değerlendirilmesi Johnsen Skorlama Sistemi ile belirlendi. Sonuçlar Tablo 4' te verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre tüm gruplar içinde en yüksek sonuç kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrol grubunun sonuçları MTX ve MTX+E vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksektir (Her ikisi için $p<0.001$, Tamhane Testi). Kontrol grubu ile E vitamini grubu arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. MTX+E vitamini grubu MTX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$, Tamhane Testi).

Tablo 4. Çalışma Gruplarına Ait Johnsen Skorlama Sistemi Değerlendirme Sonuçları ($p<0.05$).

Gruplar	Johnsen Skorlama Sonuçları
Kontrol Grubu (n:8)	9.22 \pm 0.18
MTX Grubu (n:8)	7.42 * \pm 0.46
E Vitamini Grubu (n:8)	9.07 \pm 0.18
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	8.30 ** \pm 0.26

*: MTX grubunda ki hasar diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede arttı ($p<0.05$).

** : MTX+E Vitamini grubunun hasarı MTX grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$).

6.4. Akım Sitometrik Değerlendirme

Tüm gruplarda akım sitometrik analizle hücre siklusuna ait G_0/G_1 , S, G_2/M faz değerlerine % cinsinden bakıldı. MTX grubundan elde edilen sonuçlara göre S ve G_2/M faz değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı izlendi. MTX+ E vitamini grubundan elde edilen sonuçlar MTX grubu ile kıyaslandığında ise S ve G_2/M faz değerlerinde azalma izlendi.

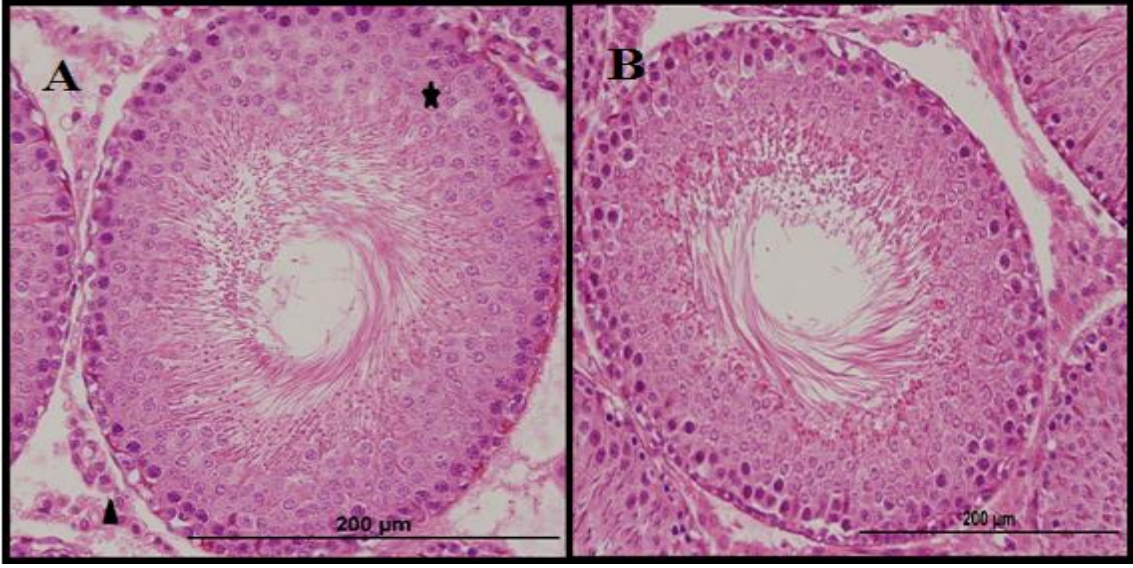
Tablo 5. Çalışma Gruplarına Ait Akım Sitometrik Değerlendirme Sonuçları

Gruplar	Faz Değerleri (%)		
	G_0/G_1 Fazı	S Fazı	G_2/M Fazı
Kontrol Grubu (n:8)	98.5	0.8	0.7
MTX Grubu (n:8)	93.4	3.5	3.1 *
E Vitamini Grubu (n:8)	98.4	0.9	0.7
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	96.8	1.8	1.4 **

