

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**VALPROİK ASİT'İN PRENATAL TESTİS DOKUSUNDAKİ
TOKSİK ETKİLERİNE KARŞI FOLİK ASİT VE PROPOLİS'İN
KORUYUCU ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE

TRABZON - 2017

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**VALPROİK ASİT'İN PRENATAL TESTİS DOKUSUNDAKİ
TOKSİK ETKİLERİNE KARŞI FOLİK ASİT VE PROPOLİS'İN
KORUYUCU ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ**

TRABZON - 2017

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışmam hocam ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkanlarından faydalandığım çok değerli Prof. Dr. Esran ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU hocalarıma, Biyokimya Anabilim Dalından değerli hocalarım Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Yrd. Doç. Selim DEMİR'e, çalışmamın bütün aşamalarında benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim Bestami KÖSE'ye, tez deneyimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan çok değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Hatice HANCI, PhD. Sibel TÜREDİ, Arş. Gör. Dr. Senem ARI, Opr. Dr. Bünyamin ARI, Arş. Gör. Ali KULABER, Yüksek Lisans Öğrencisi Cansu KAYA, Yüksek Lisans Öğrencisi Canan GÜNEY ve tüm bölüm arkadaşlarıma, Biyokimya Anabilim Dalından Doktora Öğrencisi Serap Özer YAMAN'a ve tez çalışmamı TTU-2015-5317 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Gökşen Derya REİS KÖSE

ÖZET

Valproik Asit'in Prenatal Testis Dokusundaki Toksik Etkilerine Karşı Folik Asit ve Propolis'in Koruyucu Etkileri

Bu çalışmanın amacı prenatal dönemde Valproik Asit (VPA) etkisine maruz kalan yavru sıçanların testis dokularında meydana gelen değişikliklerin, Folik asit (FA) ve Propolis kullanılarak giderilip giderilemediğini histopatolojik ve biyokimyasal olarak göstermektir.

Çalışmada 8 adet Spraque Dawley tipi gebe sıçan 4 gruba ayrıldı. 1. Gruba (Kontrol Grubu) herhangi bir uygulama yapılmadı. 2. Gruba (VPA Grubu) deney süresi boyunca, 300 mg/kg/gün VPA, 3. Gruba (VPA+FA Grubu) 300 mg/kg/gün VPA + 400 µg/gün FA ve 4. Gruba (VPA+Propolis) 300 mg/kg/gün VPA + 100 mg/kg propolis uygulandı. Tüm uygulamalar gebeliğin 6-21. günlerinde ve her gün aynı saatlerde gerçekleştirildi. Yeni doğan sıçanlara doğumdan sonra herhangi bir uygulama yapılmadı ve çalışmaya yavru erkek sıçanlar ile devam edildi. Daha sonra yavru erkek sıçanlar, her bir grupta 6'şar yavru bulunacak şekilde Yenidoğan 1. Grup (YD-1.G), Yenidoğan 2. Grup (YD-2.G), Yenidoğan 3. Grup (YD-3.G), Yenidoğan 4. Grup (YD-4.G) olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. Deney süresinin bitiminde (postnatal 21. gün) hayvanların tümü sakrifiye edilerek testisleri alındı. Testis doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Testisteki apoptozu değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanıldı. Biyokimyasal olarak kanda ve dokuda oksidatif stres parametreleri incelendi.

Yapılan histopatolojik değerlendirmelerde VPA Grubuna ait testis kesitlerinde interstisyel alanda yoğun ödem, lümeninde germinal epitel hücreleri içeren tübül sayısında artış, germinal epitelde yer yer vakuolizasyon ve germinal epitel kalınlığında azalma izlendi. VPA+FA Grubuna ait testis dokusunda, interstisyel alanda ödem, lümeninde germinal epitel hücreleri içeren seminifer tübüller, nadir alanlarda bozulmuş seminifer tübül yapısı ve germinal epitelin bazal membrandan ayrılması gibi bulgular gözlemlendi. Ancak interstisyel alandaki ödem bir miktar, diğer bulgular daha farkedilir şekilde azaldı. VPA+Propolis Grubunda da interstisyel alanda ödem, lümeninde germinal epitel hücreleri içeren seminifer tübüller ve germinal epitelin bazal membrandan ayrılması gibi bulgular gözlemlendi. Ancak VPA Grubu ile kıyaslandığında interstisyel alandaki ödemde çok daha belirgin olmak üzere diğer histopatolojik bulgularda düzelme oldu. Morfometrik ölçümler sonucu, germinal epitel kalınlığı, Kontrol Grubuna göre VPA Grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalırken, VPA Grubuna kıyasla, Propolis Grubunda biraz daha belirgin olmak üzere, Propolis ve FA Gruplarında artış gösterdi. Apoptotik indeks (AI) VPA Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artarken, tedavi gruplarında azalma eğilimi gösterdi; ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Biyokimyasal olarak, doku biyokimyasında VPA Grubuna ait oksidatif stres indeksi (OSI) Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak arttı. VPA+FA Grubunda, Katalaz (CAT) değeri Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak artarken, Doku Malondialdehid (MDA) hem Kontrol hem de VPA Grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Glutatyon (GSH) Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak azalış, total oksidan

durum (TOS) ve OSI de artış gösterdi. Serum total antioksidan durum (TAS) artışı, Kontrol ve VPA Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı. VPA+Propolis Grubunda ise TOS ve OSI değerleri Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak arttı.

Elde ettiğimiz bulgular sonucu, prenatal dönemde uygulanan VPA'nın yavru sıçanların testis gelişimini olumsuz etkilediğini, VPA'ya ek olarak FA ve Propolis verilmesinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak düzelme sağlayabileceği söylenbilir.

Anahtar Kelimeler: Testis, Prenatal, Valproik asit, Folik asit, Propolis.



SUMMARY

The Protective Effects of Folic Acid and Propolis Against the Toxic Effects of Valproic Acid in Prenatal Testis Tissue

The purpose of this study was to show, using histopathological and biochemical methods, whether changes occurring in the testis tissue of rat pups exposed to the effect of valproic acid (VPA) in the prenatal period can be eliminated using folic acid (FA) and propolis.

Eight Sprague Dawley pregnant rats were divided into four groups. No procedure was performed on Group 1 (control group). However, 300 mg/kg/day VPA was administered to Group 2 (VPA group), 300 mg/kg/day VPA+400 µg/day folic acid to Group 3 (VPA+FA group) and 300 mg/kg/day VPA + 100 mg/kg propolis to Group 4 (VPA+propolis group) throughout the experiment. All applications were performed on days 6-21 of pregnancy and at the same time every day. No application was performed on newborn rats after birth, and the study continued with male rat pups. The pups were subsequently divided into four sub-groups of six rats each; Newborn Group 1 (NB-G1), Newborn Group 2 (NB-G2), Newborn Group 3 (NB-G3) and Newborn Group 4 (NB-G4). At the end of the experimental period (postnatal day 21), all animals were sacrificed, and their testes were removed. Testis tissue specimens were evaluated histopathologically under a light microscope. The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) technique was used to evaluate apoptosis in the testis. Oxidative stress parameters in blood and tissue were examined biochemically.

Histopathological examination of VPA group testis sections revealed intense edema in the interstitial area, non-matured germinal epithelial cells in the lumen, occasional vacuolization in germinal cells and a decreased germinal epithelial thickness. Findings such as edema in the interstitial area, non-matured germinal epithelial cells in the lumen and impaired seminiferous tubule structure and separation of the germinal epithelium from the basal membrane in rare areas were observed in VPA+FA group testis tissue. Edema in the interstitial area decreased, but maintained its density. Other findings decreased more markedly. In the VPA+propolis group, findings such as edema in the interstitial area, non-matured germinal epithelial cells in the lumen and separation of the germinal epithelium from the basal membrane were observed. However, these findings decreased compared with the VPA group, the edema in the interstitial area decreasing particularly markedly. Germinal epithelial thickness decreased statistically significantly at morphometric measurement, but increased in the treatment groups, slightly more markedly in the propolis group. The apoptotic index (AI) increased significantly in the VPA group compared to the control group, and although they tended to decrease in the treatment groups, this was not statistically significant.

Biochemically, the oxidative stress index (OSI) increased significantly in VPA group tissue biochemistry compared to the control group. Catalase (CAT) values in the VPA+FA group increased significantly compared to the control group. Tissue malondialdehyde (MDA) decreased significantly compared to both the control

and VPA groups. Glutathione (GSH) decreased significantly compared to the control group, while total oxidant status (TOS) and OSI increased. Serum total antioxidant status increased significantly compared to the control and VPA groups. In the VPA+propolis group, TOS and OSI increased significantly compared to the control group.

Our findings suggest that VPA applied in the prenatal period adversely affects rat pup testis development, while the addition of folic acid and propolis can produce an improvement in histopathological and biochemical findings.

Key Words: Testis, Prenatal, Valproic acid, Folic acid, Propolis.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Morfolojisi.....	3
2.1.1. İnsan Testis Embriyolojisi	3
2.1.2. Sıçan Testis Embriyolojisi.....	6
2.1.3. Testis Anatomisi	8
2.1.4. Testis Histolojisi	10
2.2. Toksikoloji ve Teratoloji Hakkında Temel Kavramlar.....	17
2.3. Valproik Asit (Valproat).....	20
2.3.1. FDA Tarafından Yapılan Hamilelikte İlaç Kullanımları ve Olası Riskleri Sınıflandırması.....	21
2.3.2. Biyokimyasal Özellikleri ve Biyoyararlılığı.....	22
2.3.3. Etki Düzenegi	23
2.3.4. Yan Etkileri.....	24
2.4. Folik Asit	26
2.4.1. Folik Asit'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	27
2.4.2. Doğal Kaynakları ve Elde Edilmesi.....	28
2.4.3. Güvenliğı ve Toksisitesi	30
2.4.4. Tıptaki Kullanım Alanları.....	31
2.5. Propolis	33
2.5.1. Propolis'in Fiziksel Özellikleri.....	34
2.5.2. Propolis'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	34
2.5.3. Propolis'in Biyolojik Özellikleri	40
2.5.4. Propolis'in Antioksidan Özellikleri	43

2.5.5. Propolis'in Toksik Özelliği.....	43
3. MATERYAL VE METOD	44
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	44
3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı.....	44
3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	46
3.4. Histolojik İşlemler	47
3.4.1. Bouin Tespitinin Hazırlanışı.....	47
3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması.....	47
3.4.3. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması	48
3.4.4. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi.....	48
3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	49
3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	49
3.4.7. İmmünohistokimyasal İşlemler.....	50
3.5. Biyokimyasal Analiz.....	52
3.5.1. Propolisin İzole Edilmesi.....	52
3.5.2. Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi	52
3.5.3. SOD Seviyelerinin Belirlenmesi.....	54
3.5.4. 8-OHdG Seviyelerinin Belirlenmesi.....	55
3.5.5. CAT Seviyelerinin Belirlenmesi.....	55
3.5.6. GSH Seviyelerinin Belirlenmesi.....	56
3.5.7. TOS Belirlenmesi	57
3.5.8. TAS Belirlenmesi	57
3.5.9. OSI Hesaplanması.....	57
3.6. İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. Morfometrik Bulgular	59
4.2. Morfolojik Bulgular	60
4.2.1. Hematoksilen Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	60
4.2.2. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	73
4.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	77
4.3. Apoptotik İndeks.....	83
4.4. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	87

4.4.1. Doku Biyokimyası	87
4.4.2. Serum Biyokimyası	88
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	101
7. KAYNAKLAR	103



KISALTMALAR DİZİNİ

µm	: Mikrometre
8-OHdG	: 8-Hidroksi-deoksiguanozin
a	: Arteria
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AI	: Apoptotik indeks
AlCl₃	: Alüminyum klorür
ALP	: Alkale fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AMH	: Antimülleryen hormon
AST	: Aspartat aminotransferaz
BDNF	: Beyinden köken alan nörotrofik faktör
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
DHF	: Dihidrofolik asit
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ERK	: Ekstrasellüler “signal- regulated” kinaz
FA	: Folik Asit
FDA	: ABD gıda ve ilaç dairesi
GABA	: Gama-aminobutirik asit
Gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSK-3	: Glikojen sentaz kinaz- 3
GÜS	: Genitoüriner sistem
H&E	: Hematoksilen eozin
Hcg	: İnsan koryonik gonodotropini
HDAC	: Histon deasetilazı

KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
m	: Muskulus
MDA	: Malondialdehid
MİM	: Mülleriyan inhibitör madde
MPFC	: Medial prefrontal korteks
MRSA	: Metisilin dirençli Stafilokok aureus
MSH	: Melanosit sitümulan hormon
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTX	: Metotreksat
NMDA	: N-metil-D-aspartat
°C	: Santigrad derece
OH	: Hidroksil
OSI	: Oksidatif stres indeks
PABA	: p-aminobenzoik asit
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PK-C	: Fosfokinaz C
PNG	: Postnatal gün
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TAS	: Total antioksidan durum
TBF	: Testis belirleyici faktör
THF	: Tetrahidrofolik asit
TOS	: Total oksidan durum
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay
v	: Vena
VPA	: Valproik Asid
WHO	: Dünya Sağlık örgütü
µg	: Mikrogram

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Folat ve Folik Asit İÇeren Bazı Yiyecekler.....	29
Tablo 2. Yaş Gruplarına Göre FA İÇin Önerilen Günlük Alım Miktarları.....	30
Tablo 3. Propoliste Tanımlanmış Bileşenler ve Sayıları	36
Tablo 4. Propolis Tipi, Coğrafi Bölgesi, Kaynakları ve En Çok Bulunan Bileşikler	37
Tablo 5. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırması	38
Tablo 6. Propolisteki Önemli Flavonoidler	39
Tablo 7. Propolisin Bileşiminde Bulunan Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri	42
Tablo 8. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	59
Tablo 9. Deney Gruplarına Ait AI Değerlendirmesi	83
Tablo 10. Doku Biyokimyası Sonuçlarının Değerlendirilmesi	88
Tablo 11. Serum Biyokimyası Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. FA'in Kimyasal Yapısı.....	27
Şekil 2. Folatın Aktif Formu Olan Tetrahidrofolata İndirgenmesi.....	28
Şekil 3. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği	54
Şekil 4. SOD Tayininde Kullanılan Standart Grafiği.....	54
Şekil 5. 8-OHdG Tayininde Kullanılan Standart Grafiği.....	55
Şekil 6. Katalaz Tayininde Kullanılan Standart Grafiği.....	56
Şekil 7. Glutatyon Tayininde Kullanılan Standart Grafiği.....	56



RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. Sıçanların Çalışma Süresince Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler	44
Resim 2. Testislerin Çıkarılması ve Testisin Makroskopik Görünümü	46
Resim 3. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ve Aralarındaki İnterstisyel Bağ Doku Normal Olarak İzlenmektedir (H&E, X100).....	61
Resim 4. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ve Aralarındaki İnterstisyel Bağ Doku (↔) Normal Olarak İzlenmektedir (H&E, X200).....	62
Resim 5. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer tübüller (↓) ve Aralarındaki İnterstisyel Bağ Doku (↔) Normal Olarak İzlenmektedir (H&E, X400).....	63
Resim 6. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümene Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X100).....	64
Resim 7. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümene Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X200).....	65
Resim 8. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümene Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) ve Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (H&E, X400).....	66
Resim 9. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (H&E, X400).....	67
Resim 10. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümene Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) ve Seminifer Tübül Yapısında Düzensizlik (↑) İzlenmektedir (H&E, X100).....	68
Resim 11. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümene Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X200).....	69
Resim 12. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X400).	70
Resim 13. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümene Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X100).....	71

Resim 14.	VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (➡) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X200).....	72
Resim 15.	VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (➡), Germinal Epitelin Bazal Membrandan Ayrılması (▲) İzlenmektedir (H&E, X400).....	73
Resim 16.	Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ile Aralarındaki İntersitisyel Bağ Dokusu (↔) İzlenmektedir (Masson Trikrom, X400).....	74
Resim 17.	VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Vakuolizasyon (←), Seminifer Tübül Yapılarında Düzensizlik Gözlenmektedir (Masson Trikrom, X400).....	75
Resim 18.	VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. İntersitisyel Alanda Ödem (★) ve Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (Masson Trikrom, X400).....	76
Resim 19.	VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (➡) İzlenmektedir (Masson Trikrom, X400).	77
Resim 20.	Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ile Aralarındaki İntersitisyel Bağ Dokusu (↔) İzlenmektedir (PAS, X400).....	78
Resim 21.	VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Epitelde Vakuolizasyon (←), Bazal Membranlarda Düzensizlik (▲) İzlenmektedir (PAS, X400).....	79
Resim 22.	VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (PAS, X400).....	80
Resim 23.	VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (➡) İzlenmektedir (PAS, X400).....	81
Resim 24.	VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. Normal Seminifer Tubül Yapısı (↓), Bazal Membranlarda Düzensizlik (▲) ve Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (PAS, X400).	82
Resim 25.	VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Normal Seminifer Tubül Yapısı (↓) ve Bazal Membranlarda Düzensizlik (▲) İzlenmektedir (PAS, X400).....	83
Resim 26.	Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (➡) (TUNEL X400).....	84
Resim 27.	VPA Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (➡) (TUNEL X400).....	85

Resim 28. VPA + FA Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (➡) (TUNEL X400).....	86
Resim 29. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (➡) (TUNEL X400).....	87



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, popülasyonun % 1' inden fazlasını etkileyen yaygın bir hastalıktır ve antiepileptik tedavi alanların üçte biri üreme çağındadır. Bununla birlikte gebe kadınların yaklaşık % 0,3-0,7' si de epilepsi hastasıdır (1, 2). Epilepsili hastalarda gebe kalma kararı pek çok riski de beraberinde getirmektedir. Çünkü gebelik esnasında kadınların üçte birinde nöbet aktivitesi artmaktadır ve gebelikte geçirilen nöbetler fütusa zarar verebilmektedirler. Bu süreçte anne ölüm oranının ve doğum komplikasyonlarının arttığını bildiren yayınlar bulunmaktadır. Tüm bu sebepler gebelik esnasında antiepileptik ilaçların kullanımına devam edilmesini zorunlu kılar. Anneyi ilgilendiren risklerin yanında bebek açısından da riskler bulunmaktadır. Bunlar prematür doğum, düşük doğum ağırlığı, fetal ve neonatal ölüm oranında artış, konjenital malformasyon ve gelişim geriliğidir. Ancak konjenital malformasyonlar epilepsinin mevcudiyetinden ziyade antiepileptik ilaçlarla anne karnında maruziyete bağlanmıştır ve ilaç dozunun, ilaç serum düzeyinin yüksekliğiyle ve politerapiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (3). Özellikle ilk trimesterde, yani organogenez sırasında antiepileptik ilaç kullanan annelerden doğan çocuklardaki malformasyon oranı, genel popülasyona göre belirgin derecede yüksektir.