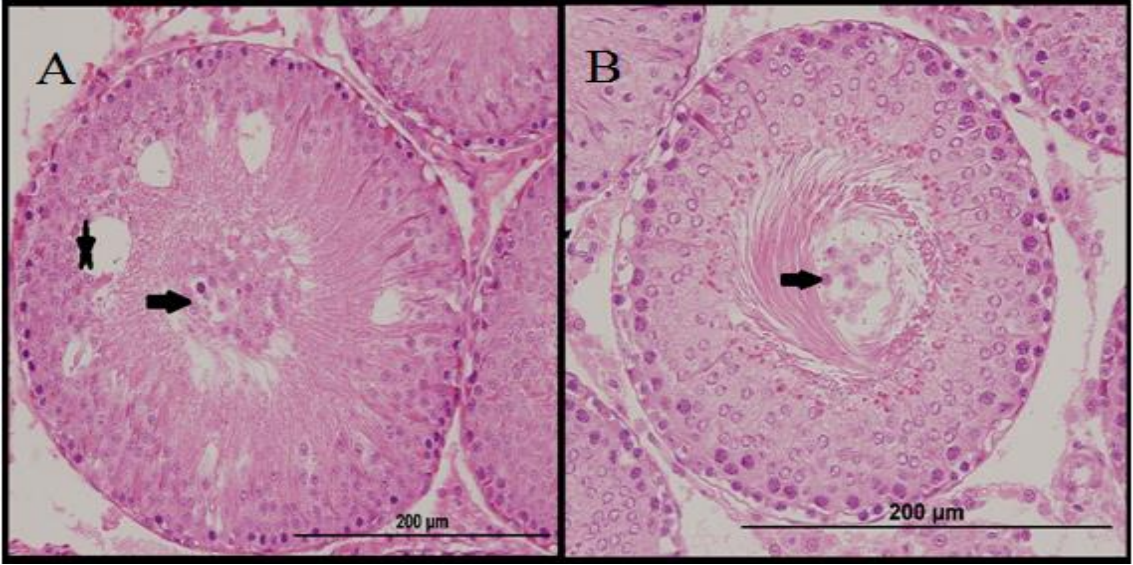
*: MTX grubuna ait yüzde cinsinden S ve G_2/M faz değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı izlendi.
**: MTX+E vitamini grubuna ait yüzde cinsinden S ve G_2/M faz değerlerinin MTX grubuna göre azaldığı izlendi.

6.5. Histopatolojik Değerlendirmeler

Testis dokusunu histopatolojik olarak incelediğimizde; kontrol grubu sıçanlarda, seminifer tübüller içindeki spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu ve Leydig hücreleri normal gözlemlendi (Resim 4). MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümenine fazla sayıda immatür germinal hücrelerin döküldüğü, bazal membranda açılmalar, intertübüler alanda ödem ve germinal epitelde yer yer vakuolizasyon olduğu gözlemlendi (Resim 5). MTX+E vitamini grubundaki seminifer tübüllerde Sertoli hücresi ve spermatogonyum arasındaki açılmaların ve vakuolizasyonun belirgin derecede azaldığı, spermatogenik hücrelerin yapısının ve germinal epitelin bütünlüğünün korunduğu izlendi (Resim 5). E vitamini grubundaki seminifer tübüller kontrol grubuna benzer şekilde spermatogenik hücre döngüsünün normal biçimde seyrettiği, tübül yapısı bütünlüğünün korunduğu ve intertübüler alan bütünlüğünün yine korunduğu izlendi (Resim 4).



Resim 4. Kontrol (A) ve E Vitamini (B) Gruplarına Ait Testis Dokuları. Kontrol Grubuna Ait Normal Yapıdaki Testis Dokusunda Seminifer Tübüller (★) ve Aralarındaki İnterstisyel Doku (▲) Görülmektedir (H&E, X400).



Resim 5. MTX (A) ve MTX+E (B) Vitamini Gruplarına Ait Testis Dokuları. Seminifer Tübülde Vakuoller (★) ve Lümeneye Dökülen Olgunlaşmamış Germ Hücreleri (→) Dikkat Çekmektedir (H&E, X400).

Deney grupları testis dokularında TUNEL tekniği ile değerlendirilen AI Tablo 5, Resim 6, 7, 8 ve 9' da verildi ve bu değerlendirmeye göre; elde edilen sonuçlara göre tüm gruplar içinde en yüksek AI (%) değeri MTX grubundan, en düşük AI değeri ise

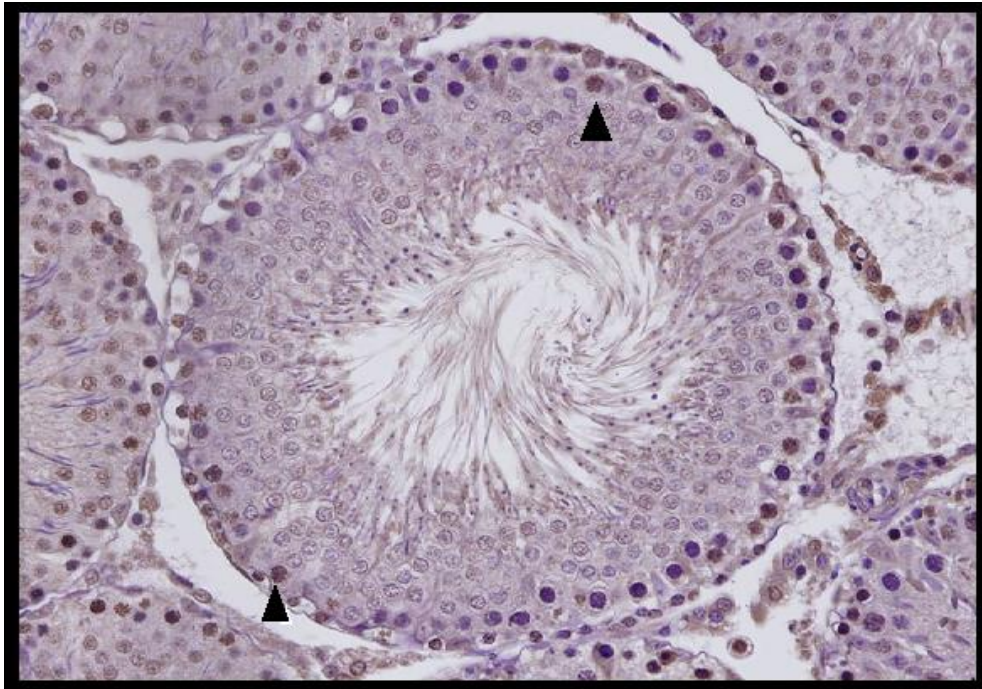
kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrol grubu ile MTX ve MTZ+E Vitamini grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde fark vardır. MTX grubuna göre MTX+E Vitamini grubunun AI değerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Tamhane Testi, $p<0.001$).

Tablo 6. Çalışma Gruplarına Ait Apoptotik İndeks Değerlendirme Sonuçları

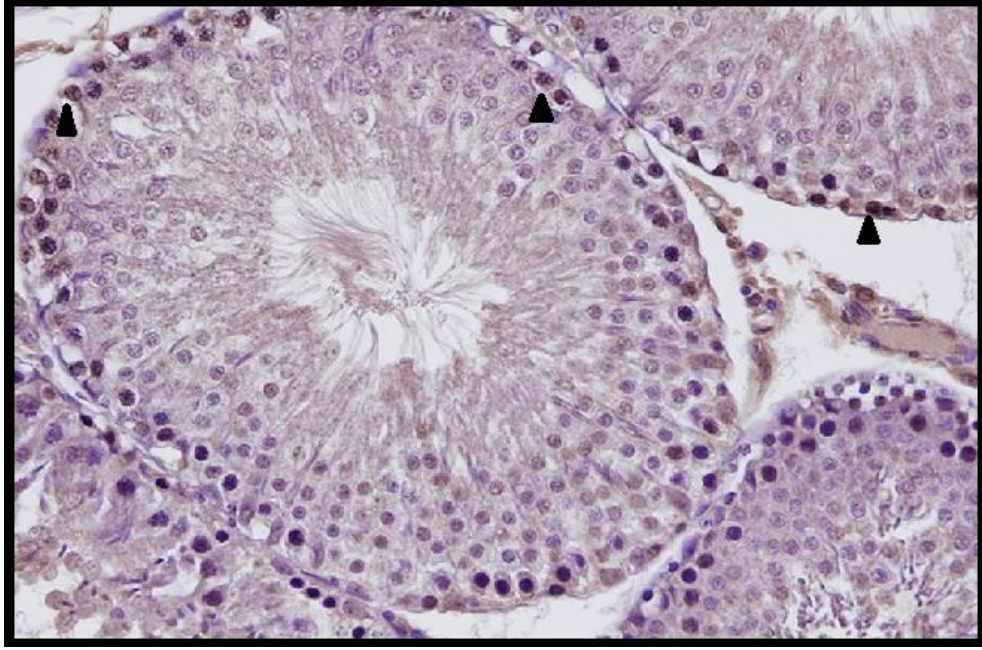
Gruplar	Apoptotik İndeks (%)
Kontrol Grubu (n:8)	2.01 ± 0.29
MTX Grubu (n:8)	$16.92^* \pm 1.97$
E Vitamini Grubu (n:8)	3.09 ± 0.32
MTX+E Vitamini Grubu (n:8)	$9.89^{**} \pm 1.01$

*: MTX grubundan elde edilen değer diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$).

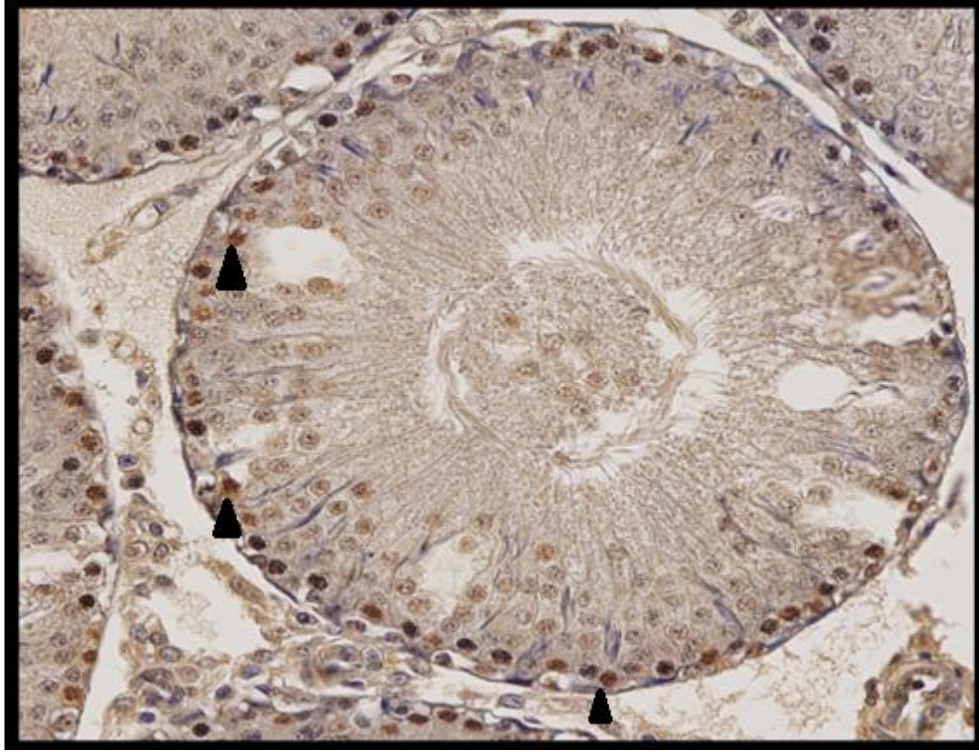
** : MTX+E Vitamini grubundan elde edilen değer MTX grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$).