Değişik antiepileptik ilaçlarla yapılan bir değerlendirmede, monoterapide en yüksek konjenital malformasyon riski VPA'da bulunmuştur (1). Buna rağmen VPA, teratojenitenin de dahil olduğu fetal toksisite riski taşımaya rağmen epilepsinin tüm çeşitlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (4) ve en fazla reçete edilen antiepileptik ilaçlardan biridir (5). Parsiyel ve generalize epilepsiyi de içeren geniş bir antiepileptik spektruma sahip olmakla birlikte migrende ve psikiyatride bipolar bozuklukta da kullanılabilir (6). VPA'nın fetusta anne kanından daha yüksek miktarda bulunduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (7). Ayrıca VPA'nın üreme endokrin fonksiyonu üzerine olası etkileri konusunda artan bir endişe mevcuttur (8). Yapılan çalışmalar VPA ile tedaviyi takiben serbest radikal seviyelerinin artmakta olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres DNA, protein, lipit gibi hayati moleküllerde serbest radikal aracılı hasara neden olabilir ve sonunda hücre ölümüne neden olabilir (9). Ayrıca VPA'nın folat metabolizmasında değişiklikler yaptığını dair hipotezler de bulunmaktadır (10).

FA özellikle hızlı hücre bölünmesinin olduğu gebeliğin ilk trimestirinde önemlidir. FA eksikliği olan gebelerin bebeklerinde, düşük doğum ağırlığı, prematür doğum, nöral tüp defekti gibi ciddi risklerin görülme sıklığı artmaktadır. Epilepsisi olan hamile kadınlara 0,4-0,5 mg/gün folik asit desteği önerilmekte, özellikle VPA ve karbamazepin kullanan ve nöral tüp defekti görülme riski yüksek olan gebelere 4-5 mg/gün dozunda FA takviyesi önerilmektedir (1).

Propolis bal arıları tarafından üretilen, antiseptik, antimikotik, bakteriyostatik ve antiviral özelliklere sahip mum benzeri bir reçinedir. Ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımından oluşan bir arı ürünüdür (11). Yapısında yaklaşık 150 kimyasal bileşik, 20'den fazla mineral madde, bal mumu, reçine ve polen bulunmaktadır (12). Yapılan çalışmalarda propolisteki flavonoidler ve bunlarla akraba bileşiklerin serbest radikal temizleme etkisi en fazla olan bileşikler olduğu gösterilmiştir (13). Propolisin mide, karaciğer, kalp, damarlar, deri gibi organlar üzerinde yapılan çalışmalarda antioksidan / antiapoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir (14). Farklı organ sistemlerinde antioksidan olarak farklı dozlarda tedavi edici olarak kullanılmıştır (15).

Bu çalışmada VPA'nın gebelerde kullanımını sonucu yavru sıçanlarda oluşabilecek testis hasarına karşın, FA ve propolisin koruyucu etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlandı. Literatürde bu konunun irdelenmemiş olması nedeni ile bu çalışmanın özgün bir çalışma olduğunu ve literatürdeki bu eksikliği dolduracağını düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Morfolojisi

2.1.1. İnsan Testis Embriyolojisi

Fertilizasyon esnasında ovumu dölleyen sperm çeşidi ile embriyonun erkek veya dişi yöndeki gelişimi belirlenir ve böylece embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti fertilizasyon esnasında belirlenmiş olur. İlk 7 hafta içerisinde genital sistem her iki cinste de birbirine benzerdir ve bu safha seksüel gelişimin farklanmamış safhası olarak adlandırılır. Bu evredeki gonadlar da farklılaşmamış gonad adını alır. Cinsiyetlere ait morfolojik özellikler 7. haftadan sonra ayırt edilmeye başlanır (16, 17).

Gonadlar (testisler ve overler) 3 yapıdan köken alırlar. Bunlar posterior abdominal duvarın mezotel örtüsü (mezodermal epitel), altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücreleridir (16).

Erkek gonadda somatik hücre prekürsörleri; Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve peritübüler myoid hücreleri oluşturur. Sertoli hücreleri testis yüzey mezodermal epitelinden gelişir (17). Kemirgenlerde Sertoli hücreleri, fetal dönemdeki proliferatif aktivitelerini yeni doğanda da sürdürür ve birkaç gün içinde bu aktivite giderek azalır. Bu dönem gonositlerin yeni doğanda Go fazından çıkıp proliferasyon göstermeye başladığı sürece karşılık gelmektedir (18).

İnsan embriyosunda gonadların gelişimi 5. haftada mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelmesiyle ve gonadal kabartıların oluşmasıyla başlar. Gelişimin 6. haftasına kadar gonadal kabartılar içerisinde germ hücreleri yoktur. Parmak şeklindeki epitelyal gonadal kordonlar (primer sex kordonları) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad taslağında dışta korteks, içte medulla oluşur. Eğer embriyo XX sex kromozom kompleksine sahip ise, yani dişi yönünde geliyecekse farklanmamış gonad'ın korteksi overe farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse ve erkek yönünde farklılanacaksa, medulla testise farklılanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (16, 17).

Primordial germ hücreleri yuvarlak ve büyük bir çekirdek, belirgin bir veya birkaç çekirdekçik içerirler. Oldukça geniş, sferik hücrelerdir. Epiblasttan köken alırlar. Sitoplazmalarında alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi yüksek olup, bol glikojen ve lipid damlası içerirler. Sitoplazmalarındaki yalancı ayak benzeri uzantılarla amöboid hareket yapma yetenekleri vardır. Primitif çizgi boyunca göç ederek, 4. hafta başında umbilikal kese (yolk ya da vitellus kesesi) duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu olurken, primordiyal germ hücreleri, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. 6. hafta sırasında primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar (16, 17, 19).

Cinsiyet farklanması, çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Kısa kolu üzerinde SRY genini taşıyan Y kromozomu seksüel dimorfizmin oluşmasını sağlar. Bu genin protein ürünü bir transkripsiyon faktörü olan Testis Belirleyici Faktördür (TBF) ve bu sayede rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderi belirlenir. Bu faktör varsa fetus erkek tipinde yoksa kız tipinde gelişir. Bu organizatör faktörün etkisi altında, gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlara (seminiferöz tübül primordiyumlarına) farklılıklar. Seminiferöz kordonların oluşumu SOX 9 ve FGF 9 genlerinin ekspresyonu ile sağlanır. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanır (16-20).

TBF, gonadal kordonları uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece ağsı görünümlü rete testis oluşur. Gonadal kordonların (seminifer kordonlar) kalın bir fibröz kapsül olan, tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Dens tunika albuginea'nın 12. haftadaki gelişimi, testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrostan ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorşiyumu ile asılı hale gelir. Seminiferöz kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testis'e farklılıklar (16).

Seminifer tübüller, Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar

mezonefrik kanalların ve dış genitallerin erkek yönünde farklılaşmasını sağlarlar. Testosteron üretimini, insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilaveten fetal testisler, glikoprotein bir hormon olan antimülleryen hormon (AMH) veya mülleryan inhibitör madde (MİS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimülleryen hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, uterus ve tuba uterinalara farklılık gösteren, paramezonefrik (Mülleryan) kanalların gelişimini baskılar. Seminifer tübüller puberteye kadar solid halde kalırlar, lümensizlerdir. Puberteden itibaren lümen gelişir (16-21).

Testisin büyümesi ve gelişmesi üç major faza ayrılır:

1. Statik faz: Doğumdan başlayıp 4 yaşına kadar olan dönemdir. Doğumda seminifer tübüller küçük indifferansiyel küboidal hücrelerle döşelidir. Leydig hücreleri doğumda maternal hormonların etkisiyle görülebilirler.

2. Büyüme fazı: Bu faz 4-10 yaş arasında kapsar. Tübül boyutlarında yavaş ve dereceli bir artış bu dönemde fark edilmeye başlar. Tübüller kıvrımlanır, lümen oluşmaya başlar, fakat Leydig hücreleri görülmez.

3. Matürasyon fazı: Büyüme fazından, yani 10 yaşından sonra olan, idrarda gonadotropinlerin ve 17-ketosteroidlerin görüldüğü dönemdir. İnterstisyumda tanımlanan Leydig hücreleri ve tübül hücrelerinde mitotik figürler görülür. Mitotik aktivite 11 yaşında belirginleşir, primer ve sekonder spermatositler görülür (17, 22).

Primordial germ hücrelerinin farklılaşması erkeklerde pubertede başlar. Puberteden önce seks kordonları içinde lümenleşme başlar ve seminifer tübüller oluşur. Eş zamanlı olarak primordial germ hücreleri, spermatogoniumlara farklılaşırlar. Daha sonra mitoz bölünme ile bir spermatogoniumdan önce primer spermatosit, daha sonra mayoz bölünme ile spermatid oluşur. Spermatidler olgun spermatozoonlara dönüşürken spermiyogenez denen bir dizi değişime uğrar (17, 19).

Seminifer tübül duvarında destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve primordial germ hücreleri olan spermatogoniumlar olmak üzere iki çeşit hücre bulunur. Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişirler. Spermatogoniumlar ise primordial germ hücrelerinden farklılaşırlar. Fetal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki fetal gelişme sırasında,

testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları (ductuli efferentes) oluşturan, 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuslar, duktus epididimis'i oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (16, 17).

Gebeliğin ikinci ayından sonra testisin karın arka duvarına bağlandığı mezenter dejenere olup 'kaudal genital ligament' adını alır. Testisin kaudalindeki yoğun mezenşimal yapı 'gubernakulum' olarak isimlendirilir. Testisler abdomende gelişimini sürdürürken, doğuma yakın, inguinal kanala doğru inmeye başlarlar. Bu sırada gubernakulumun ekstraabdominal kısmı skrotum tabanına temas eder. Bu aşamada etkili olan hormonlar, fetal androjenler ve AMH'dir. İnguinal kanaldan geçerek skrotuma inen testisler Funiculus spermaticus ile asılı tutulurlar. Skrotuma inen testislerin dış yüzü, peritonun oluşturduğu iki sıralı vajinal proçes ile sarılır (17, 19-21, 23).

2.1.2. Sıçan Testis Embriyolojisi

Sıçanlarda döllenmeden sonraki ilk 5 günde 1 hücreli yapı bölünerek sırasıyla morula, erken blastosit ve blastosit aşamalarına gelir. Blastosist, zona pellusida adı verilen yarı saydam bir yapı ile çevrilidir. Zona pellusida, blastosistin tuba uterina'ya implantasyonunu engeller. Gestasyonun 4-5. günlerinde zona pellusida dejenere olur ve 6.günde implantasyon başlar. Ratlarda implantasyon uterusun antimezometriyal kısmındaki bir olukta meydana gelir (24-26).

Erken fetal dönemde gonadal taslakların morfolojik ayrıntılarından net bir seksüel ayrım yapılamaz. Gonadal taslak mezonefrik sırtın medialinde yer almaktadır ve erken farklanmamış taslaklardan bir testisin farklılaşması seks kordlarının oluşumu ile başlar. Sıçanlarda, seminifer kordlar fertilizasyondan 13 gün sonra oluşur (27). Fötal sıçanda gonadal gelişim 10. günde iki gonadal hattın gelişimiyle başlar. Primordial gonositler yolk kesesinde oluşur ve gelişen gonadlara göç ederler. Leydig hücreleri, tübüller arasındaki mezenkim tabakasında farklılaşırlar. Embriyonal dönemde gonad taslaklarına göç eden primordiyal germ hücreleri, testiküler kordonları oluşturan Sertoli hücre öncüllerinin ve peritübüler myoid hücrelerinin etkisiyle gonositlere dönüşür. Gonositler testiküler kordonların

merkezinde bazal membrandan uzağa yerleşir; fetal dönemde sıçan ve farede kısa bir süre proliferasyon gösterir ve sonra hücre siklusunun Go fazına girerler (28-30). Embriyonik 16. günde, gonadal taslağın kısıalma ve kalınlaşması ile testis morfolojisi belirgin bir şekilde gelişir ve artık gubernakulum erkek embriyolarda belirgin olarak izlenir. 18-19 günlük fetüs testisinde, seminifer tübüller gonositlerle dolmuştur, Sertoli hücrelerinin öncüllerinin çekirdekleri hem seminifer tübüllerde hem de tübüllerin periferinde görülebilir haldedir ve tübüllerin arasındaki boşlukları çok sayıda Leydig hücresi doldurmaktadır. Bu sırada Leydig hücreleri erkek üreme sistemi gelişimini uyarmak ve beyindeki erkek davranış merkezini düzenlemek için androjen salgılamaktadır. Fetal 21. günde doğum gerçekleşmektedir. Doğuma kadar gonositler hücre siklusunun Go fazında beklemede kalırlar. Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lümen gelişir. Seminifer tübül duvarında testisin yüzey epitelinden gelişen Sertoli hücreleri ve primordial germ hücrelerinden farklı spermogonyumlar bulunur.

Yenidoğan testisinde seminifer tubüller öncelikli olarak Sertoli hücrelerinin bölünmesiyle genişlemektedir ve primordial gonositler tubüllerde görülebilir haldedir. Leydig hücreleri birincil görevlerini tamamladıkları için pubertede yeniden aktif olana kadar sayıları azalmaktadır. Seminifer tubüllerin görünümü postnatal 10. güne kadar aynı kalmaktadır. Bu günden itibaren primordial germ hücreleri bölünüp spermogonyumlara dönüşmeye başlar. Testiküler gelişim bu aşamadan sonraki 40 gün ve devamında birçok başarılı gelişen germ hücre dizisi yapımını içermektedir. Bu hücre siklusu içerisinde spermogonyum, erken birincil spermositler, pakiten birincil spermositler ve spermadlerin gelişimi bulunmaktadır. Bu çok tabakalı gelişim seminifer tubüllerin çapını genişletmektedir.

Testiküler inişin ilk aşamasında testis kranio-lateral ve dorsalden kaudomedial ve ventrale doğru hareket eder. Sıçanlarda bu aşama embriyonik 16. ve 21. günler arasında gerçekleşir. Testiküler inişin ikinci aşaması ise embriyonik 22. ve postnatal 2. günler arasında gerçekleşir (31).

Primordiyal germ hücreleri, embriyonal dönemde kemirgenlerde ilk 1. haftada allantoisin başlangıç yerine yakın epiblasttan göç eden hücrelerle oluşur ve embriyonik 17,5. güne kadar çoğalırlar ve postnatal 2-3. güne kadar sessiz kalırlar (28,32). Spermogonial farklılaşma postnatal 12. gün sonlarında meydana gelir. İlk

sperm üretimi ise yaklaşık 45. günde başlar ancak optimum üretim 75. günde gerçekleşir.

Sertoli hücre öncülleri gebeliğin 17. gününden 19. gününe kadar çoğalmaya başlar ve bölünmeleri doğum sonrası 15-20. günde sona erer. Kemirgenlerde Sertoli hücreleri, fetal dönemdeki proliferatif aktivitelerini yeni doğanda da sürdürür ve birkaç gün içinde bu aktivite giderek azalır. Bu dönem gonositlerin yeni doğanda Go fazından çıkıp proliferasyon göstermeye başladığı sürece karşılık gelmektedir. Sıçanlarda, Leydig hücrelerinin fetal Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleri olmak üzere iki tipi tanımlanmıştır. Fetal Leydig hücreleri prenatal dönemde gelişir ve gestasyonel 15,5. günde testosteron üretebilirler (23, 33, 34). Tepe steroidojenik aktiviteye ise doğumdan hemen önce gestasyonel 19. günde ulaşılır. Gebelikte fetal Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron erkek ürogenital sisteminin farklılaşması için gereklidir. Sıçanlarda Leydig hücre proliferasyonu ve farklılaşması ise prepubertal periyotta, postnatal 22-35. günler arasında meydana gelir (35).

Sıçanlarda potsnatal 0. günden (PNG0) PNG7'ye kadar geçen dönem neonatal dönem, PNG8-PNG20'ye kadar ki dönem infantil dönem olarak tanımlanır. PNG 21-32 juvenil dönem, PNG33-PNG37 arası prepubertal dönem, PNG38-PNG46 arası ise pubertal dönem olarak adlandırılır (23, 24, 36).

2.1.3. Testis Anatomisi

Erkekteki temel üreme organı olan testisler, genç sağlıklı erkeklerde, ovoid şekilli olup, funikulus spermatikus ile asılı olarak skrotum içinde bulunan sağ ve solda yerleşik bir çift bezdir. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Böylece normal spermatogenez için gerekli olan 34-35°C sağlanmış olur. Boyutları kişisel farklılıklar göstermekle birlikte erişkinde yaklaşık 4.5x3x2.5 cm boyutlarındadır. Ağırlığı ortalama 10-15 gr dır (37- 39).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetal hayatta karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yerleşmişlerdir. Doğumdan önce kanalis inguinalisten geçerek skrotuma inerlerlerken karın ön duvar tabakalarını da aşağı iterler (38, 40- 42). Bu tabakalar dıştan içe doğru sırasıyla:

1. Deri,
2. Tunica dartos,
3. Fascia spermatica eksterna,
4. Fascia cremasterica,
5. Fascia spermatica interna ve
6. Tunica vaginalis' dir (38).

Testisin fasia medialis (iç yan yüz) ve fasia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı, ekstremetas superior (üst uç) ve ekstremetas inferior (alt uç) olmak üzere de iki ucu vardır (43). Üst uç olan ekstremetas süperiora caput epididimis yerleşmiştir. Margo posterior'un medial bölümüne corpus epididimis yerleşir. Margo anterior, peritoneum viscerale'nin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo posterior'un orta kısmında medianum testis bulunur. Bu alanda testis damar ve sinirleri ile sperm kanalları bulunur (44, 45).

Skrotum kıvrımlı bir deri ve içte ince düz kas lifleri içeren tunica dartos'tan oluşur. Daha içte fascia superficialis, ortada bir septum yapar ve testisler için iki boşluk oluşturur. Sol testis genellikle 1 cm kadar daha aşağıda bulunur. Fascia spermatica externa Gallaudet fasciasının, kremaster tabakası musculus (m) obliquus abdominis internusun, fascia spermatica interna fascia transversalisin, tunica vaginalis ise peritonun devamıdır (40).

Testis parankimi üç tabakadan oluşan kapsül ile sarılıdır. Dışta tunica vaginalisin visseral tabakası (epiorchium), içte tunica albuginea, en içte tunica vasculosa yer alır. Tunica vaginalis, skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisi saran lamina visceralis (epiorchium) olarak iki tabakadan oluşur. Lamina visceralis (epiorchium), epididimis'in büyük kısmı ile arka kenarının mediyal bölümü dışında, testis'i sarar ve bu iki yapıyı birbirine bağlar. Lamina parietalis (periorchium), periton'un fascia spermatica interna'yı döşeyen kısmıdır (44, 46-48). Tunica vaginalis'in iki tabakası arasında cavum serosum scroti adı verilen bir aralık bulunur ve içinde eklem sıvısına benzer, testislerin serbest hareketini sağlayan kaygan bir sıvı vardır (49). Tunica albuginea, kollajenöz zeminde birbiriyle köprüleşen çok sayıda düz kas lifi içerir. Elastikiyeti ve genişleme özelliği yoktur. Tunika albuginea mediastinumda kalınlaşır ve ışınal olarak uzanarak her bir

testis parankimini yaklaşık 250-300 kadar lobüllere ayırır. Mediastinumda kan damarı, lenfatik ve sinirler bulunur. Her bir testis lobülü 1-4 adet seminifer tübüle sahiptir. Bir seminifer tübülün uzunluğu ortalama 75 cm dir. Seminifer tübüller terminal kısımda tübülü recti içine boşalır; testiküler hilumda rete testisin tübülleri ile birleşir. Rete testisten sonra 15-20 adet duktuli eferentes anastomozlaşıp, tunica albuginea'ya penetre olup, kaput epididim olarak devam eder. Epididim 4-5 m uzunluğunda bir kanal olup, arkaya dönerek duktus deferens oluşturur. Duktus deferens spermatik kordun bir üyesi olarak inguinal kanala doğru uzanır (43).

Tunica vasculosa, gevşek bağdokusundan oluşan, tunica albuginea'nın iç yüzünü, lopçukları saran ve damar ağının bulunduğu tabakadır. Testisin arka tarafından çıkan küçük venler önce birleşerek plexus panpiniformisi daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena (v) testikularisi oluştururlar. Bu oluşum sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya doğru açılır (43, 44, 49).

Testisi besleyen arter (a), testiküler arterdir; çoğunlukla aortadan daha az olarak inferior renal arterden köken alır. Böbreklerin alt tarafından başlayarak m. psoas major 'un ön yüzünde seyrederek aşağıya doğru iner, Anulus inguinalis profundustan geçerek Funiculus spermaticus içindeki yerini alır ve skrotum içine kadar uzanır. Arter seyri boyunca kıvrımlar yapar. Mediastinum testiste birçok dallar verir. Bu dallar septumlar ile tüm beze dağılır (41).

Testisin ana venöz drenajını, plexus pampiniformis sağlar. Bu venöz ağ ters yönde çalışan ısı düzenleyici bir sistemdir. Testis ısısının vücut ısısından daha düşük olmasını ayarlar. Bu ağdan v. testikularis oluşur. V. testikularis sağda v. cava inferiora, solda v. renalis sinistraya dökülür. Testisin lenfatikleri funiculus spermaticus'tan yükselip, paraortik lenf bezine ulaşır. Epididimin lenfatikleri ise internal ve eksternal iliak lenf bezine drene olur. Testisi innerve eden sinirler torakal 9-12. spinal sinirlerden çıkar. Bu dallar plexus aortikus ve plexus renalisten ayrılarak a.testikularis çevresinde plexus testikularisi oluşturur (41, 42).

2.1.4. Testis Histolojisi

Erkek üreme sisteminin temel fonksiyonel organı olan testislerin başlıca görevleri spermatozoon ve hormon üretmektir. Tübül sistemi spermin üretimini ve

transportunu sağlayarak ekzokrin fonksiyon görürken, Leydig hücreleri androjen üretir ve endokrin fonksiyon görür (50-52).

Seminifer Tübüller

Her bir testis lobülü içerisinde 1-4 adet kadar bulunan seminifer tübüller, fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bazal lamina ve germinal veya seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü, fibroblastlardan oluşan fibröz yapıdaki tunica propria sarar. Bu yapı birkaç fibroblast katmandan oluşmuştur. Bazal membrana yapışık halde olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren kontraksiyon yapabilen 3-5 sıralı yassılaştırmış myoid hücreler içerir. Bazal membran seminifer epitel ile direkt ilişkilidir ve Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen laminin, kollajen tip I, kollajen tip IV içerir. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150–250 mikrometre çaplı ve 30–75 cm uzunluktadır (50, 53). Peritübüler myoid hücrelerin dokudaki organizasyonları türler arası varyasyon gösterir. Fare, hamster ve sıçan gibi laboratuvar kemirgenlerinde; testiste myoid hücre sadece tek katman olarak görünür. Öte yandan insanlarda ve bazı diğer hayvanlarda seminifer tübülün bazal tabakasında pek çok hücresel tabaka mevcuttur. Myoid hücreler bol miktarda, türe özgü bir şekilde hücelere dağıtılan aktin filamentleri içerir ve ayrıca miyozin, desmin, vimentin gibi hücre iskeleti proteinleri içermektedir. Myoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise iletirler ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur (54, 55).

Seminifer Epitel

Seminifer epitel, Sertoli ya da destek hücreleri ve germ hücrelerini (spermatogonik hücreleri) içeren iki tip hücreden meydana gelmektedir.

Germ hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasında 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Çeşitli evrelerde farklılaşma sürecindeki germ hücrelerini içerir. Bunlar sırasıyla bazal laminadan lümeneye doğru; spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar şeklindedir. Spermatogenez olarak tanımlanan bu süreçte, spermatositogenez ve spermiyogenez aşamaları gerçekleşir. Spermatositogenez olarak isimlendirilen evrede spermatogonyumlardan spermatositler gelişir; spermatositlerin mayoz bölünme geçirmesi ile spermatidler oluşur. Spermiyogenez ise spermatidlerin farklılaşarak spermium veya spermatozoon oluşturduğu safhadır (44, 50, 56).

Spermatogonyumlar, seminifer tubülün bazal membranına yerleşmişlerdir ve spermatogenez başlatan ilk hücrelerdir. Yaklaşık olarak 12 µm çapında, seminifer tubülün bazal membranının hemen üstünde yer alan ilkel üreme hücreleridir. Bu hücreler yenilenebilen ve farklılaşan hücrelerdir. Spermatogonyumlar, spermatogonial kök hücrelerden köken alırlar ve pubertede başlayan mitotik hücre bölünmeleri ile çoğalarak yeni hücreler oluştururlar. İnsan seminifer epitelinde çekirdeklerinin görünümüne göre üç tip spermatogonyum tanımlanır (44, 50, 57).

1) Koyu boyanan tip A spermatogonyumlar: Germinal epitelin kök hücresi olarak kabul edilen, küçük ve kubbe şeklinde hücreler olup, oval ve heterokromatik çekirdeğe sahiptir. Bu hücreler, hücre döngüsüne girmezler ve mitoz bölünme geçirerek yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumlara farklılaşırlar.

2) Açık boyanan tip A spermatogonyumlar: Yuvarlak veya oval, ökromatik çekirdek ile açık sitoplâzmaya sahiptir. Bu hücreler A1, A2, A3 ve A4 olmak üzere dört jenerasyon halinde gözlenir. Birbirini takip eden bu serilerde, mitoz bölünme sonucunda meydana gelen A4 tipi spermatogonyum bölünür ve A ile B arasında bir geçit tipi olan ara spermatogonyumu oluşturur. Bu ara spermatogonyumlar ise B tipi spermatogonyumlara dönüşür.

3) B tipi spermatogonyumlar: Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünme ile primer spermatositlere farklılaşan kök hücrelerdir. Tip A spermatogonyumlardan daha büyük, daha yuvarlak nükleuslu, kromatini nükleusun periferine birikmiş olup, tek santral nükleolus içerir. Oluşan primer spermatositler daha sonra mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu aşamada primer spermatositin 46 (44+XY) kromozomu ve 4n DNA'sı vardır (n, haploid kromozom sayısıdır). Profaza giren hücreler leptoten, zigoten, pakiten ve diploten fazlarından geçer, sonuçta kromozomlar ayrılır. Profazdan sonra metafaza girerler, anafazda kromozomlar kutuplara ayrılır. Bazalden lümeneye doğru gelişim gösteren primer spermatositler spermatogenezin en büyük hücreleridir. Bazı yazarlara göre bu hücrelerin de B1, B2, B3 ve B4 olmak üzere dört jenerasyonu vardır (50, 54).

Primer spermatositler; seminifer tubüldeki en büyük hücrelerdir ve germinal epitelin orta kısmında yer alırlar. Sitoplazmalarında kaba kümeler veya ince kromatin iplikler içeren büyük bir çekirdekleri vardır ve sarmalanma sürecinin değişik safhalarındaki kromozomlarının bulunması ile tanınırlar. Bu hücreler birinci mayoz

bölünmenin başlamasından hemen önce Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal bölümüne geçerler. Dolayısıyla mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA içerir. Oluşumlarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık olarak 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada izlenir (56, 58).

Primer spermatositlerin geçirdiği birinci mayoz bölünmeden sonra, sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler 23 (22+X veya 22+Y) kromozom ve 2n DNA içeren daha küçük hücrelerdir. İnterfazda kısa bir süre kalıp, hemen ikinci mayoz bölünmeye girdiği için biyopsilerde görülmesi zordur. Sekonder spermatositler 23 kromozom içeren, birbirleriyle sinsityal bağlantı gösteren spermatidleri oluştururlar. Primer, sekonder spermatosit ve spermatidler arasında sitoplazmik köprüler spermatogenez düzenler. İnsanda spermatogenez 64 gün sürer (50, 59).

Spermatidler 7-8 µm çapında, küçük, yuvarlak şekilli ve haploit sayıda kromozom taşıyan hücrelerdir. Nükleer kromatini yoğun, oval ya da küre şekillidirler. Seminifer tübül lümenine yakın, adluminal bölmeğe yerleşik, gruplar halinde ve Sertoli hücreleri ile sıkı bağlantılı şekilde bulunurlar. Olgun spermatidlerin küçük baş kısımları Sertoli hücrelerinin sitoplazmasına gömülüyken, kuyruk kısımları seminifer tübülün lümenine uzanır. Sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bol miktarda mitokondri ve bir çift sentriyol içerir. Spermatidlerin olgun spermatozoaya dönüşümü sırasında geçirdikleri bir dizi farklılaşma sürecine spermiyogenez denir. Bu süreçte akrozom oluşur, nükleus şekillenir, sitoplazmanın büyük kısmı kaybolur, flagellum gelişir (44, 50, 56, 59, 60).

Spermiyogenez Dört Fazda Gerçekleşir

Golgi Evresi: Nükleus yakınındaki Golgi kompleksi lamelleri ile vezikülleri bir kutuplaşma gösterir ve spermatidde anterior kutup oluşur. Spermatid farklılaşmasında ilk belirtiler, Golgi bölgesinde proakrozom granüllerinin birikmeye başlayıp, akrozom granülünü oluşturmasıdır. Golgi membranlarından gelişen akrozomal kese, içindeki glikoproteinden zengin içeriği nedeniyle PAS (Periyodik Asit - Schiff) pozitif olarak belirir. Golgi kompleksi ile nükleus arasında topografik

bir yakınlık söz konusudur. Akrozomal kesenin membranında dış nükleus membranı ile birleşir. Spermatidde nükleusun bir kutbunda akrozom oluşumu ilerlerken, karşı kutupta da sentriol, nükleus membranına yaklaşır ve bu bölgeden bir flagellum büyümesi başlar. Bu esnada, mitokondriler periferde göç edip plazma membranına yakın sıralanma gösterirler.

Başlık (Kep) Evresi: Golgi kompleksinin yer değiştirmesi ile akrozomal kesedeki sıvı rezorbsiyona uğrar ve kese yassılaştır; nükleus üzerine yapışıp, başlık gibi oturur. Bu dönemde nükleusta bazı belirgin değişiklikler olmaktadır. Kromatin yoğunlaşır, yassılaşmaya ve uzamaya başlar; hücre membranına yaklaşır ve spermiumun baş oluşumu ilerler. Sitoplazma, hücrede kuyruk oluşumunun ilerlediği bölgeye doğru birikir (58).

Akrozomal Evre: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozomal faz sırasında spermin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluştururlar. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir.

Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkinleşmesi sonucunda oluşur (50).

Olgunlaşma (Matürasyon) Evresi: Spermatozoon farklılaşması tamamlandığında, Sertoli hücresi sitoplazmasında yerleşmiş olduğu girintiden ayrılır. Bu ayrılmada, Sertoli hücreleri sitoplazması içindeki düz endoplazmik retikulum (SER) membranları topluluğunda şişmeler olmakta ve yüzey girintideki düzleşme ile farklılaşmış olgun spermatozoon, Sertoli hücresi ile ilişkisini kesip lümeneye geçmektedir (58).

Olgun bir sperm hücresi olan spermatozoon memelilerde baş, boyun ve kuyruk kısımlarından oluşur. Baş kısmı kromatini yoğunlaşmış nükleus içerir, 2/3'lük ön kısmı akrozom denilen bir kılıfla örtülmüştür. Boyun bölgesi, baş ile kuyruk orta bölgesi arasında yer alır. Kuyruk bölgesi orta, esas ve son parça olarak

3'e ayrılır. Kuyruğun orta parçasında bol miktarda bulunan mitokondri, esas ve son parçada bulunmaz. Mikrotübüllerde bulunan ATP aktivitesi ve dynein proteini sayesinde kuyruk hareketi sağlanmış olur (50, 59).

Seminifer epitel siklusu (döngüsü); epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan maturasyon değişiklikleri dizisi olarak ifade edilebilir (61). İnsanda ve sıçanlarda spermatogenez süreci belirgin şekilde benzerlikler içerse de bazı farklılıklar vardır. Erkek sıçanlarda testislerin skrotuma inmeleriyle beraber sperm üretimi başlar. İlk sperm üretimi yaklaşık 45. günde başlar, ancak optimum üretim 75 günde gerçekleşir (62). Sıçanlarda her spermatogenik döngü arasında 12.9 gün bulunurken insanlarda bu süre yaklaşık 16 gündür. Buna ek olarak sıçanlarda bir spermatogenik siklusun tamamlanması için 52-54 gün gerekirken insanlarda bu süre 65 gündür. Sıçanlarda spermatogonial farklılaşma 12. gün sonlarında, insanlarda da 16. gün de başlar ve spermatositlerin gelişimi için sıçanlarda 14 gün, insanlarda ise 25 gün gereklidir. Sıçanlarda haploid germ hücrelerinden olgun sperme dönüşüm süreci olan spermiyogenezis 7-14 gün iken insanlarda ise bu süreç 8-14 gündür (63, 64).

Sertoli hücreleri (Sustentaküler Hücreler = Destek Hücreleri) bazal membrandan luminal yüzeye kadar seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanan piramidal, kolumnar veya elonge şekilli, sınırları zor ayırt edilebilen hücrelerdir. Sitoplazmaları iyi sınırlı, hafif eozinofilik, nükleusları ince kromatinli, orta büyüklükte olup yuvarlak nükleolus içerirler. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunurlar, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine bakar. Spermatogenetik serideki hücreleri kısmi olarak sararlar. Sertoli hücreleri spermatogonyumlar komşuluğunda sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Spermatogonyumlar bazal kompartmanda yerleşirler; spermatogenez esnasında adluminal kompartmana çıkarlar. Daha ileriki aşamalarda Sertoli hücreleri arasındaki bağlantılarla oluşan kan-testis bariyeri ile immünolojik reaksiyondan korunurlar. Spermadidlerin sahip oldukları flagellar kuyrukları uzadıkça Sertoli hücreleri arasında püsküller şeklinde çıkıntı oluştururlar (50).

Ergenliğe kadar seminifer epitelde baskın hücre tipi olarak, ergenlikten sonra ise germ hücrelerinin çoğalması ile seminifer tübüleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10-15'ini oluşturabilirler. Yaşlılık dönemine doğru, erkeklerde spermatogenik

hücre topluluğunun azalmaya başlamasıyla, Sertoli hücreleri yeniden epitelin esas yapısı haline gelirler (44, 50, 54, 65).

Sertoli Hücrelerinin Birçok Önemli Fonksiyonu Vardır:

1) Beslenme, korunma ve destek fonksiyonu: Kan-testis bariyeri nedeniyle kandan beslenemeyen spermatogenetik seri hücrelerinin beslenme ve metabolit alışverişinde Sertoli hücreleri görev yaparlar. Her Sertoli hücresi gelişmekte olan 30-50 germ hücrelerini destekler. Ayrıca Sertoli hücreleri sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan korurlar.

2) Fagositoz: Olgun spermatozoanın oluşumu sırasında spermatiddeki fazla sitoplazma parçaları Sertoli hücreleri tarafından önce fagosite edilir, sonra lizozomları ile sindirilir.

3) Sekresyon: Sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein (ABP) salgırlar. Bu proteinin salınımı FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleşir ve seminifer tübül içinde testosteronun artmasını sağlar. Ayrıca ön hipofizden FSH salınımını baskılayan bir peptid olan inhibinin salgılanmasında rol oynar.

4) AMH üretimi: Embriyonal gelişme sırasında erkek fetüste Müller kanalının gerilemesini sağlarlar.

5) Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri vasıtasıyla irtibatlıdır. Bazolateral okludens bağlantıları ile kan-testis bariyerini oluştururlar ve böylece gelişmekte olan spermatogenetik seri hücrelerini otoimmün reaksiyonlardan korurlar.

6) Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgırlar.

7) Olgun spermatidlerin spermiasyon sürecinde aktin aracılı kasılmalarla seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırırlar (50, 55, 66, 67).

Testis dokusunun %25-30'unu oluşturan ve testisin seminifer tübülleri arasında yer alan interstisyel alanda, bağ dokusu stromal hücreleri, sinirler, kan ve lenfatik damarlar, interstisyel ya da Leydig hücreleri bulunur. Bağ dokusunda fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Pubertede testosteron salgılayan Leydig hücreleri belirginleşir. 14-20 µm büyüklüğündeki bu hücrelerin sitoplazması yuvarlak, poligonal şekillidir. Santral nükleusludurlar, bir ya da iki düzensiz şekilli nükleolus içerirler. Çok sayıda

agranüler endoplazmik retikulum, tübüler mitokondri, lipid damlacıkları ve glikojen partiküllerine sahiptirler (50, 56, 68).

Testisin endokrin kısmını meydana getiren bu hücrelerin en önemli görevi androjenlerin özellikle de testosteronun sentezi ve salgılanmasıdır. Leydig hücrelerince üretilen testosteron, embriyonal dönemde gonadların normal bir şekilde gelişiminden, pubertal dönemde sperm üretimi ve aksesuar cinsel bezlerinin sekresyonunun başlaması ile sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden ve erişkinlerde spermatogenezin, sekonder cinsiyet karakterlerinin ve cinsel salgı bezlerinin fonksiyonlarının devam ettirilmesinden sorumludur (69).