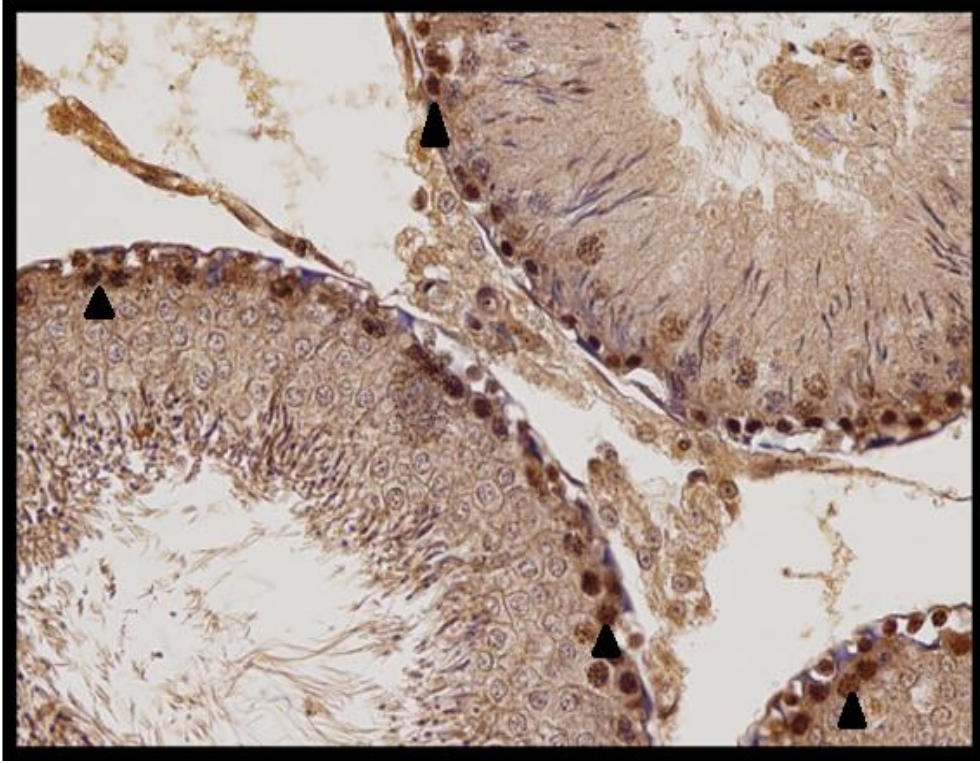
Resim 6. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400).



Resim 7. E Vitamini Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400).



Resim 8. MTX Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400).



Resim 9. MTX+ E Vitamini Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (▲) (TUNEL, X400).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX), kanser tedavileri için yüksek, bazı otoimmün hastalıklar için ise düşük dozlarda kullanılan antimetabolit ve kemoterapötik bir ajandır (73, 74). Kan ve solid organ malignensilerinde, dermatolojik ve romatolojik hastalıklarda, ektopik gebelik sonlandırılmasında yaygın bir şekilde kullanılır (73).

MTX, germ hücreleri toksisitesi de dahil olmak üzere çeşitli yan etkilere sahiptir (75). Bu yan etkileri arasında hepatotoksisite, lökopeni, trombositopeni, megaloblastik anemi, pansitopeni, akut pnömoni, yavaş ilerleyen pulmoner fibrozis, malignensi gelişimi (özellikle lenfoma), immünosüpresyona bağlı infeksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar ve teratojenite bulunmaktadır (76). MTX' in gastrointestinal, hematolojik ve sinir sistemi üzerine toksisitesi daha önce belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, oogenez, spermatogenez ve doğurganlık üzerine de zararlı etkilere sahiptir (59).

MTX, yüksek dozlarda timidilat sentetazı inhibe eder ve en karakterize toksik etkisi DNA sentezini engellemesidir (77, 78). Düşük konsantrasyonlarda bile oksidatif stresi ve kaspaz-3 seviyelerini arttırdığı için apoptoz indüksiyonunu tetiklediği belirtilmiştir (74). Kemoterapötik maddelerin p53 geni aktive mekanizmasını etkilediği ve apoptozu indüklediği ayrıca bilinmektedir (79). MTX kaynaklı organ toksisitesinin oksidatif stres sonucu oluştuğu düşünülmektedir ve tek bir doz MTX uygulamasının sıçan testisinde oksidatif stres oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (59).