Leydig hücreleri testosteron yanı sıra Adrenokortikotropik hormon-Melanosit Stimülan Hormon (ACTH-MSH), beta-endorfin, metionin-enkefalin, inhibin, aktivin, oksitosin, renin-anjiyotensin, kortikotrop yönlendirici faktör, çeşitli büyüme faktörlerinin salınım ürünlerinden de sorumludur. Ayrıca 'rod' şeklinde intrasitoplazmik Reinke kristalleri izlenebilir. Protein ve lipid içeren bu kristaller bazı Leydig hücrelerinde tanımlanmakla birlikte, fonksiyonel önemi henüz açıklanamamıştır (50, 56, 68).

Kan-Testis Bariyeri

Kan-testis bariyeri, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar vasıtasıyla kurulmuştur. Ratlarda post partum 16-19. günlerde oluşur (70). Seminifer tübül ve genital boşaltım yollarında bulunan testis sıvısının, iyon, protein, karbonhidrat içeriği bakımından kan plazması ve testisin lenf sıvısından belirgin olarak farklı olduğu gösterilmiştir. Kanda bulunan birçok protein ve immüoglobulinler testiküler sıvıda bulunmaz. Testiküler sıvı içerisine kandan madde geçişi çok azdır. Böylece spermatozoonlar eksojen zararlı maddelerden korunmuş olurlar (50, 59, 68).

2.2. Toksikoloji ve Teratoloji Hakkında Temel Kavramlar

Toksikoloji, eski Yunanca'da toxicon (zehir) ve logos (bilgisi, bilimi) terimlerinden oluşur. Zehir bilimi anlamına gelmektedir ve canlı organizma üzerinde kimyasal maddelerin oluşturduğu morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri inceler. İnsan sağlığını bozan mineral, bitkisel, hayvansal ya da sentetik maddelere zehir ya da toksik madde adı verilmektedir. Tedavide kullanılan kimyasal madde ya da ilaçlar

çok sayıda etki meydana getirebilir. Bunlardan bir kısmı tedaviye yöneliktir, diğer kısmı ise tedavide yan etkiler ya da istenmeyen etkiler olarak bilinir (71). Bu etkilerin bir kısmı dönüşümlü olabileceği gibi bir kısmı da hücre ölümü (dönüşümsüz) ile sonuçlanabilir (72). Dönüşümlü yan etkiler genellikle ilacın metabolize edilmesi ve eliminasyonu ile kısa sürede kaybolurlar ve bunların çoğu yan etki kavramı içinde tanımlanırlar. Dönüşümsüz etkiler ise doku ya da organlarda patolojik hasar oluşturan ve dokunun kendini yenilemesi olanaksız olan etki şekilleridir ve genellikle toksik etki şeklinde tanımlanırlar. İlaç ya da kimyasal maddelerin dönüşümsüz olarak toksik etkilerinin başlıcaları mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olarak ortaya çıkmaktadır (71).

Bazı ilaçlar ve kimyasal maddeler gebe kadınlar tarafından alındıklarında, plasentadan fetal dolaşıma geçerler; bunların fetusta malformasyon oluşturmalarına teratogenezis (teratojenik etki) adı verilir (73). Çevresel etkenlerden kaynaklanan doğumsal bozuklukları ve anormal prenatal gelişmeyi inceleyen ve doğumsal defektleri önlemenin araştırmalarını yapan bilim dalına ise teratoloji denilir (74). Yavrularda yapısal veya fonksiyonel bozuklukları arttıran, herhangi bir ilaç, kimyasal ajan, enfeksiyon veya radyasyon gibi çevresel etkenlere teratojen adı verilmektedir.

İnsanlarda güçlü teratojenik etkiye sahip olarak bilinen ilaçlar, difenilhidantoin (PHT, fenitoin), trimetadion, folik asit antagonistleri, antikoagulan ilaçlar, talidomid, tetrasiklinler, streptomisin, lityum, androjenik hormonlar, dietilstilbestrol, antineoplastik ilaçlar, antitiroid ilaçlar, isotretinoin (Vit. A ve analogları) ve VPA olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre VPA bir antikonvülsan ajan olup hayvanlarda teratojenik olarak bilinmektedir (75).

1961 yılında yaşanan Talidomit faciası, erişkinlerde minimal toksisiteye neden olan bir ilacın gelişen insan embriyosunda toksik olabileceğine dikkat çekmiştir (76). Böylece teratolojinin ilk prensibi, tür içi veya türler arası farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu olaydan sonra yeni ilaçların resmi olarak piyasaya sürülmeden önce hayvanlar üzerinde test edilmesi zorunlu hale getirilmiştir (74).

İnsan konjenital anomalilerinin %20-25'i genetik faktörlere, % 10 u çevresel faktörlere bağlıdır. Çevresel faktörler, kimyasallar, ilaçlar, hormonlar, vitaminler, iyonize radyasyon, enfeksiyon ajanları, fiziksel ajanlar, beslenme yetersizliği ve

metabolik hastalıkları da içine alan maternal koşullar şeklinde sıralanabilirler. Malformasyonların %60-75'inin nedeni bilinmemektedir. Bunlar multifaktöriyel (gen ve çevre etkileşimleri), poligenik olabildikleri gibi, gelişimdeki spontan hatalar ya da teratojenlerin sinerjistik etkileşimleri sonucu da ortaya çıkabilmektedir (77).

İnsanlarda gebelik süresi ortalama 267 gündür. Fetal dönemden önceki dönemlere embriyonal dönem adı verilir ve ortalama 60 gündür. Bu dönemin büyük kısmını organogenez dönemi oluşturur (73).

1. Blastosist oluşumu (preimplantasyon): Döllenmeyi izleyen ilk 5-8 günlük prediferansiyasyon dönemidir.

2. İmplantasyon: Döllenmeden sonraki 8-13. gün arasını kapsar. Preimplantasyon ve implantasyon dönemlerinde genellikle "hep ya da hiç kuralı" geçerlidir (78). Bu kurala göre embriyo ya sağlıklı bir şekilde gelişir ya da ölür ve rezorbe edilir.

3. Erken post-implantasyon: İmplantasyondan sonra nöral plağın oluşumuna kadar olan dönemdir. Gebeliğin 14-17. günlerini kapsar. Embriyo gelişmesinin en aktif, hücrelerin bölünme ve farklılaşmasının en hızlı olduğu ve teratojenik etkilere en duyarlı olunan dönemdir.

4. Organogenez dönemi: Nöral plağın görünmesinden damağın kapanmasına kadar geçen süredir. Gebeliğin 18-21. günleri arasında başlar, 55-60. günlere kadar olan ortalama 36 günlük süreyi kapsar. Organların prototip ve rudiment şekilleri oluşur. Bu dönemde birçok organ sisteminde farklılaşma gerçekleşir ve doğumsal anomali oluşma olasılığının en yüksek olduğu dönemdir.

5. Fetal dönem: Organogenezden doğuma kadar olan dönemdir; organlar gelişme gösterir ve fonksiyonel bakımdan olgunlaşırlar. Merkezi sinir sistemi (MSS), göz, genitoüriner sistem (GÜS), damak ve işitme sistemi üzerine çeşitli fonksiyonel bozukluklar meydana gelebilir. (73).

Teratojene karşı en hassas olunan dönem, organogenezin kritik periyoduna denk gelmektedir; organogenezin erken döneminde (nörolasyon esnasında) bir maruziyet olursa, MSS hasar görebilir, geç dönemde ise ürogenital ya da büyüme bozukluklarına neden olabilir (74). Gelişimdeki en kritik dönem, hücre bölünmesinin, hücre farklılaşmasının ve morfogenezin en yoğun olduğu dönemdir (1). Bu dönem içinde embriyonun teratojen maruziyetinin hangi organların gelişim

sürecine denk geldiği malformasyonların belirlenmesi açısından önemlidir. Örneğin; gebeliğin 21–22. günlerinde talidomid alındığında dış kulak oluşamaz, 24. ve 27. günler arasında alınırsa fokomeli (ekstremitelerin yetersiz gelişmesi) oluşurken, 34. ve 36. günler arasında alınırsa anorektal stenoz ve atrezi görülür. Talidomidin 36. günden sonra alınmasının teratojenik etki yapmadığı kabul edilir. İlaça bağlı doğumsal anomalilerin çoğu için bir bitiş zamanı olmakla birlikte gelişim geriliği için bir bitiş zamanı yoktur. Gebeliğin son ayına kadar bu tip gelişim bozukluklarının oluşması beklenebilir (79).

Teratojenik patogeneze, çoğunlukla apoptoz, biyosentez ve morfogenezde değişikliklere neden olarak etkilemektedir. Bu etkileri; mitozla müdahale ederek, RNA veya protein sentezini değiştirerek, substratlarda, prekürsörlerde veya enerji kaynaklarında yetersizliğe sebep olarak, membran transport sürecini değiştirerek, hücre yüzeyi veya matriksinde değişikliğe sebep olarak veya osmolariteyi değiştirerek gerçekleştirebilmektedir.

Ajanın yapısı, annenin ajana maruz kalma şekli, süresi ve derecesi, plasental geçiş oranı, sistemik emilimi, maternal ve embriyonik genotip kompozisyonu, ajanın tesirini etkileyebilir. Plasental geçiş oranı, türler arası teratojenite farklılıklarında önemli bir belirleyicidir.

Teratojenik etki ancak, teratojenik ajan miktarı belirli bir eşik değerini aşarsa gözlenebilir. Her teratojenin bir eşik değeri bulunmaktadır. Bunun altındaki miktarlarda hiçbir etki gözlenmezken; eşik değeri aşıldığında, teratojenik etkiler doz ile doğru orantılı olarak artış gösterirler. Bu etkiler gözle görülemeyecek kadar küçük veya embriyonun ölümüne sebep olabilecek kadar büyük etkiler şeklinde olabilir (74).

2.3. Valproik Asit (Valproat)

Primer ve sekonder epilepsinin uygun antiepileptiklerle medikal tedavisi, profilaksisi veya takibinde, migren profilaksisi ve bipolar bozuklukların tedavisinde, nöroşirurji, nöroloji ve psikiyatri pratiğinde antiepileptikler sıkça kullanılmaktadırlar. Antiepileptik ilaçların da hamile bir hastada kullanımı her zaman önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bunun için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 1979 yılında, ilaçların

hamilelikte kullanımları ve olası fetal riskler açısından aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi bir sınıflandırma geliştirmiştir.

2.3.1. FDA Tarafından Yapılan Hamilelikte İlaç Kullanımları ve Olası Riskleri Sınıflandırması

A

Yeterli ve iyi kontrollü çalışmalarla, ilacın gebeliğin ilk trimesterindeki fetüs için bir risk oluşturduğu gösterilememiştir ve diğer iki trimestere ilişkin veri de yoktur.

B

Hayvan üreme çalışmalarında ilacın fetüs için bir risk oluşturduğu gösterilememiştir ve gebe kadınlarda yeterli ve iyi kontrollü çalışmalar yapılmamıştır. Ya da hayvan çalışmalarında bir yan etki ortaya çıkmamıştır, ama gebe kadınlarda yapılan yeterli ve iyi kontrollü çalışmalarla herhangi bir trimesterde fetüs için bir risk olduğu gösterilememiştir.

C

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda istenmeyen etkiler saptanmış, ancak insanlarda kontrollü çalışma yapılmamış olan, ilaçlar ya da hayvan ve insanlar üzerinde hiç çalışılmamış ilaçlar. Bu kategorideki ilaçlar gebelikte sadece gerçekten gerekli olduğunda yani potansiyel yararın potansiyel zararından fazla olduğu durumlarda verilmelidir.

D

Araştırma veya pazarlama deneyimlerinden ya da insanlardaki çalışmalardan elde edilen yan etki verilerine göre ilacın insan fetüsü için risk oluşturduğu yönünde kanıtlar vardır, ama olası yararlar, olası risklere rağmen, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasını haklı kılabilir.

X

Hayvan ya da insanlardaki çalışmalar fetal anormallikler göstermiştir ve/veya araştırma ya da pazarlama deneyimlerinden elde edilen yan etki verilerine göre ilacın insan fetüsü için risk oluşturduğu yönünde kanıtlar vardır ve söz konusu riskler, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasının olası yararlarından açıkça daha fazladır.

Hamilelikte kullanılacak ilaçlar mümkün olduğunca A ve B kategorisinden seçilmelidir. Bu tabloya göre VPA gebelikte kullanımı açısından D kategorisinde sınıflandırılır. Yani risk içerir.

VPA ilk kez 1967 yılında Fransa'da piyasaya sürülmüştür. Sonrasında pek çok ülkede epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Takip eden yıllarda VPA ile yapılan çok çeşitli klinik çalışmalar ve hayvan deneyleri neticesinde epilepsi dışında başka hastalıklarda da kullanılmaya başlanmıştır. Bipolar bozukluklar, migrende kullanılmakta anksiyolitik, antiagresif, antidistonik, antinosiseptif, sedatif, hipnotik, immün stimülan, antihipertansif etkilerinden yararlanılmaktadır (80,81). Şiddetli refrakter ağrılarda, trigeminal nevraljide, batıcı-saplanıcı ağrılarda ve nöropatik ağrılarda yararlı olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Bipolar ve şizoafektif hastalıklardaki rolünün ise antidopaminejik etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir.

2.3.2. Biyokimyasal Özellikleri ve Biyoyararlılığı

VPA 8 karbonlu dallanmış zincirli basit yapıda bir yağ asididir. Kimyasal olarak yapısı 2-propil pentanoik asiddir. Amid ve ester türevleri de asıl molekül gibi antiepileptik aktiviteye sahiptir. Primer amidine valpromid denir ve VPA'dan iki kat daha potentdir. VPA'nın kullanılmakta olan üç kimyasal formu vardır. 1. Serbest asitler, 2. Sodyum tuzu, 3. VPA kompleksinin ve valproik asidin 1:1 oranında bileşiminden elde edilen divalproex sodyum (82).

VPA gastrointestinal sistemden hızla emilir. Na-valproat ağızdan alındığında mide-barsak yolundan 30 dakika ile iki saat arasında emilmektedir. İki saat içinde plazmada en yüksek düzeye ulaşır. %90-95'i plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Plazma konsantrasyonu düştüğünde proteine bağlı olmayan Na-valproat konsantrasyonu artmaktadır. Na-valproat %95 oranında karaciğerde P-450 enzim sistemi ile metabolize edilmektedir, ancak P-450 enzim sistemini indüklememektedir. Glukuronillenmiş metabolitleri idrarla atılmaktadır. Valproat uygun dozlarda verildiğinde plazma yarılanma ömrü 7-10 saattir. Yüksek dozda alındığında bu süre 30 saate kadar çıkabilir. Divalproeks sodyum ise barsaktan daha yavaş emilir ve ancak 3-8 saatte plazmada zirve seviyesine ulaşır. Yarılanma ömrü

yenidoğanlarda daha uzundur. Deney hayvanlarında yarılanma ömrü 11-14 dakikadır (73, 82- 84).

VPA ağız yolundan başlangıçta günde 10-15 mg/kg dozunda uygulanır. Günlük doz giderek artırılır ve 30 mg/kg düzeyine çıkarılır. Bazı durumlarda 60 mg/kg gibi oldukça yüksek bir doz düzeyine çıkmak gerekebilir, bu durumda dozun giderek yükseltilebilir kullanılması önerilir. Başlangıçtan itibaren yüksek dozda uygulanırsa belirgin sedasyon, somnolans ve hatta koma oluşturabilir (73).

2.3.3. Etki Düzenegi

Beyinde Gama Aminobutirik Asit (GABA)'nın etkinliğini artırır. GABA inhibitör etkinliği olan bir nörotransmitterdir. Bu etkinliğini GABA turnoverını ve GABA yıkımını azaltma, GABA salınımını artırma gibi mekanizmalarla gerçekleştirir. Ayrıca kronik kullanımında limbik GABA B reseptörlerinin artışına yol açma, glutamaterjik nörotransmisyonu yavaşlatma, N-metil-D-aspartat (NMDA) akımını ve aspartat salınımını azaltma gibi etkileri vardır (85). Valproatın sıçan medial prefrontal korteks (MPFC) piramidal nöronlarında NMDA tarafından indüklenen eksitator yanıtları engellediği, nöronal ateşlemeyi %60 oranında azalttığı, eksitator aminoasitleri modüle ettiği gösterilmiştir. Valproat voltaj duyarlı sodyum kanalları üzerinde doğrudan baskılayıcı (inhibitör) bir rol oynayarak nöral uyarılabilirliği /ateşlemeyi azaltıcı etki gösterir (86).

Valproat histon deasetilazı (HDAC) baskılar (87) ve GSK-3 (Glikojen Sentaz Kinaz- 3)'ün fosforilasyonla indüklenen inaktivasyonu gerçekleştirir. GSK-3 nöroproteksiyon ve sirkadyen ritimleri etkiler. Valproat ve lityum bu yolla manik belirtileri baskılar. Histon deasetilaz baskılanması bir yandan da bir dizi gen ekspresyonunda değişikliğe yol açar. Bu değişikliklerin, ilacın nörotrofik, nöroprotektif ve hücre içi sinyal sistemi üzerindeki etkilerinin temel unsuru olduğu düşünülmektedir (88). Ek olarak valproat ekstrasellüler "signal- regulated" kinaz (ERK)'ı aktive eder. ERK'ın baskılanması farelerde mani benzeri belirtileri tetikler (89). Yapılarındaki mevcut aminoasit diziliminin gösterdiği bazı özellikler nedeniyle asidik karakterdeki DNA'ya sıkı şekilde bağlanan Histonlar hücrede DNA depolanmasını sağlayan proteinlerdir. Histonların asetilasyon ve deasetilasyon

işlemleri enzim kontrolünde (asetilaz, deasetilaz) gerçekleşen, protein sentezinde önem arz eden aşamalardır. Histon deasetilaz enzim inhibitörleri histonların aşırı asetilasyonu sonucunda hücre siklusunun durdurulmasına ve apoptozun indüklenmesine neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır (90, 91). Son zamanlarda, VPA'nın bir histon deasetilaz (HDAC) inhibisyon aktivitesine sahip olduğu ve yaygın olarak kullanılan anti kanser ilaçlarının sitotoksitesini, kanser tedavisi için klinik gelişme açısından umut verici etkisi olan epigenetik mekanizmalar yoluyla güçlendirdiği gösterilmiştir (9).

Valproat beyinde miyo- inositol- 1 fosfat sentaz aktivitesini baskılayarak miyo-inositol düzeylerinde azalmayı sağlar. PK-C (Fosfokinaz C) reseptör proteinlerinin, nörotransmitterlerin ve nöropeptidlerin, sinyal moleküllerinin, transkripsiyon faktörlerinin ve hücre iskelet proteinlerinin fosforillenmesinde rol oynar. Valproat PK-C' nin protein içeriğinde ve aktivitesinde önemli azalmaya yol açar.

ERK yolağı memeli beyinde nörogenez, nöral sağ kalım, dendritik arborizasyon ve sinaptik plastisiteyi artırıcı özellik gösterir. Bu etkiler, ERK tarafından ekspresyonu indüklenen trofik ve koruyucu faktörler üzerinden gerçekleşir. Valproatın klinik olarak anlamlı serum konsantrasyonlarında ERK yolağını aktive ettiği, in vitro ERK fosforilasyonunun c-Fos gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. İn vivo valproat sıçan frontal korteksinde bcl-2 düzeylerinin artmasına yol açar, bu da ERK yolağının aktivasyonunu sağlar. Aynı zamanda beyinden köken alan nörotrofik faktör (BDNF) düzeyleri de artar. ERK yolağının aktivasyonu trofik değişikliklerin yanı sıra reseptör ekspresyonunda da değişikliğe yol açar. Tüm bunlar, valproatın nöroprotektif etkisini sağlayan unsurlar olup, bipolar bozuklukta görülen nörodejeneratif süreci geri döndürme katkıları vardır (73).

2.3.4. Yan Etkileri

VPA'nın en sık görülen yan etkileri gastrointestinal yakınmalardır. Bu şikayetler daha çok kendini sınırlayıcıdır. Bulantı ve kusmanın, VPA'nın mideye doğrudan olan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (92).

Sedasyon tek başına VPA alan kişilerde nadir olmasına rağmen, fenobarbital eklendiğinde belirgin hale gelebilmektedir. Bunun yanı sıra doz ilişkili tremor, uyuşukluk, ataksi, nistagmus, dizartri görülebilir. Tremorlar, statik veya selim esansiyel tremor şeklindedir ve doz azaltılması ile kaybolmaktadır. Trombosit agregasyonunu inhibe etmesine bağlı olarak kanama zamanını uzatabilir, fibrinojen düzeyini düşürür ve kemik iliği süpresyonu yapabilir. Seyrek olarak geçici saç dökülmesine neden olabilir (73).

VPA ile ilişkili en önemli yan etki hepatotoksisitedir. VPA tedavisi alan hastaların %15-30'unda karaciğer fonksiyon testlerinde geçici artış görülebilmektedir. Hepatotoksisite iki farklı şekilde görülebilmektedir. Daha sık görülen; geçici, doza bağlı, karaciğer enzimlerinde asemptomatik artış ile giden, diğeri ise; nadir görülen, ağır seyirli ilaç dozuna bağlı olmayan, semptomatik hepatit ile giden tipidir. Birinci tip, genellikle tedavinin ilk üç ayında ve hastaların önemli bir kısmında görülmektedir. Aspartat aminotransferaz (AST) ve Alanin aminotransferaz (ALT) değerleri, dozun azaltılması ile ve hatta doz azaltılmadan tedaviye devam edilmesine rağmen kendiliğinden zaman içinde düşmektedir. İkinci tip nadir de olsa ölümcül seyredebilmektedir ve bu yan etki aşırı duyarlılık şeklindedir (73, 92). Bu risk özellikle 2 yaşın altındaki hastalarda daha yüksektir (93). VPA, karaciğerde koenzim A'ya bağlanarak yağ asitlerin beta-oksidasyonunu inhibe etmekte, buna bağlı olarak ketoasidoza yol açabilmektedir. Ayrıca karaciğerde üre sentezini inhibe ederek yatkınlığı olan kişilerde amonyak düzeyinde artma (hiperamonemi) ve buna bağlı ensefalopatiye yol açabilmektedir (92). Pankreatit, VPA'nın nadir görülen ancak önemli yan etkilerindendir (73).

Son yıllarda kullanım alanının genişlemesi nedeniyle VPA zehirlenmesi olgularında artış sözkonusudur. VPA zehirlenmesinde görülen bulgular; solunum depresyonu, koma, konvülsiyon, metabolik asidoz, hiperamonyemi, methemoglobinemi, hipernatremi, hipotansiyon, lökopeni ve trombositopenidir (94).

VPA'nın gebelikteki kullanımının fetüs üzerindeki teratojenik ve toksik etkileri kesin gibidir (95). İlk trimestirde valproat kullanımı sonrası nöral tüp defekti görülme oranının %3,8-9 arasında değiştiği gösterilmiştir (96, 97). Gebelik sırasında valproata maruz kalan fetüsde görülen diğer malformasyonlar; iskelet anomalileri, lumbosakral meningomyelose, septo-optik displazi ve konjenital kalp defektleridir

(95). Epikantik kıvrım, düz nazal köprü, küçük burun ve dışa dönük burun delikleri, uzun ince üst dudak ile kalın alt dudağın görüldüğü fasiyal anomaliler, eklem deformiteleri ile nörogelişimsel kusurların eşlik ettiği fetal valproat sendromu tanımlanmıştır (98).VPA'nın yüksek dozlarda kullanımının majör malformasyon oluşma riskini doza bağımlı olarak arttırdığı iddia edilirken (97, 99); başka bir çalışmada ise dozun etkili olmadığı bildirilmiştir (100). Gebelikte valproata maruz kalan çocukların sözel IQ düzeylerinin diğer antiepileptiklere maruz kalan çocuklara ve topluma göre daha düşük olduğu bulunurken (3); kızlarda otistik spektrum bozukluklarının da görülme sıklığında artış gözlenmiştir (95). Stauntan ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada tek başına VPA alan 31 gebe kadından 3'ünde spontan düşük olduğu ve doğan bebeklerin 3'ünde dismorfî, spina bifida, belirgin immatürite ve diğer malformasyonlar bulunduğunu bildirilmiştir (101).

VPA'nın toksik etkilerinin folik asit (FA) eksikliği, oksidatif stres ve histon deasetilaz inhibisyonu ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (95). FA alımının nöral tüp defekti oluşma riskini azalttığı bilinse de, ne kadar koruyucu etkisi olduğu tam bilinmemektedir (102).

2.4. Folik Asit

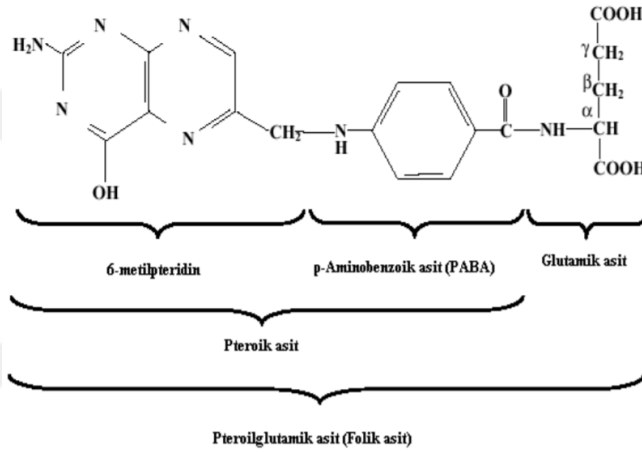
Folat ve folatın sentetik bir formu olan FA suda çözünen vitamin B9 formlarıdır. Folat vücuttaki tüm hücrelerde değişik biçimlerde görevi olan bir vitamindir. Besinlerde bulunan doğal folat, pişirme, dondurma ve saklama koşullarından olumsuz olarak etkilenebilirken, sentetik form daha dayanıklıdır. Sentetik olarak elde edilen FA'in pteridin halkası redükte olmadığından kimyasal oksidasyonlara karşı çok dirençlidir (103).

Latince 'folium' 'yaprak' anlamına gelmektedir. İlk olarak ıspanak gibi koyu yeşil yapraklı sebzelerden izole edildiği için bu ad verilmiştir. İlk olarak 1931 yılında Lucy Wills tarafından keşfedilmiştir, ancak bu B kompleks vitaminine kesin bir isim verilememiştir. Bu vitaminin eksikliğinin nörolojik komplikasyonlar olmadan kanda pernisiyöz anemi bulgularına neden olduğu anlaşılmıştır. Araştırmacılar bu tanımlanamayan B vitaminine Vitamin M, Vitamin Bc ve U Faktör gibi isimler vermişler (104, 105). Daha sonra 1941 yılında Herschel K. Mitchell,

Esmod E. Snell ve Roger J. Williams ilk olarak ıspanak bitkisinden bu B vitaminini elde ederek FA ismini vermişlerdir. Sonrasında yapılan çalışmalarda FA'nın, vitamin Bc ile eşdeğer olduğu anlaşılmıştır (105).

2.4.1. Folik Asit'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

FA pteridin halkasına p-aminobenzoik asit (PABA) bağlanması sonucu oluşan pteroiik aside ilave bir veya daha fazla glutamik asit kalıntısından oluşur. Bundan dolayı pteroilmonoglutamik asit olarak da bilinir.



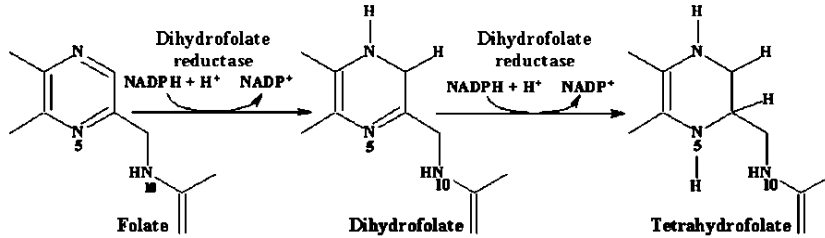
Şekil 1. FA'in Kimyasal Yapısı

İnsanlar ve hayvanlar PABA sentezini yapamazlar ve dolayısıyla glutamati pteroiik aside bağlayamadıklarından diyetlerinde folata gereksinim duyarlar (106).

Pteridinin yapısında primidin ve prazin halkaları bulunur. Pteroglutamik asidin prazin halkasının 7 ve 8 numaralı pozisyonlarına hidrojen iyonlarının eklenmesi ile gerçekleşen redüksiyon ile dihidrofolik asit (DHF) veya 5-6-7-8 numaralı pozisyonlara hidrojen iyonlarının eklenmesi ile gerçekleşen redüksiyon ile tetrahidrofolik asit (THF) oluşur.

Birçok besin maddesindeki folat, fazla miktarda glutamik asit zincir kalıntılarına bağlı olarak bulunur. Bu yüksek oranda negatif yüklü zincir kısmı, vitaminin ince barsaktan absorpsiyonunu bozmaktadır. Bununla birlikte barsak lümeninde bulunan konjugazlar (- glutamil karboksipeptidaz) poliglutamatları mono ve diglutamatlara çevirir. Böylece folik asit proksimal jejunumdan absorbe edilebilir.

FA, vitaminin aktif formu değildir. FA hücre içinde (Esas olarak depolandığı karaciğerde ve barsak mukoza hücrelerinde) dihidrofolat redüktaz enziminin görev aldığı 2 indirgenme reaksiyonu sonucu aktif formu olan tetrahidrofolata dönüşür. Dihidrofolat redüktaz NADPH gerektiren bir enzimdir (107).



Şekil 2. Folatın Aktif Formu Olan Tetrahidrofolata İndirgenmesi (106).

Tetrahidrofolat türevlerinin görevi biyosentez reaksiyonları sırasında çeşitli tek karbon birimlerinin taşınması ve transferidir. Bu tek karbon grupları N5, N10 veya her iki azot atomu arasındaki köprü üzerinde taşınabilir. Tek karbon birimleri: metil, metilen, metenil, formil ve formimino gruplarıdır (107).

FA'in başlıca fonksiyonları pürin bazlarının sentezi, timidilat sentezi, metionin sentezi, serin – glisin dönüşümü, bakteri protein sentezinde formil metionin oluşumu, histidin metabolizmasıdır. En önemli fizyolojik görevi hücrel reaksiyonlarında koenzim olmasıdır. Bu özellikleri nedeniyle DNA, RNA, aminoasit ve lipid sentezinde önemli rol oynarlar. Özellikle nükleoprotein sentezi, mitoz bölünme ve antikonvülzanların metabolizmasını içine alan ilaç hidrosillenme tepkimeleri gibi birçok metabolik süreçte fonksiyonu bulunmaktadır (103). Yapılan çalışmalarda folik asidin serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir (108).

2.4.2. Doğal Kaynakları ve Elde Edilmesi

Dünya Sağlık örgütü (WHO) gebe olmayan kadınlarda ve yetişkinlerde günlük FA alımını 170 mikrogram (μg) olarak önerirken, nöral tüp defektindeki etkisi göz önüne alınarak gebelikte bu miktarı 370-470 μg , emzirme döneminde ise 270 μg olarak belirlemiştir (109).

Kişi başına tüketilen besin miktarı ile besinlerin FA içeriklerinden yararlanılarak, ülkemizde besinlerden günde 353 mcg FA alındığı hesaplanmıştır. Ancak, folik asit ısı, ışık ve asit ortama duyarlı olup pişirme ile besinlerin folik asit değerleri düşmektedir. Kayıp oranı pişirme yöntemine göre değişmekle beraber sebzelerdeki folik asit miktarında önemli kayıplar olmakta, en çok kayıp da %90-95 oranında bol suda pişirilen ve suyu atılan sebzelerde meydana gelmektedir. Bu durumda ülkemizde besinlerle günde 350 mcg civarında FA alındığı hesaplanmakla beraber, folik asit kaybını ortalama %30 olarak düşündüğümüzde miktar 250 mcg civarına düşmektedir. Yani kadınlar günlük beslenmeleriyle gebelik öncesi ve gebelikte önerilen miktarda folik asiti alamamaktadır (110).

Normal erişkin bireyler çeşitli vücut depolarında 5 – 20 mg. folik asit bulundurlar. Bunun yarısı karaciğerde depolanır. Günlük minimum gereksinim de göz önüne alındığında günlük alım veya intestinal absorpsiyon kesildiğinde aylar içinde folik asit eksikliği oluşur (107).

Tablo 1. Folat ve Folik Asit İçeren Bazı Yiyecekler (111).

Yiyecek	Mikrogram (µg)
Dana ciğeri, pişirilmiş, kızartılmış, 85,2 gr.	185
Börülce, kuru, pişirilmiş, haşlanmış, ½ fincan	105
Ispanak, dondurulmuş, pişirilmiş, haşlanmış, ½ fincan	100
Kuru Fasulye, haşlanmış, ½ fincan	90
Kuşkonmaz, haşlanmış, 4 dal	85
Ispanak, ham, 1 fincan	60
Bezelye, dondurulmuş, haşlanmış, ½ fincan	50
Brokoli, doğranmış, dondurulmuş, pişirilmiş, ½ fincan	50
Brokoli, ham, 2 dal (her biri 12,5 cm uzunluğunda)	45
Avokado, ham, her çeşit, dilimlenmiş, ½ fincan dilim	45
Yerfıstığı, her çeşit, kavrulmuş, 28,4 gr	40
Marul, doğranmış, ½ fincan	40
Buğday, ham, 2 yemek kaşığı	40
Domates suyu, konserve, 170,4 gr	35
Portakal suyu, soğuk, konsantreler dahil, ¾ fincan	35
Turp otu, dondurulmuş, pişirilmiş, haşlanmış, ½ fincan	30
Portakal, taze, 1 küçük	30
Yumurta, tam, ham, taze, 1 iri	25
Kavun, ham, ¼ orta	25
Muz, ham, 1 orta	25
Ekmek, tam tahıl, 1 dilim, 28gr.	14
Ekmek, beyaz, 1 dilim, 25 gr.	6

E. Snell ve arkadaşları ilk olarak 1941 yılında, test organizması olarak *Streptococcus lactis*'i kullanarak, dört ton ıspanaktan FA diye tarif ettikleri büyüme faktörünü saflaştırdılar (112). FA doğal besin kaynaklarından saflaştırma yoluyla elde edilebildiği gibi bakteriler tarafından biyosentez yoluyla da elde edilebilir. Günümüzde sentetik olarak da laboratuvarlarda elde edilmektedir. Ülkemizde ticari olarak satılan Folbiol tablet© 5 mg FA içermekte ve nutrisyonel megaloblastik anemi, malabsorbsiyona bağlı megaloblastik anemi, beslenme yetersizliği, sprue hastalığı, gebelik, çocuk gelişimi ve nekahat dönemleri gibi endikasyonlarla kullanılmaktadır. Yine farklı dozlarda FA içeren ve çeşitli endikasyonlarda kullanılan tabletler ve drajeler bulunmaktadır (113).

2.4.3. Güvenliği ve Toksisitesi

FA suda çözünen bir B kompleks vitaminidir. Ortalama kandaki miktarı 5,9 ng/ml (5-17pg/ml) dir. Oral folik asit (piteroglutamik asit) alımı insanlar için toksik değildir. Günlük 5-10 mg FA alımı hamilelerde çok iyi tolere edilmektedir (114). Ancak tanısı konmamış pernisiyöz anemisi olan hastalarda anemi bulgularını maskeleyip nörolojik hasara neden olabilir (105). Bu nadir görülen bir durumdur ve serum Vit. B12 seviyesinin ölçülmesiyle kolayca önlenebilmektedir. İlaçla tedavi edilen epilepsili hastalarda çok dikkatli kullanılmalıdır. Çünkü dikkat edilmezse epilepsinin kontrolünü güçleştirebilir (114).

Tablo 2. Yaş Gruplarına Göre FA İçin Önerilen Günlük Alım Miktarları (115).

Grup	Ortalama tahmini ihtiyaç (µg)	Diyetle önerile miktar (µg)	Tolere edilebilen üst limit (µg)
Çocuk 1-3 yaş	120 µg	150 µg	300 µg
Çocuk 4-8 yaş	160 µg	200 µg	400 µg
Çocuk 9-13 yaş	250 µg	300 µg	600 µg
Adölesan (14-18 yaş)	330 µg	400 µg	800 µg
Erişkin (19 yaş üzeri)	320 µg	400 µg	1,000 µg
Hamile Kadın	520 µg	600 µg	1,000 µg
Emziren Kadın	450 µg	500 µg	1,000 µg

2.4.4. Tıptaki Kullanım Alanları

Homosistein, FA eksikliğinde yükselir ve koroner kalp hastalığında bir risk faktörüdür. FA desteği plazma homosistein seviyesini düzelterek, aterosklerotik hastalıklara bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltabilir. Folattan zengin sağlıklı diyetin yanında 400 mg FA desteği hamilelikten önce ve hamileliğin ilk haftalarında önerilmektedir. FA desteği beyin ve medulla spinalisin doğumsal defektlerinin büyük kısmını önler. Bunun yanında FA'nın, nöral tüp defektlerinin oluşmasını nasıl engellediği hala tam olarak anlaşılmamakla birlikte hızla gelişen fetusta, FA'nın nükleik asit ve aminoasit metabolizması üzerindeki etkisinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (104).