Antioksidanlar hücrede reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasara karşı koruyucu mekanizmalardır ve serbest radikalleri temizleyerek DNA ile etkileşimini önlerler (80, 81). E vitamini yağda çözünebilen, biyolojik membranlar içinde yer alan, oksidatif stresi inhibe eden, membranlarda süperoksit ve lipit peroksidlerin aktivitesini azaltan doğal bir antioksidandır (11-13, 82). Yapılan çalışmalarda E vitamininin sperm hücrelerini lipit peroksidasyonundan ve oksidatif stresten koruyan bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (83).

Spermatogenik hücreler, özellikle spermatozoidler toksik ajanlara karşı çok duyarlıdır. Beslenme bozuklukları, sistemik hastalıklar, yaygın ya da lokal infeksiyonlar, genetik bozukluklar, antimetabolitler ve kemoterapötik ilaçlar

spermatogenezi etkileyen faktörler arasında sayılabilir. Bu ajanlar sperm üretimini azaltırlar, kromozomal ve morfolojik anomalilere yol açabilirler (37).

Bizde bu çalışmamızda MTX uygulandıktan sonra kısa süreli (5 gün) verilen E vitamininin testisler üzerinde herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmamızı amaçladık.

Çalışmamızda tüm grupların testis ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.63$). Bu yönüyle bulgularımız Padmanabhan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayı desteklediği görülmektedir (7). Bu sonuçlar gösterdi ki MTX uygulanan sıçanların testis dokularında anlamlı derecede bir ağırlık azalması oluşmadı.

Çalışmamızda erişkin erkek sıçanlara uygulanan MTX' in testis seminifer tübüllerinde bazı hasarlar oluşturduğu gözlenmiştir. Işık mikroskobu düzeyinde yaptığımız değerlendirmeler sonucunda seminifer tübül lümeninde immatür germinal epitel hücreleri, seminifer tübül germinal epitelinin bütünlüğünün korunamadığı, yine germinal epitelde yer yer vakuoller ve açılmalar meydana geldiği izlendi. Bu hasarların spermatogenezin kalitesinin düşmesine ve buna bağlı olarak spermatozoonların oluşumunun etkilenmesine neden olabileceği görüşünderiz. Shrestha ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada MTX kullanımına bağlı olarak seminifer tübül çapında azalma, intertisiyel alanda boşluk artışı, Leydig hücreleri morfolojisinde bozulma gözlediklerini belirtmişlerdir (14). Yine Padmanabhan ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı çalışmada MTX' in sperm sayısını önemli ölçüde azalttığı, sperm baş anomalilerini arttırdığı ve germ hücrelerinde MTX' e bağlı toksisitenin meydana geldiğini tespit etmişlerdir (7). Nitekim bu bulgularımız Shretha ve arkadaşlarının, Padmanabhan ve arkadaşlarının yanı sıra Nouri ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaları destekler niteliktedir (84, 85). MTX+E vitamini grubunun ışık mikroskobu düzeyinde yaptığımız değerlendirmesi sonucunda ise MTX grubuna göre vakuolizasyonun belirgin derecede azaldığı ve seminifer tübüllerin lümeninde birkaç germinal epitel hücrelerin dışında spermatogenik hücrelerin yapısının korunduğu izlendi. E vitamini ile ilgili olarak Shirpoor ve arkadaşları Etanol uygulamasının oluşturduğu toksisiteye karşı E vitamini takviyesinin testisteki yapısal değişiklikleri iyileştirdiği, oksidatif stres belirteçlerini ve gonadotropin hormonu düzeylerini

iyileştirdiğini bulmuşlardır. Bulgularımız Shirpoor ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayı bu yönüyle destekler niteliktedir (86).