Nöral tüp ovulasyon sonrası 18-28. günler arasında birbirinden bağımsız beş aşamada kapanmaktadır. Bu aşamaların herhangi birindeki yetmezlik nöral tüp defekti ile sonuçlanmaktadır (116). Nöral tüp defektlerinin büyük çoğunluğu multifaktöryeldir. Folik asit ise nöral tüp defektleriyle ilişkilendirilen en önemli çevresel faktördür (117).

Gebelikte, FA yıkımının hızlanması ve fetusun gelişmesine bağlı hızlı DNA sentezi nedeniyle günlük gereksinim artar. Bu nedenle gebelik süresince hamilelere FA takviyesi yapılır. Gebelik öncesi dönemde yeterli miktarda FA almanın nöral tüp defekti gelişmesini önlemedeki yararı nedeniyle gebeler için tavsiye edilen günlük miktarın doğurganlık çağında olupta gebe kalma olasılığı olan bütün kadınlar tarafından da alınması gerekmektedir (118, 119).

FA'nın koruyucu etkisinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte FA'nın transport ve metabolizmasını regüle eden genlere bağlı olabilir (120). Yine bununla ilgili bir başka hipoteze göre ekstra FA desteği, FA veya besinlerdeki folatın emilimini bozan metabolik defektin üstesinden gelinmesini sağlayabilir (121).

Gebelikteki FA eksikliği, çeşitli gelişme bozukluklarına yol açar. FA eksikliğinin antiepileptik ilaçların teratojenik etkisinde de tetik çekici rolü olduğu ileri sürülür. FA'nın aktif deriveleri, nükleik asit ve protein sentezinde rol aldıklarından, gebelikte FA eksikliği hızla büyüyen embriyonik dokuları etkiler. Etkilenen sistemler, anomalinin tipi ve insidansı, eksikliğin zamanı, süresi ve ciddiyetine göre değişir (122).

Hamilelik sırasında antikonvulsan ilaçlar kandaki FA konsantrasyonunu azaltır. İlaçların inaktivasyon oranında azalmaya neden olabilecek şekilde FA seviyesindeki düşüş, antikonvulsanların kan konsantrasyonlarının yükselmesine neden olur ve bu durum ilacın toksisitesini artırır. Bu yüzden teratojenik etkiler FA'in birlikte kullanımı ile azaltılabilir. Diğer taraftan serumdaki yüksek FA konsantrasyonu ilacın hızlı inaktivasyonuna neden olur (123).

Folat eksikliği psikogeriatrik hastalarda yaygındır ve muhtemelen yüksek plazma homosistein seviyesinin temel nedenidir (124). Özellikle depresyonlu hastalarda FA eksikliği çok sıktır (125). Kükürt içeren bir amino asit olan homosistein DNA hasarı, PARP (Polipolimeraz - nükleus içersinde bulunan DNA tamir ve stabilitesinde rol oynayan bir enzim) aktivasyonu ve P53 gen aktivasyonu gibi mekanizmalarla apoptozisi tetikler ve nöral hasar oluşturabilir. Son zamanlarda hiperhomosisteineminin Alzheimer hastalığının oluşmasında muhtemel bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (126).

FA kardiyovasküler hastalıklar üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Hiperhomosisteinemi koroner arter hastalıkları, kalp krizi, periferik vasküler ateroskleroz, arteriyel ve venöz tromboembolizm için bağımsız bir risk faktörüdür. FA, vitamin B12 ve vitamin B6'nın plazma homosistein seviyesini düşürmede etkili olduğu gösterilmiştir (127). Venöz tromboz hamilelikte kadınlar için ciddi bir tehdittir. Yapılan geniş katılımlı bir çalışmada FA verilenlerde verilmeyenlere göre daha az hiperkoagulobilitateye rastlanmıştır (128).

FA tedavisinin muhtemel antioksidan mekanizmasıyla ailesel hiperkolesterolemili hastalarda endotel fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (129). Koroner arter hastalığı olan hastalarda, yüksek doz (30mg) FA'in oral yolla verilmesinin kan basıncını akut olarak düşürdüğü ve koroner dilatasyonu arttırdığı gösterilmiştir (130). Diyaliz öncesi böbrek hastalığı olan çocuklarda 1 mg/gün FA verilerek yapılan bir çalışmada, kan homosistein seviyesinin bariz bir şekilde düşürüldüğü gösterilmiştir (131). Metotreksat kullanan romatoid artritli hastalarda yapılan bir çalışmada, metotreksatın homosistein üzerindeki negatif etkisinin FA kullanımıyla giderilebildiği gösterilmiştir (132).

Bazı epidemiyolojik çalışmalarda, özellikle orta derecede alkol kullanan kadınlarda folat kullanımıyla artmış meme kanseri riskinin azaltıldığı gösterilmiştir.

Yüksek plazma FA seviyesine sahip kadınlarda, düşük plazma FA seviyesine sahip kadınlardan daha az meme kanseri riski olduğu gösterilmiştir (133). Bir araştırma ekibi, yüksek oranda alkol (günde iki kadehten fazla) alımıyla birlikte, düşük oranda folat ve methiyonin alanlarda kolon kanseri riskinin üç kat arttığını bildirmektedirler. Yine aynı araştırmacı ekip yüksek miktarda alkol kullanan fakat yüksek oranda folat ve methionin alan erkeklerde kolon kanseri riskinde, alkol almayanlara göre daha fazla bir artışın olmadığını tespit etmişlerdir (134). Hamilelikte FA desteğinin çocukluk çağı lösemi riskini azalttığı da gösterilmiştir (135). Bir araştırma gurubu çinko ile birlikte FA'in birlikte verilmesinin infertil erkeklerdeki sperm miktarını %74 oranında arttırdığını göstermişlerdir (136).

Bir başka araştırmacı grup tarafından yapılan çalışmada FA desteğinin yaşlı insanlarda yutma fonksiyonunu arttırdığı ve pnömoni insidansını azalttığı gösterilmiştir (137). Hafif ve orta dercede Chron hastalığı olanlarda homosistein seviyesi oldukça yüksektir. Bu yüzden Chron hastalığı olanlar FA desteğinden fayda görebilirler (138). Araştırmacılar düşük serum folat ve vitamin B12 düzeylerinde, muhtemelen homosisteinin de bulunduğu bazı mekanizmalarla işitme sistemini besleyen damar ve sinirlerin yapısında bozulmalar meydana geldiğini bildirmişlerdir ve işitmesi bozulmuş kadınların % 25'inde düşük serum folat seviyesi olduğu gösterilmiştir (139). Folattan zengin diyetle birlikte ek FA desteği mitojenlere karşı proliferatif cevabı, mezenterik lenf nodlarındaki T hücrelerin dağılımını ve dalaktaki sitokin üretimindeki yaşa bağlı değişiklikleri olumlu yönde iyileştirir (140).

2.5. Propolis

Propolis, işçi arılar (*Apis mellifera*) tarafından, reçine sağlayan ağaç ve çalıkların, kavak (*Populus spp*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*), akça ağaç (*Alnus glutinosa*) gibi yaprak, tomurcuk, gövde yerleri gibi büyüyerek yenilenen kısımlarından topladıkları reçinemsî yapışkan bir maddedir (141).

Bal arısı, propolisi pek çok amaç için kullanır;

- Kovadaki yarık ve çatlakların kapatılmasında,
- Kovan iç yüzeyini ince bir tabaka halinde kaplayarak kovanın dezenfeksiyonunda,
- Kovan içi petek ve çerçevelerin yapıştırılması ve onarılmasında,
- Peteklerdeki yavru gözlerinin propolis ile kaplanarak dezenfeksiyonunda,
- Kovana yabancı canlıların girişinin önlenmesinde, kovana giren ve kovandan atılamayacak büyüklükte olan yabancı canlıların öldürülmesinden sonra mumyalanarak kokuşmasının engellenmesinde,
- Kovan ön deliğinin kışa girmeden önce propolis ile kapatılarak soğuktan korunması gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

Propolis bu etkilerini içerisinde bulundurduğu fenolik bileşikler ve yapışkanlığı sayesinde gerçekleştirir. Özellikle fenolik bileşikler sayesinde kovayı bakteri, mantar ve virüs gibi patojenlerin oluşturacağı enfeksiyonlara karşı korur (142).

2.5.1. Propolis'in Fiziksel Özellikleri

Propolis reçineli ve yapışkan bir madde olup, kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak parlak, mat ve lifli bir görünüme sahiptir ve rengi sarıdan koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir. 15-20°C'de mum, 30-40°C'de yapışkan ve sakız kıvamındadır. Genel olarak 60-70 °C'de erir, fakat bazı propolisler 100 °C'de erir, dondurulduğu zaman ise sert ve kırılabilir bir yapı alır (143).

Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 45-50 reçine ve balsam (flavonoidler, fenolik asitler, esterler), %20-35 mum, %10-15 esansiyel ve aromatik yağlar, %2-5 polen ve %5 diğer organik ve inorganik maddelerden oluşmaktadır (144-146).

2.5.2. Propolis'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Dünyanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinde 300'den fazla kimyasal bileşik tanımlanmıştır (147). Bu bileşiklerin başlıcaları fenolik bileşikler

(flavonoidler ve fenolik asitler), benzoik asit ve türevleri, sinamik alkol, sinamik asit ve türevleri, monoterenler, diterpenler, triterpenler ve sesquiterpenler ile bunların alkol ve benzaldehit türevleri, diğere fenolik asit ve türevleri, alkoller, ketonlar, heteroaromatik bileşikler, alifatik hidrokarbonlar, mineraller, steroid hidrokarbonlar ve aminoasitlerdir. Propoliste lipidlerden en fazla yağ asitleri bulunur. Bunların yanında steroller, hidrokarbonlar ve uzun zincirli alkoller gibi sabunlaşmayan maddeler de bulunur. Ayrıca stearik, palmitik, nervolik, ekosapentanoik, araşidonik, oleik, linoleik ve linolenik asit propolisten izole edilmiştir. Propolisin içerisinde şekerlerden sukroz, glukoz, ksiloz, galaktoz, maltoz, ramnoz, furuktoz, ksilitol, taloz ve ribofuranoz tespit edilmiştir (147,148). Minerallerden; Na, K, Mg, Ca, Ba, Sr, Zn, Cd, Al, Si, Sn, Pb, Fe, Ni, Cr, Mn, Ti, Ag, Cu, Co ve Mo, vitaminlerden; B1, B2, B6, C ve E ile enzimlerden; süksinik dehidrogenaz, glukoz-6- fosfataz, adenozin trifosfataz ve asit fosfataz tespit edilmiştir (141, 149-151).

CAPE (Kafeik asit fenil esteri) de, propolis içeriğinde bulunan ve izole edilen çok geniş etkileri bulunan başka bir maddedir. Fenolik bir bileşik olan CAPE, propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olmakla beraber, antioksidan, anti-inflamatuar, antiviral, immün uyarıcı, reperfüzyon hasar önleyici ve antikanser özellikleri bulunan bir bileşiktir. En önemli özelliklerinden biri tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisidir (152-154).

Propolis lipofilik karakterde olduğu için metanol, etanol, kloroform, diklorometan, aseton, eter, dimetil sülfoksit (DMSO) ve gliserin (gliserol) gibi organik çözücülerde yüksek düzeyde, suda ise kısmen çözünmektedir (147, 148, 155, 156).

Tablo 3. Propoliste Tanımlanmış Bileşenler ve Sayıları (166-157).

Bileşikler	Tanımlanan Bileşik Sayısı
Flavanoidler	38
Hidroksiflavonlar	27
Hidroksiflavononlar	11
Kalkonlar	2
Benzoik asit ve türevleri	12
Asitler	8
Esterler	4
Benzaldehit türevleri	2
Sinamil ve sinamik asit ve türevleri	14
Alkoller, ketonlar, fenoller	8
Heteroaromatik bileşikler	12
Terpen, sekuterpen ve türevleri	7
Alifatik hidrokarbonlar	6
Sekuterpen ve triterpen hidrokarbonlar	11
Steroller ve steroid hidrokarbonlar	6
Mineraller	22
Şeker	7
Aminoasitler	24

Propolis toplamak için kullanılan bitki kaynağının bileşimi, propolisin kimyasal yapısını belirlemektedir (149). Propolisin toplanma sezonu da, aynı bölgeden toplanan propolisin kimyasal yapısını etkileyebilmektedir (158). Örneğin Akdeniz Bölgesi'nden (Sicilya ve Adriyatik kıyıları) toplanan propolis tek tip özellik gösterip, temel bileşeni diterpenik asitler (159) iken Brezilya'da 12 farklı tipte propolis tanımlanmıştır (160). Karasal iklime sahip bölgelerden toplanan propolisin (Asya, Avrupa, Kuzey Amerika vb.) başlıca kaynağının kavak bitkisi tomurcukları olduğu belirlenirken, bu propolisin çeşitli flavonoidlerini içeren fenolik bileşikler, aromatik asitler ve onların esterleri bakımından zengin olduğu belirlenmiştir (149). Kavak ağacı karasal bölgelerde yaygın olarak gözlenirken, tropik ve subtropik bölgelerde yetişmemektedir. Bu sebeple bu bölgelerde bal arıları başka propolis kaynaklarını tercih etmektedirler. Böylece tropik bölgelerde üretilen propolisin kimyasal yapısı kavak propolisinden tümüyle farklı olmaktadır (161). Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış propolislerin ana bileşenlerinin naringenin, galangin, krisin, pinobaksin, kuarsetin gibi flavonoidler ve kafeik asit gibi fenolik asitlerden oluştuğu gösterilmiştir (162).

Tablo 4. Propolis Tipi, Coğrafi Bölgesi, Kaynakları ve En Çok Bulunan Bileşikler (163).

Propolis Tipi	Coğrafi Bölge	Bitki Türü	Ana Bileşikler
Kavak propolisi	Avrupa, Kuzey Amerika, Amerika (tropik olmayan), Asya (tropik olmayan) ve Yeni Zelanda	Populus spp., P. nigra L.	Flavonlar, flavononlar, sinamik asit ve esterleri
Brezilya yeşil propolisi (Allekrım)	Brezilya	Baccharis spp., B. dracunculifolia	Prenilatlı p-kumarik asit ve diterpenik asit
Huş propolisi	Rusya	Betula verrucosa	Flavonlar ve flavonollar
Kırmızı propolis	Küba, Brezilya ve Meksika	Dalbergia spp.	İzoflavonoidler (izoflavonlar, pterokarpanlar)
Akdeniz propolisi	Sicilya, Malta, Yunanistan ve Girit	Cupressaceae	Labdane tip diterpenler
Clusia tip propolis	Küba, Venezüella	Clusia spp.	Poliprenilatlı benzofenonlar
Pasifik propolisi	Pasifik Okyanusu Bölgesi (Tayvan, Endonezya)	Macaranga tanarius	C- prenil-flavonlar

Propolis, içeriğinde bulunan aktif bileşiklerin çeşitliliği ve miktarına bağlı olarak birçok biyolojik aktivite kazanır. Fenolik bileşikler de propolis içinde ve propolise biyolojik etkinlik kazandıran en önemli gruptur.

Fenolik bileşikler, bitkileri bakteri, mantar ve zararlı böcek gibi patojenler ile UV ışınlarla karşı koruyan sekonder metabolitlerdir (164, 165). Fenolik bileşikler oluşturduğu çeşitli renkler ile polinatör böcekleri bitkilere çekerek tozlaşmanın sağlanmasına yardımcı olur. Bu etkilerin yanında fenolik bileşiklerin bitkilerde fotosentez, enerji transferi, bitki büyüme hormonunun aktive edilmesi ve düzenlenmesi, yapı ve cinsiyetin belirlenmesi gibi birçok fonksiyonları da vardır (165). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunur ve lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi tat unsurunun oluşmasında etkilidir (165,166). Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadır. Fenolik bileşiklerin alt sınıfı olan flavonoidler sağlık alanında birçok biyolojik etkisi nedeniyle fonksiyonel gıda veya biyoflavonoid adını almıştır. Bugüne kadar bitkisel

orijinli 4.000 den fazla flavonoid türü tanımlanmıştır (167). Aynı zamanda bu bileşikler P faktörü (permeabilite faktörü), P vitamini ve sitrin olarak adlandırılır (165). Fenolik bileşikler bitkiler için karakteristiktir ve genellikle bitkilerde hidroksi, metoksi, ester, metil ester veya glukozit formlarında bulunurlar

Fenolik bileşikler bir benzen (aromatik halka) halkasına bir hidroksil (OH) grubunun bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Bir veya daha fazla benzen halkasına OH gruplarının bağlanması durumunda polifenoller oluşur (166,168). Benzen halkasına bağlanan OH ve diğer fonksiyonel yapılar birçok fenolik bileşiğin oluşmasına neden olur (166).

Tablo 5. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırması (166).

Sınıflandırma	Kimyasal Yapı
Basit fenolikler	C6
Fenolik asitler ve benzer bileşikler	C6-C1
Asetofenonlar ve fenilasetik asitler	C6-C2
Sinamik asitler, sinamil aldehytler, sinamil alkoller, kumarinler, izokumarinler ve kromonlar	C6-C3
Flavonoidler; kalkonlar, avronlar, dihidrokalkonlar, flavanlar, flavonlar, flavononlar, flavonoller, antosiyaninler, antosiyanidinler	C15
Biflavoniller	C30
Benzofenonlar, ksantonlar, stilbenler	C6-C1-C6, C6-C2-C6
Kinonlar	C6, C10, C14
Betasiyaninler	C18
Dimerler ve oligomerler	Lignanlar ve neolignanlar,
Oligomerler ve polimerler	Taninler (tanenler)
Polimerler	Lignin ve flobafenler

Propoliste bulunan flavonoidler temel olarak antioksidan aktiviteden sorumludurlar. Bir flavon bileşiği olan pinosembrin, bakteriler, küf ve mayalar üzerine etki etmektedir. Bu flavonla birlikte galangin, 3-asetil pinobanksin, kafeik ve ferulik asitler propolisin biyolojik aktivitelerinin çoğundan sorumludur. Propolisteki diğer bir flavon olan quercetin, antiviral aktivite gösterir ve damarların kuvvetlendirilmesini sağlamaktadır. Propolisteki diğer flavonlar ve flavononlar, anti-inflamatuar, lokal anestetik ve spazmolitik aktivitelere sahiptir (169).

Tablo 6. Propolisteki Önemli Flavonoidler

Genel Adı	Kimyasal Adı
Chrysin	5,7-di O H (Hidroksi) flavon
Tectochrysin	5-OH-7-MET (Metoksi) flavon
Galangin 3	3, 5, 7-tri OH flavon
Acecetin	5,7-di OH-4'-MET flavon
Isalpinin	3,5-diOH-7-MET flavon
Kaempferol	3, 4, 5, 7-tetra OH flavon
Kaempferide	3, 5, 7-triOH-4'- MET flavon
Rhamnositrin	3,4',5-triOH-7- MET flavon
	3,5-diOH-4'7- MET flavon
	5,7-diOH-3,4'-diMETflavon
Isorhamnetin	3,4',5,7- tetraOH-3- MET flavon
Quercetin	3,3',4',5,7- penta OH flavon
Q-3, 3-dimethylether	4', 5, 7-tri OH-3,3'-di MET flavon
Pinocembrin	-di OH flavanon
Pinostrobin	5-OH-7-MET flavanon
Pinobanksin	3, 5, 7-tri Ottflavanon
3-Asetilpinobanksin	5, 7- di OH-3-asetil flavanon
	5-OH-4', 7-di MET flavanon
Sakuranetin	4', 5-di OH -7- MET flavanon
Isosakuranetin	5, 7-di OH-4'-MET flavanon

Flavonoidlerin çok sayıda bakteriye karşı etkili olduğu bildirilmektedir. Flavonoidlerce zengin ürünlerin, gram (+) bakterilere karşı gösterdiği anti-bakteriyel etkinin, gram (-) bakterilere göre daha aktif olduğu belirlenmiştir. Flavonoidler, pek çok DNA ve RNA virüslerine karşı etkili olduğu düşünülen, propolisin içinde bulunan en önemli maddelerdir (152).

Propolisteki flavonoidler genel olarak mide ülseri tedavisinde, damarların kuvvetlendirilmesinde, skorbüt hastalığının tedavisinde (C vitaminiyle birlikte) önemli rol oynar. Kalp kası üzerinde koruyucu etki gösterir. Lipid peroksidasyonunu zincir kırıcı etki göstererek önler. Dermatolojik rahatsızlıklarda, gingivitis, stomatitis tedavilerinde etkindir (14,170, 171).

Fenolik bileşiklerin diğer önemli alt grupları sinamil alkol, sinamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik ve ferulik asitlerdir. Kafeik asit fenetil ester (CAPE), melanom ve karsinomların gelişimini engeller. Pterostilben antidiyabetik, kafeik asit ise anti-inflamatuar özelliğe sahiptir (169, 172).

CAPE propolisten izole edilmiştir. CAPE'nin tümör hücreleri için sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir (173). Propolisin ana bileşenlerinden birisi olan CAPE,

reaktif oksijen türlerinin üretimini bloklamaktadır. Antioksidan, antimitojenik, anti tümör, anti virüs, anti bakteriyel, anti fungal ve bağışıklığı uyarıcı (immunostimulatory) özelliklere sahiptir. CAPE tedavisi birçok yanık hastalarında yararlı olabilir (174). Tümöral hücre gelişimini baskımlarken normal hücre gelişiminde ise CAPE nin yüksek oranlarda bile herhangi bir zararlı ve baskılayıcı etki göstermediği belirtilmiştir (175).

2.5.3. Propolis'in Biyolojik Özellikleri

Propolis çok eski zamanlardan beri halk arasında kullanılmakla birlikte, son yıllarda antibakteriyel, antifungal, antitümoral, immünomodülatör ve diğer faydalı biyolojik etkileri çok sayıda araştırmacı tarafından ispatlanmıştır (176). Çeşitli çalışmalarda propolisin su, metanol, etanol, eter ve yağ ekstraktları hazırlanmıştır. Bununla birlikte araştırmalarda en çok kullanılan propolisin etanolik ekstraktının antibakteriyel (177, 178), en fazla *Candida albicans*'ta olmakla birlikte *Candida* türleri ve dermatofitlere karşı antifungal (178-181), herpes simpleks ve reovirüs üzerine antiviral (182, 183), anti-inflamatuar (184,185), lokal anestejik (186), antioksidan (178, 187,188), immünstimulan (189-191) ve sitostatik (168 159) etki gösterdiği belirlenmiştir. Farklı orijine sahip propolis örneklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Brezilya propolisinin antibakteriyel, antifungal (180), antianjiyogenik, sitotoksik (192), antiülser (193), hepatoprotektif (158), analjezik ve anti-inflamatuar aktivitesi (194) belirlenirken, Bulgaristan propolisinin antifungal ve bakterisidal (195) aktivitesi belirlenmiştir. Günümüze kadar, Türk propolisinin antibakteriyel (93, 196) antifungal (124), antioksidan (172), antikarsinojenik (197), yara iyileştirici (198) gibi bazı biyolojik aktiviteleri incelenmiştir.

Propolisin güçlü antimikrobiyal aktivitesinden dolayı doğal antibiyotik olarak bilinir. Yapılan çok sayıda araştırmada yüksek antimikrobiyal bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Propolisin MRSA (Metisilin dirençli *Stafilokok aureus*) da dahil olmak üzere 21 tür bakteri, 9 tür mantar, *Giardia*'nın da dahil olduğu 3 protozoa türü ve Herpes ve Influenza'nın da dahil olduğu geniş yelpazeli virüsler üzerinde inhibitör etkisi bulunmuştur. Bunların dışında ayrıca propolisin geniş ölçüde tedavi edici

özellikleri vardır. Bu özellikler arasında, anti-kanser etki, yara kapama ve doku tamir etkileri, sindirim sistemi etkileri, deri enfeksiyonları etkisi, kalp-damar sistemi etkileri ve diş sağlığı etkisi sayılabilir (199).

Propolisin içeriğinde bulunan yapılardan biri olan Sinamik asit ve türevlerinin pıhtılaşmayı hızlandığı, gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı antibiyotik etki gösterdiği saptanmıştır. Yine içeriğindeki bioflavonoidlerin, virüslerin enzim salgılamalarını ve üremelerini engelleyici özelliklerinin olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Hipertansiyon, damar sertliği ve koroner kalp hastalıklarının tedavisinde 30 gün süre ile üç kez alınan 300 mg propolis dozlarının olumlu etkiler verdiği yapılan klinik çalışmalarla da kanıtlanmıştır (200).



Tablo 7. Propolisin Bileşiminde Bulunan Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri (145).

Bileşik	Aktivite
Flavonoidler	Kılcal damarların geçirgenliğini azaltma, anti-mikrobiyel özellik, ateş düşürücü, antioksidant, anti-hemoraji.
Krizin	Tümör hücrel toksisitesi, anti-helicobacter pylori.
Apigenin	Gastrik ülserin iyileştirilmesi
Acacetin	Ateş düşürücü
Quercetin	Hystaminopexic aktivitesi, anti-viral, kılcal damarların güçlendirilmesi, anti-tümoral aktivite, spazmolitik
Kaempferide	Spazmolitik, anti-mycobacterium phlei, mikroorganizmaların asit direncine karşı
Kaemperol-7,4'-dimethyl ether	Anti-mikotik
Ermanin	Anti-mikotik
Galangin	Bakteriyostatik ve antimikotik etki
Pinochembrin	Bacteriostatik aktivite, anti-küf, antiblastomycetes, antimikrobiyal ve antimikotik kullanım, anti-candida, lokal anestetik, anti-helicobacter pylori
Pinobanksin	Anti-mikrobiyel ve anti-mikotik
Pinobanksin-3-acetate	Anti- mikrobiyel ve antimikotik
Pectolaringenin	Spazmolitik
Uçucu bileşikler (etheric oils)	Anti-mikrobiyel aktivite ve ateş düşürücü etki
Methyl caffeate	Tümör inhibisyonu
Pinostrobin	Local anestetik
Flavan-3-ols	Kılcal damarların güçlendirilmesi
Luteolin	Anti-viral, gastrit ülserin iyileştirilmesi
3, 4-dimethyl ether of luteolin	Spazmolitik ve hipokoleretik
Artepillin C	Anti-tümoral etki; anti -leukemik etki
Eriodictyol	Kalp yetmezliğini iyileştirici etki, akut kalp yetmezliğini önleyici etki
Pinosylvin (3,5- dihydroxystilbene);	Anti-mikrobiyal etki, anti-mikotik etki
Ferulic asit	Anti-bakteriyel etki, aglutinant etki, collagenik etki
Isoferulic asit	Anti-staphylococcus aureus
Benzoik asit	Bakteriostatik ve bakterisit etki, balzamik ve antiseptik
Cinnamic asit	Anti-Staphylococcus aureus
p-coumaric asit benzyl ester	Anti-mikrobiyal ve anti-mikotik
Caffeic asit	Anti-viral, anti-bakteriyel aktivite, ateş düşürücü
Prenyl caffeate	Gizli kontak alerjen
3- methyl-but-2-enyl caffeate	Anti-viral aktivite
Caffeic asit phenetyl ester	Anti-tümoral aktivite

2.5.4. Propolis'in Antioksidan Özellikleri

Propolisin son yıllarda üzerinde durulan ve tartışılan özelliklerinden biri de antioksidan etkisidir. Propolisteki temel bileşikler olan flavonoidler ve bunlarla ilgili bileşiklerin serbest radikalleri temizleme etkisi bilinen antioksidan etkinliği göstermektedir. Bazı flavonoidler doymamış yağ asitlerinin peroksi radikalleri ile reaksiyona girip temizleyici etki yaparak özellikle lipid peroksidasyonunun başlangıç aşamasında etkili olurlar. Flavonoidlerin antioksidan etkileri, peroksit iyonları, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve diğer lipid peroksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırabilme yeteneklerine bağlanmıştır. Bu yeteneklerinin ön plana çıkmasında özellikle yapılarında bulunan OH- gruplarının sayısı önemlidir (201).

Yapılan araştırmalarda propolis ekstraktlarının aktif bileşeni olan CAPE ve flavonoidlerin (galangin, quercetin vb.) reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve CAPE'nin galangine oranla daha fazla olmakla birlikte her ikisinin de antioksidan özellikte olduğu ve ksantin oksidaz aktivitesini belirgin bir şekilde inhibe ederek serbest radikal oluşumunu önlediği gözlenmiştir (141).

Propolisin en önemli antioksidan mekanizması; serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipid peroksidasyonuna neden olan polimerize zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile ROS (Reactive oxygen species)'ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (202).

2.5.5. Propolis'in Toksik Özelliği

Propolis aşırı miktarlarda alınmadığı sürece toksik etki göstermemektedir. Bazı flavonlar, Ames testinde mutajen olmalarına karşın, propolis mutajen sonuç vermemiştir. Bazı kişilerin propolise karşı aşırı duyarlı olabilecekleri, dolayısıyla alerjik etkilerinin de olabileceği belirtilmektedir (169). Benzer şekilde normalden daha yüksek alımlarda propolisin insan ve hayvanlar için tehlikeli olabileceği vurgulanmaktadır (176, 203). Ancak propolisin belirtilen bu toksik etkilerini destekleyen literatür veriye rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınarak başlandı (Tarih: 26/06/2015; Protokol No: 2015/28). Bu Çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2015-5317).

3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Araştırma için ağırlıkları 180-250 gr arasında değişen ve iki düzenli siklus gösteren Sprague Dawley tipi dişi sıçanlar ile 24 tane yavru erkek sıçan kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, sınırsız beslenme şartlarında muhafaza edildi. İçme suyu olarak çeşme suyu, beslenmesi için standart sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi Tic. A.Ş., Erzurum, Turkey) verildi. Sıcaklık $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, nem % 50 ± 5 olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar çalışma süresince standart Tip III kafeslerde barındırıldı (Resim 1). Sıçanların bakımı, deneyin bütün uygulamaları ve sıçanların sakrifiye edilmesi KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkez'inde yapılarak çevresel stres ve uyum problemi yaşanmaması amaçlandı.



Resim 1. Sıçanların Çalışma Süresince Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler

İki düzenli siklus gösteren dişi Spraque Dawley tipi dişi sıçanlar ile erkek sıçanlar çalışmanın ilk günü aynı kafese konularak çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi gün dişi sıçanlara vaginal smear uygulandı ve smear örneğinde sperm tespit edilen dişi sıçanlar gebe olarak kabul edildi. Smear örneğinde sperm görüldüğü gün gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Gebe olduğu tespit edilen 8 dişi sıçan, her grupta 2 dişi sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Literatürde sıçanlarda implantasyonun 5. günde gerçekleştiği bildirildiğinden sıçanlara uygulamalar 6. günden itibaren doğuma kadar oral yolla uygulandı (204).

1. Grup: Kontrol Grubu 2 adet gebe sıçana herhangi bir uygulama yapılmayıp, doğuma kadar stressiz bir şekilde laboratuvar ortamında takip edildiler.

2. Grup: 2 adet gebe sıçana doğuma kadar her gün aynı saatte (9-10 saatleri arası) gavaj yoluyla 300 mg/kg/gün VPA uygulandı.

3. Grup: 2 adet gebe sıçana doğuma kadar her gün aynı saatte (9-10 saatleri arası) gavaj yoluyla 300 mg/kg/gün valproik asit +400 µg/gün FA uygulandı.

4. Grup: 2 adet gebe sıçana doğuma kadar her gün aynı saatte (9-10 saatleri arası) gavaj yoluyla 300 mg/kg/gün VPA + 100 mg/kg propolis uygulandı.

Her gruba ait yeni doğan sıçanlara doğumdan sonra herhangi bir uygulama yapılmadı ve çalışma süresince anneleri ile birlikte doğal beslenmeye bırakıldılar. Her bir anne ve yavruları ayrı kafeslerde tutuldu. Deney süresinin bitiminde (postnatal 21. gün) her iki gruptan elde edilen yavru sıçanlar kendi grupları içerisinde dişi ve erkek olmak üzere cinsiyet ayrımına tabi tutuldu. Çalışmaya her bir gruptan rasgele seçilen 6 yavru erkek sıçan ile devam edildi ve yavru erkek sıçanlar aşağıdaki şekilde isimlendirildi.

Yenidoğan 1. Grup (YD-1.G): Kontrol Grubu anne sıçanlardan elde edilen, yeni doğan erkek sıçanlar (n=6).

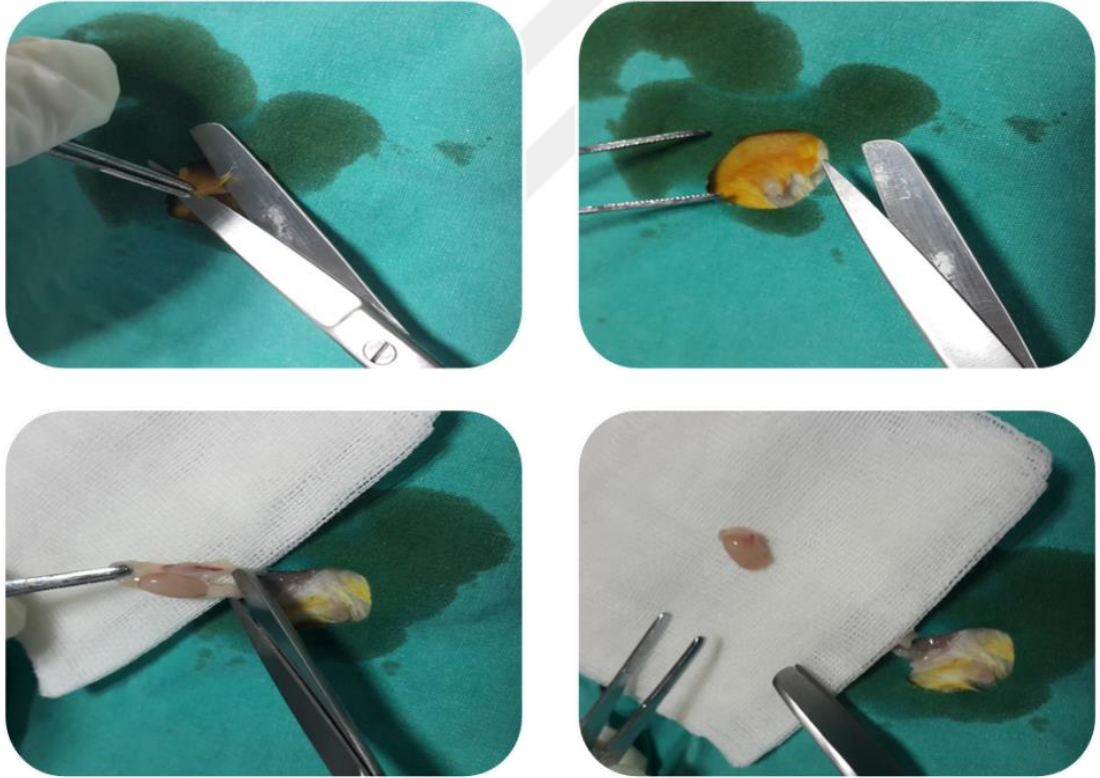
Yenidoğan 2. Grup (YD-2.G): VPA uygulanan anne sıçanlardan elde edilen, yeni doğan erkek sıçanlar (n=6).

Yenidoğan 3. Grup (YD-3.G): VPA + FA uygulanan anne sıçanlardan elde edilen, yeni doğan erkek sıçanlar (n=6).

Yenidoğan 4. Grup (YD-4.G): VPA + Propolis uygulanan anne sıçanlardan elde edilen, yeni doğan erkek sıçanlar (n=6).

3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması

Sıçanlar deney süresinin bitiminde (postnatal 21. gün) 50 mg/kg ketamin verilerek derin anestezi altında dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildiler. Dekapitasyonu takiben biyokimyasal parametrelerin çalışılması için hemen vakumlu-seperatör jelli tüplere her bir sıçandan 2 cc kan örneği alındı. Ardından abdominal alt bölgeden, orta hat kesisi yapılarak testisler çıkartıldı. Daha sonra testis dokusu ikiye ayrılarak yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin solüsyonunda tespit işlemine tabi tutuldu, diğer yarısı ise yine biyokimyasal değerlendirmeler için buzlu serum fizyolojik ile yıkanıp eppendorf tüp içerisine alınıp -80 °C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Alınan kan örnekleri 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı eppendorf tüpüne konularak biyokimyasal analizler için -80°C'de muhafaza edildi.



Resim 2. Testislerin Çıkartılması ve Testisin Makroskopik Görünümü

3.4. Histolojik İşlemler

3.4.1. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak Bouin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

- Doymuş Pikrik Asit çözeltisi 75 ml
- Formaldehit (%37) 75 ml
- Glasiyal Asetik Asit 5 ml

Bouin tespitini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi formaldehit ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı (205).