Barbisan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MTX kullanımının apoptozu tetiklediği sonucunu ortaya koymuşlardır (74). Çalışmamızda apoptozu değerlendirmek için TUNEL metodunu kullandık. Elde edilen sonuçlara göre MTX grubundaki spermatogenik hücrelerin AI sonuçlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını ve MTX+ E vitamini grubunun AI sonuçlarının ise MTX grubuna göre anlamlı derecede azaldığını gözlemledik. Bulgularımız doğrultusunda MTX' in apoptozu indükleyici etkisi olduğunu ve çalışmamızın bu yönüyle Barbisan ve arkadaşlarının çalışmasını destekler nitelikte olduğunu gözlemledik. TUNEL (+) hücre tutulumunun MTX+E vitamini grubunda MTX grubuna göre anlamlı derecede azaldığını tespit ettik. Bu sonuç bize E vitaminin, MTX' in apoptozu indüklediği bu toksisitesine karşı tedavi edici etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Akım sitometri, proliferatif aktivite ve DNA içeriği hakkında hızlı, güvenilir ve çok sayıda hücre sayarak objektif bilgi edinebileceğimiz bir yöntemdir. Çalışmamızda tüm gruplar için, hücre siklusuna ait G₀/G₁, S ve G₂/M faz değerlerine akım sitometrik analizle % cinsinden bakıldı. Kontrol ve E vitamini grupları arasında proliferasyon indeksi açısından fark saptanmadı. MTX grubunun S ve G₂/M faz değerlerinde kontrol ve E vitamini gruplarına göre bir artış olduğu izlendi. MTX+E vitamini grubu ile MTX grubu kıyaslandığında hem proliferasyon indeksinde hem de S ve G₂/M faz değerlerinde azalma olduğu gözlemlendi. Bu bulgular bize MTX' in tek başına mitotik proliferatif aktiviteyi arttırdığını, E vitamininin ise bu aktiviteye karşı iyileştirici etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda MTX' in uygulandığı erkek sıçan testis dokusundaki etkisinin morfolojik değerlendirmesi amacıyla seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı ölçüldü. Bulgularımıza göre MTX uygulanması sonucu MTX grubunun seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görüldü. MTX+E vitamini grubu seminifer tübül çapının MTX grubuna göre anlamlı şekilde arttığı izlendi. Germinal epitel kalınlığı bakımından ise MTX grubuna göre MTX+E vitamini grubunda bir artış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmediği gözlemlendi (p=0.143). Bu bulgular doğrultusunda E vitamini

eklenmesi hem seminifer tübül çapını hem de germinal epitel kalınlığını arttırmıştır. Fakat bu artış germinal epitel kalınlığı için anlamlı kabul edilmemiştir. Denek sayısının arttırılmasıyla yapılacak yeni çalışmalarda bu farkın anlamlı çıkabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak, tedavi amaçlı kullanılan MTX testis dokusunda histopatolojik hasara yol açmaktadır ve kısa süreli (5 gün) uygulanan E vitamini takviyesinin bu hasarı önleyebildiği gözlenmiştir. Farklı alışmalarda E vitamini dozu arttırılabilir ve uygulanma süresi de uzatılabilirse daha olumlu sonuçlar alınabileceği düşünülebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Chabner B, Wilson W, Supko J (2007). Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K. In Williams Hematology. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States. 249-51.
2. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, Van De Putte LB (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27:277-292.
3. Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE (2010). Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *PLoS Comput Biol*; 2;6(12):e1001019. doi: 10.1371/journal.pcbi.1001019.
4. Jollivet J, Cowan K, Curt G, Clendeninn N, Chabner B (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Eng. J. Med*: 309:1094-1104
5. Dutz JP, Ho VC (1998). Immunosuppressive agents in dermatology. *Dermatol Clin* 16(2):235-251.
6. Olson J (2000). *Klinik Farmakoloji*. Birinci Baskı, Ankara, Hacettepe Taş Yayıncılık.
7. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat Res*; 655(1-2):59-67. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.07.003.
8. Jahovic N, Çevik H, Şehirli AO, Yeğen BC, Şener G (2003). Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 34(4): 282-287.
9. Miyazono Y, Gao F, Horie T (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol*; 39(11):1119-27.

10. Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D (2009). Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. *Chemotherapy* 55(2):83-90.
11. Kalender S, Uzun FG, Demir F, Uzunhisarcıklı M, Aslanturk A (2013). Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem Toxicol*; 55:456-62. doi: 10.1016/j.fct.2013.01.024.
12. Ayinde OC, Ogunnowo S, Ogedegbe RA (2012). Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats. *BMC Pharmacol Toxicol*; 13:17. doi: 10.1186/2050-6511-13-17.
13. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR (2005). Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 40(8-9): 728-36.
14. Wang N, Qian HY, Zhou XQ, Li YB, Sun ZW (2012). Mitochondrial energy metabolism dysfunction involved in reproductive toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. *Ecotoxicol Environ Saf*; 82:96-103. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.014.
15. Arıncı K, Elhan A (2006). *Anatomi. Dördüncü Baskı. Öncü Basımevi, Ankara; 322.*
16. Şeftalioğlu A (1998). *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık, Ankara.*
17. Aydın ÇY (2005). *Deneysel Testis Torsiyonunda Doku Hasarının Önlenmesinde N-Asetilsisteinin Rolü. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne.*
18. Sadler TW (2011). *Langman Medical Embryology. Langman Tıbbi Embriyoloji. 11th ed. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 246-261.*
19. Ensari E (2010). *Gebelikte Olaylanan Deneysel Hipokside Ginkgo Biloba'nın Testis Dokusunda Olası Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi.*

20. Moore KL, Persaud TVN (2002). İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev), 6. Baskıdan Çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
21. Deliktaş H (2007). Testis Torsiyonuyla Testiste Oluşan Hasarın Onarımında L-Karnitin'in Etkinliği. Uzmanlık Tezi. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi.
22. Junqueira LC, Carneiro J (2006). Basic Histology. Temel Histoloji Text & Atlas. Tenth ed. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 66-447.
23. Yıldırım M (2003). İnsan Anatomisi. Altıncı Baskı. Nobel Yayıncılık, İstanbul; 226.
24. Çimen A (1987). Anatomi. Birinci Baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 396-397.
25. Arıcı K (1997). Anatomi. İkinci baskı. Güneş Kitabevi, Ankara; 417-426.
26. Cumhuriyet M, Yener N, Tuncel M (2001). Temel Anatomi. METU Press, Ankara.
27. Sancak B, Cumhuriyet M (1999). Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. Beşinci baskı. ODTÜ Yayıncılık, Ankara.
28. Kalaycı Ş (1986). Histoloji, Bursa Uludağ Üniversitesi Basımevi.
29. Kayalı H, Satıroğlu G, Taşyürekli G (1992). İnsan Embriyolojisi. 7. Baskı. İstanbul, Alfa Basım Yayım Dağıtım.
30. Kaloğlu C, Gürsoy E (1997). Sıçanlarda gonadların gelişimi ve testiküler farklılaşma. İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 18: 243-251.
31. Parker Ş (1990). Histoloji. Birinci Baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 260-288.
32. Eroschenko VP (2011). diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. diFiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Onuncu baskı. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 351-374.
33. Ross HM, Romrell JL. Histology. A text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd edition. 603-625.

34. Gubari S (2008). Karbosulfanla Kontamine Besin Almanın Sıçan Testisi Üzerine Kronik Etkilerinin İnce Yapı Düzeyinde Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana.
35. Farsak F (2011). Medulla Spinalis Yaralanmasının Testis İnce Yapısına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana.
36. Silva AS, Villasenor RMV, Marquez SR, Gonzales MH, Jaime HB, Garcia XG, Montiel JLC (2013). Testosterone levels and development of the penile spines and testicular tissue during the postnatal growth in Wistar rats. *Advances in Sexual Medicine* 3: 1-9.
37. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (2004). Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. First ed. Türk Androloji Derneği Yayını, İstanbul, 91-98.
38. Soylu SM (2010). Rat Fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* Adler ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* 352: 169–172.
39. Sengupta P (2011). A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is in Comparison With Human Age? *Biomedicine International* 2: 81-89.
40. Johnsen L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* 60-61: 471-480.
41. Ozlem Nisbet H, Nisbet C, Akar A, Cevik M, Onder Karayigit M (2012). Effects of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9 GHz) on testicular function and structure in growing rats. *Research in Veterinary Science* 93: 1001-1005.
42. Demirbağ Z, Sezen K (2009). Hücre Biyolojisi. Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon; 235-240.

43. Güneş HV (2006). Moleküler Hücre Biyolojisi. İkinci Baskı. Kaan Kitabevi, Eskişehir; 388-391.
44. Page CP, Curtis MJ, Sutter MJ, Walker MJ, Hoffman BB (eds) (1997). Pharmacology, Second Edition, Barcelona, Mosby.
45. Işık A, Işılal L, Atabenli Erdemli E, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan Testisinde Metotreksat'ın Işık ve Elektron Mikroskop Düzeyinde Etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 50, Sayı 3.
46. Pui CH (2003). Treatment of Acute Leukemias. New Directions for Clinical Research, New Jersey: Humana Press 339-357.
47. Chabner B, Wilson W, Supko J (2007). Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K. In Williams Hematology. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States, 249-51.
48. Uraz S, Tahan V, Aygun C, et al (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. Dig Dis Sci 53: 1071-77.
49. Reide P, Taylor M (2000). Antimetabolitler, In: Orer H . (ed) Mosby's Crash Course Farmakoloji, 1. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi.
50. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B (1986). Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. Arthritis Rheum 29(7): 832-835.
51. Devrim E, Cetin R, Kiliçoğlu B, Ergüder BI, Avcı A, Durak I (2005). Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. Ren Fail 27 (6): 771-773.
52. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC (2004). Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. Cell Biochem Funct 22 (3): 169-178.
53. Miletova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, Moore IM (2005). Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. Biol Res Nurs 6 (3): 187-195.

54. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Ozgüner F (2005). The activities of pürine catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 277: 165-170.
55. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2006). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, Mc Graw- Hill Companies, New-York.
56. Bertram G (2004). *Katzung, Basic and Clinical Pharmacology*, 9. Edition, Singapore: The McGraw-Hill Companies, 898-931.
57. Işık A, Işılal L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan testisinde metotreksat' ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, Cilt 50, Sayı 3.
58. Modi DN, Sane S, Bhartiya D (2003). Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod* 9: 219-223.
59. Oktar S, Gokce A, Aydin M, Davarci M, Meydan S, Ozturk OH, Koc A (2010). Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and Industrial Health* 26(7): 433–438.
60. Champe PC (1997). *Biyokimya*. Çeviren: Gür E, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 438.
61. Pekiner BD (2003). Vitamin E as an antioxidant. *J Fac Pharm Ankara*, 32, 243-267.
62. Leiber DC (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 23: 147-169.
63. Marina G, Angel C (2001). The effect of alfa-tocopherol on lipid peroxidation of mitochondria and microsomes obtained from rat liver and testis. *Molekuler and Cellular Biochemistry* 225: 121-128.
64. Kayaalp SO (2000). *Tıbbi Farmakoloji*. Cilt 2. Dokuzuncu Baskı. Hacettepe Taş Kitabevi, 1541-1575.
65. Kalaycıoğlu L (2006). *Biyokimya*. Üçüncü Baskı. Nobel Yayınevi, Ankara, 684.

66. Bertino JR (1992). Text Book of Pharmacology. Ed: Smith CM, Reynard AM, Saunders Company, 941-964.
67. Vural K (1997). Deneysel parkinson hastlığı modellerinde E vitamini, SCMS, Selejilin ve L- Arginin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmokoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
68. Ahmet Süel (1991). Flow Cytometry Tanımı. Medical, Diagnostic, Laboratory Equipment and Medicine Magazine, Sayı 74.
69. Demir R, Yılmaz S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). Histolojik Boyama Teknikleri. Birinci Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 9-10.
70. Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1: 2-25.
71. Oliveira Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MT, Peruquetti RL, Cedenho AP (2010). Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. Genet Mol Res 9(3):1405-13.
72. Potten CS (1996). What is an apoptotic index measuring? A commentary. Br J Cancer 74(11):1743-8.
73. Smith SW, Nelson LS (2008). Case files of the New York City Poison Control Center: antidotal strategies for the management of methotrexate toxicity. J Med Toxicol 4(2): 132-40.
74. Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, , Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IB (2014). Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. PLoS One; 9(10):e107299. doi: 10.1371/journal.pone.0107299.

75. Oufi HG, Al-Shawi NN (2014). The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *Eur J Pharmacol*; 5;730:36-40. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.010.
76. Bangert CA, Costner MI (2007). Methotrexate in dermatology. *Dermatol Ther* 20(4): 216-28.
77. Martin SA, McCarthy A, Barber LJ, Burgess DJ, Parry S, Lord CJ, Ashworth A (2009). Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO Mol Med*; 1(6-7):323-37. doi: 10.1002/emmm.200900040.
78. Abud-Mendoza C, Martinez-Martinez MU, Monsivais-Urenda A, Gonzalez-Amaro R(2014). Laboratory biomarkers for guiding therapy with methotrexate in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Dess* 21(2):202-11.
79. Abbasi MM, Khiavi MM, Monfaredan A, Hamishehkar H, Seidi K, Jahanban-Esfahlan R (2014). DOX-MTX-NPs augment p53 mRNA expression in OSCC model in rat: effects of IV and oral routes. *Asiyan Pac J Cancer Prev.* 15(19):8377-82.
80. Halliwell B, Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology* 142: 231-255.
81. Gürbüz N (2006). Antimutajenler ve Antikarsinojenler (Kanser Gelişiminin Kimyasal Bileşiklerle Önlenmesi). *Türkiye Klinikleri. Journal of Medical Sciences* 26: 312-318.
82. Topçu Tarladaçalışır Y, Uygun M, Akpolat M, Uz YH (2005). E ve C vitaminlerinin cisplatin hepatotoksitesini önlemedeki etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 22(3): 124-131.
83. Mohammadi S, Jalali M, Nikravesht MR, Fazel A, Ebrahimzadeh A, Gholamin M, Sankian M (2013). Effects of Vitamin-E treatment on CatSper genes expression and sperm quality in the testis of the aging mouse. *Iran J Reprod Med* 11(12):989-98.

84. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D (2007). Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. *Nepal Med Coll J* 9(4):230-3.
85. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M (2009). Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia*; 41(2):105-10. doi: 10.1111/j.1439-0272.2008.00897.x.
86. Shirpoor A, Norouzi L, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Karimipour M (2014). The Protective Effect of Vitamin E on Morphological and Biochemical Alteration Induced by Pre and Postnatal Ethanol Administration in the Testis of Male Rat Offspring: A Three Months Follow-up Study. *J Reprod Infertil* 15(3):134-41.

9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

<p>Çalışmasının Adı : “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı E Vitamininin Kısa Süreli Koruyucu Etkileri”</p> <p>Çalışmacılar :Prof.Dr.Yavuz TEKELİOĞLU, Yük.Lis.Öğr.Şeyma ERBAŞARAN, Arş.Gör.Dr.Ahmet Uğur AKMAN, Doktora Öğr.Sibel TÜREDİ</p> <p>Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.</p>			
Etik Kurul Dosya No 2013/ 59	Etik Kurul Toplantı Tarihi 17.12.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/19	Etik Kurul Karar No 1
<p>Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında; “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı E Vitamininin Kısa Süreli Koruyucu Etkileri” başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (17.12.2013)</p> <p style="text-align: right;">Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı</p>			

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No :
Soyadı, Adı : KURT, Şeyma
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 19/01/1988-Trabzon
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 462 377 77 30
Faks :
E-Posta : seyma_biyolog@hotmail.com
Yazışma adresi : KTÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	Atatürk Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Akçaabat Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1. Biyolog	Özel Karadeniz Hastanesi	2008-2009
2. Biyolog	Clinart	2009-2010

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

YAYINLAR/BİLDİRİLER

ÖDÜLLER/TEŞVİKLER/BURSLAR

HOBİLER