3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alma ve boyama işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Burada, Bouin solüsyonuna alınan testis dokuları üç gün ışık almayan kuru ve oda sıcaklığındaki ortamda saklandı. Daha sonra aşağıdaki gibi sırası, süresi ve dereceleri verilen alkollerden ve ksilen basamaklarından geçirilerek parafin bloklar haline getirildi. Alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen serilerinde saydamlaşması sağlandı (206).

Dokuların takibi:

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 (1 kez)
6. Ksilen 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde 3 kez 15 dakika bekletildi ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Dokular bloklandı.

3.4.3. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Her gruptan alınan testis dokuları, Bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra yukarıdaki işlemlerden geçirildi. Öncelikle tam otomatik mikrotom (LEICA RM 2255, USA) yardımıyla dokuya ulaşana kadar 20 µm' lik kesitlerle parafin bloklar trimlendi ve dokuya varınca dokudan 5 µm' lik ince kesitler alındı. Kesitler 45 °C' de benmari içindeki sıcak su üzerinde kırışıkların açılması için bekletilerek lam üzerine alındı. Lam üzerine alınan dokular Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanması için zembile yerleştirilerek parafinin erimesi için bir saat 60 °C etüvde bekletildi ve dokular daha sonra sırasıyla aşağıdaki rutin histolojik boyama işlem serilerinden geçirildi.

3.4.4. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

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 çıkarıldı.
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 kapatıldı.

3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

Preparatlar 60°C'lik etüvde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi. Daha sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

1. Periyodik Asit..... 3-5 dk
2. Suda yıkandı.
3. Preparatlar iyice kurutuldu.
4. Schiff reaktifi pipetle doku üzerini kaplayana kadar dökülür. 5-20 dk arası bekletildi (dokular kırmızı olana kadar).
5. Suda yıkandı
6. Hematoksilen boyasında bekletildi 2 dk
7. Suda yıkandı
8. Asit alkole batırılıp çıkarıldı
9. Suda yıkandı
10. Amonyakta tutuldu 5-10s
11. Suda yıkandı
12. Alkol serilerinden geçirildi
13. Kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Trikrom için Bovin hazırlanışı: 750 cc picrik asit, 50 cc asetik asit ve 200 cc formaldehit karıştırılarak hazırlandı.

Masson Trikrom Boyası Boyama Protokolü: Preparatlar 60°C'lik etüvde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi.

1. Ksilen 5 dk
2. Alkol..... 5 dk
3. BOVIN solüsyonunda 56°C'de etüvde 1 saat bekletildi.
4. Suda tutuldu (dokuların sarı rengi beyaza dönene kadar).

5. Mayer Hematoksilende bekletildi 2 dk
6. Suda yıkandı.
7. Trikrom Kombine boyada bekletildi 5 dk
8. Suda yıkandı
9. Alkol
10. Kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı (206).

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Stereoloji Laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan, yine aynı mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekilerek dijital ortama aktarıldı.

3.4.7. İmmünohistokimyasal İşlemler

Testisteki apoptozu değerlendirmek için terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nükleuslu TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Her testiste 10 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı bakılıp apoptotik indeks (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı (207).

TUNEL boyama için lam üzerine alınan 5 µm' lik kesitler polilizinli lamlara alınarak bir saat boyunca 60 °C' lik etüvde deparafinize edildikten sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BX-51) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi (206).

3.4.8. TUNEL Boyama

- 1) Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
- 2) %100 etanol 2x5 dk
3. %95 etanol 2x5 dk
4. %70 etanol 2x5 dk
5. Distile su ile yıkandı.
6. Oda ısısında 20 µg/ml Proteinase K 15 dk
7. PBS (phosphate buffer solution)'de yıkandı.
8. %3 H₂O₂'de 15 dk
9. Distile su ile yıkandı.
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 tutuldu.
13. PBS'de yıkandı.
14. 100 µ converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplanır ve 37 °C'lik etüvde inkübe edildi.
15. PBS'de 3x5 yıkandı.
16. 100 µl DAP ile 5 dk karanlıkta oda ısısında beklendi.
17. Distile suda 1x2 kez yıkandı.
18. H&E ile 15 sn boyanır ve çeşme suyu ile yıkandı.
19. %70 etanol 2x5dk
20. %95 etanol 2x5 dk
21. %100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk
23. Kurutulup kapatıldı.

3.5. Biyokimyasal Analiz

3.5.1. Propolisin İzole Edilmesi

Fanus Gıda (Merkez/Trabzon) tarafından, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanarak temin edilen ve buzdolabında -20 °C'de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, öğütücüde toz haline getirildi ve -20 °C'de tekrar donduruldu. 10 gr toz propolis balon jöjeye alınarak, son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı. Karışım iyice vortekslendikten sonra 60 °C'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışım 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi; süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 mikrolitrelik filtrelerden geçirildi. Filtratlar daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20 °C'de, karanlıkta saklandı (208,209).

Gebe sıçanlarda VPA uygulanmasının testisler üzerinde herhangi bir hasara neden olup olmadığını anlamak için testis ve kan dokusunda biyokimyasal parametrelere bakıldı.

3.5.2. Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

MDA ölçümü, Mihara ve Uchiyama yöntemi (210) modifiye edilerek yapıldı. Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu molekülün renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1) Doku homojenizasyon tamponu (0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH 7.4): 10 adet PBS tableti (Medicago, 09-2051-100, Uppsala, Sweden) içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözüldü ve çözeltinin pH'sı, pH metrede (Hanna Instrument, HI 9321, USA) 7.4'e ayarlandı. pH'sı ayarlanan çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

2) % 1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H₃PO₄ (Sigma, 04107, St. Louis, MO, USA) alındı ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

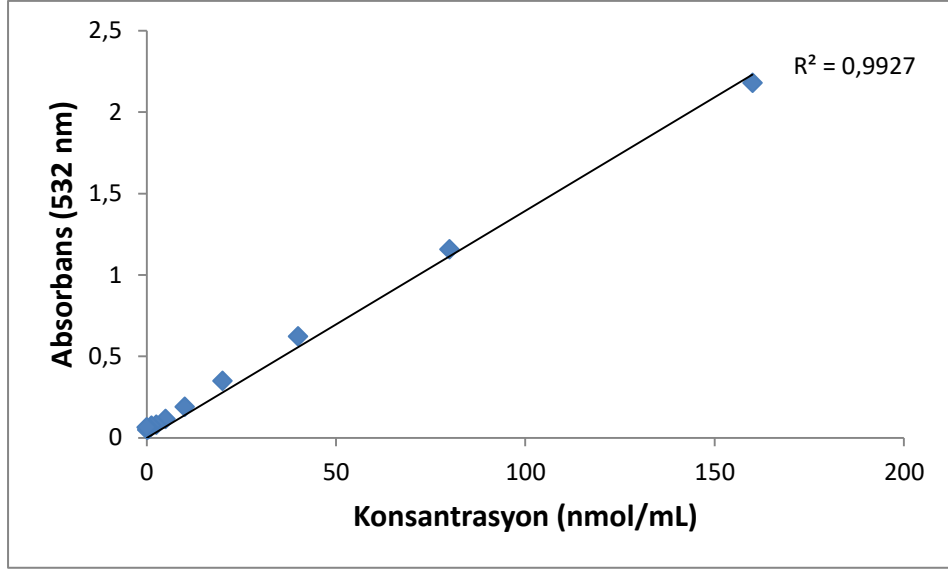
3) TBA çözeltisi: 0.67 g TBA (Sigma T5500, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, A6283, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

4) Standart çözeltiler: 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, T1642, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, 258148, St. Louis, MO, USA) çözeltisine ilave edildi. Çözelti 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.3125 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

Örneklerin Hazırlanışı: Alınan dokuların her birinden yaklaşık 50'şer mg'lık kesimler yapıldı. Sonrasında bu dokular 2 mL fosfat tamponu (PBS, pH=7.4) içerisinde 9500 rpm (4x10s, 40°C)'de Ultra-Turrax homojenizatör (model T25, Jane and Kunkel, Germany) ile homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar kullanılarak MDA ölçümü gerçekleştirildi.

Doku MDA Ölçümü

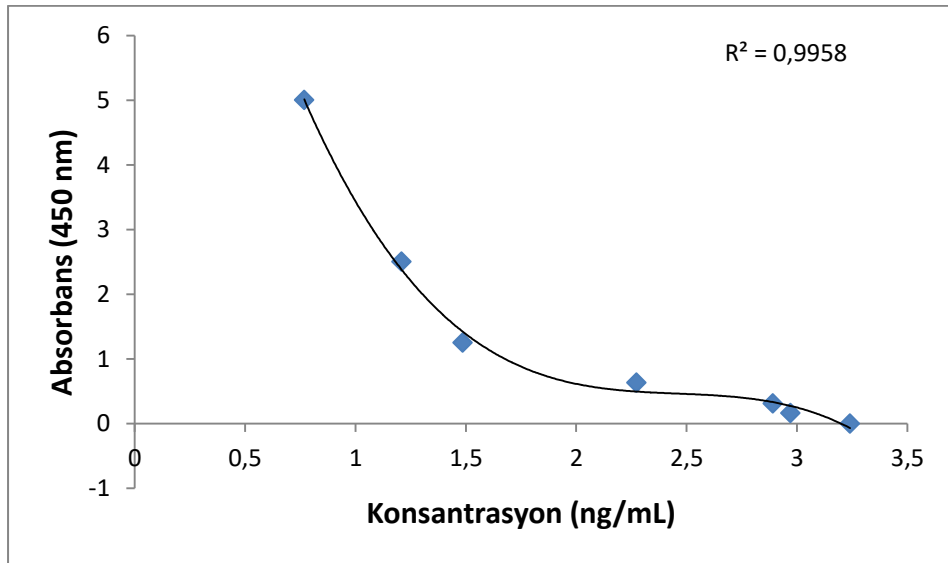
1. 500 µL homojenata 3 mL % 1'lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı.
2. Karışıma 1 mL % 0.672'lik TBA eklendip karıştırıldıktan sonra 60 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi.
3. Süre sonunda tüpler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve sonrasında oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonucu süpernatant kısımlardan 200'er µL alınıp 96 kuyucuklu pleytlere yüklenerek mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu. Elde edilen standart absorban sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak doku MDA miktarı nmol MDA/gram ıslak doku olarak hesaplandı.



Şekil 3. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği

3.5.3. SOD Seviyelerinin Belirlenmesi

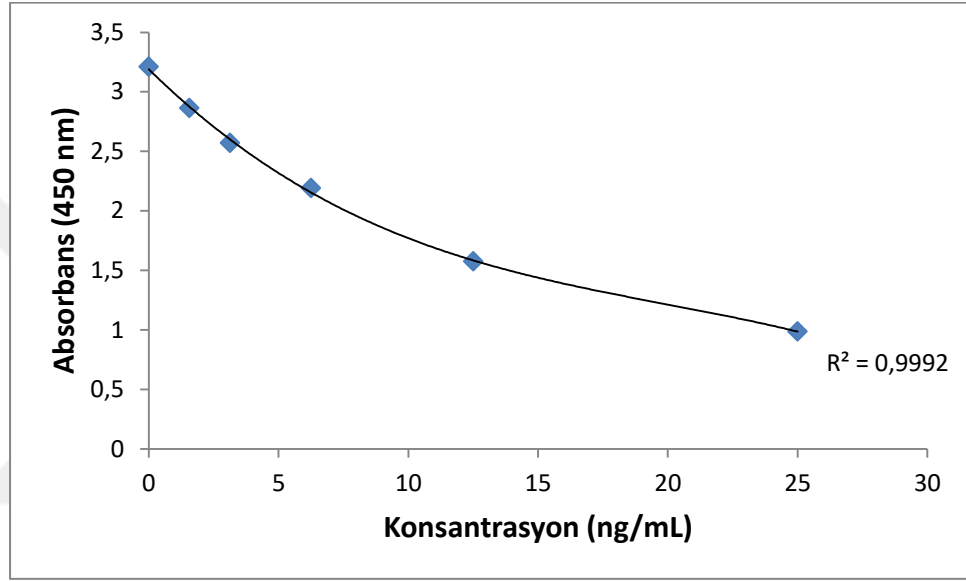
Serum ve doku örneklerindeki SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA kit (Elabscience, Cat No: E-EL-R1424, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbansları mikroyokuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar ng/mL cinsinden verildi.



Şekil 4. SOD Tayininde Kullanılan Standart Grafiği

3.5.4. 8-OHdG Seviyelerinin Belirlenmesi

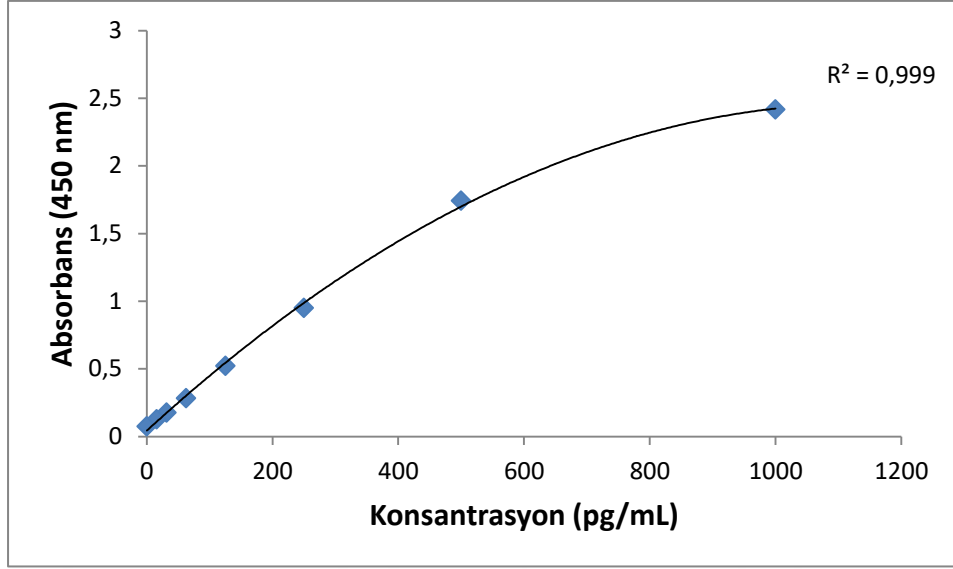
Serum ve doku örneklerindeki 8-OHdG seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA kit (Elabscience, Cat No: E-EL-0028, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbanları mikroyu okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar ng/mL cinsinden verildi.



Şekil 5. 8-OHdG Tayininde Kullanılan Standart Grafiği

3.5.5. CAT Seviyelerinin Belirlenmesi

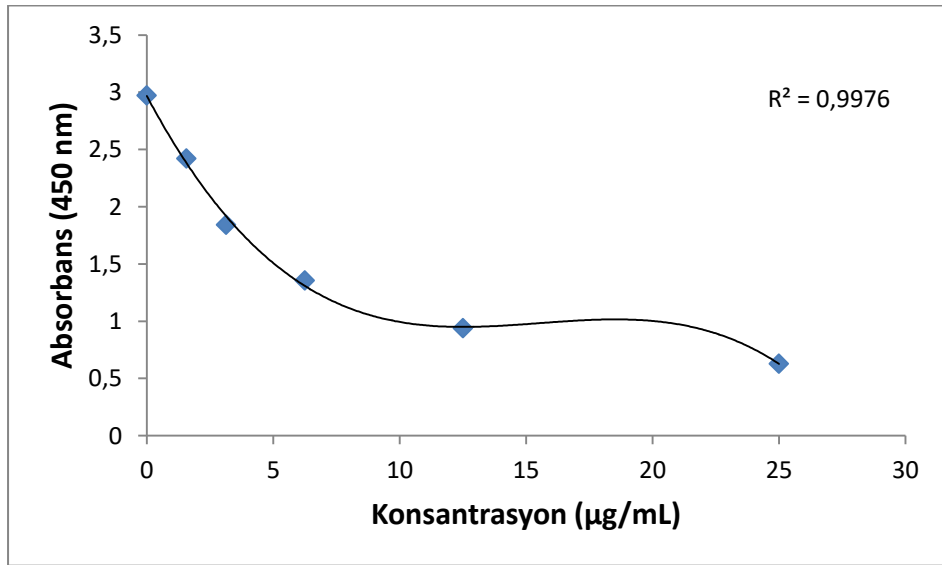
Serum ve doku örneklerindeki CAT seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA kit (Elabscience, Cat No: E-EL-R2456, Shanghai, China) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbanları mikroyu okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar pg/mL cinsinden verildi.



Şekil 6. Katalaz Tayininde Kullanılan Standart Grafiği

3.5.6. GSH Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum ve doku örneklerindeki GSH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda iki antikorlu sandviç ELİSA kit (Elabscience, Cat No: E-EL-0026, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Örneklerin absorbansları mikroyokuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar µg/mL cinsinden verildi.



Şekil 7. Glutasyon Tayininde Kullanılan Standart Grafiği

3.5.7. TOS Belirlenmesi

Serum ve doku örneklerindeki TOS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Turkey) kullanılarak belirlendi. Total oksidan durum tayini; farklı oksidan türlerinin Fe^{+2} , nin Fe^{+3} 'e yükseltgemesine, oluşan Fe^{+3} 'ün kromojen ile renkli bir kompleks oluşturmasına ve oluşan bu kompleksin spektrofotometrik olarak 530 nm'de ölçümüne dayanmaktadır. Elde edilen veriler standart ile oranlanarak numunedeki total oksidan kapasite $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L biriminden bulundu.

3.5.8. TAS Belirlenmesi

Serum ve doku örneklerindeki TAS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Turkey) kullanılarak belirlendi. Total antioksidan durum tayini; serumda bulunan antioksidanların koyu yeşil-mavi renkli ABTS reaktifini renksiz hale indirgemesi esasına dayanır. Absorbanstaki değişim 660 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir ve elde edilen veriler standart ile oranlanarak, numunedeki total antioksidan kapasite mmol trolox equivalent/L biriminden bulunur.

3.5.9. OSI Hesaplanması

Serum ve doku örneklerindeki OSI seviyeleri;

$$\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox equivalent/L}) \times 100]$$

formülü kullanılarak hesaplandı (211).

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Her bir

gruba ait biyokimyasal ve diğer sayısal veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni d¼zeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı. T¼m karşılaştırmalarda $p < 0.008$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Morfometrik Bulgular

Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümenine germinal hücre dökülen tübül sayısına ait yapılan ölçüm sonuçları Tablo 8 'de verilmiştir. Elde edilen istatistiksel verilere göre germinal epitel kalınlığı VPA Grubunda Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak azaldı. VPA+FA ve VPA+Propolis Grubunda ise VPA Grubuna göre anlamlı olarak arttı. Seminifer tübül çapında gruplar arasında istatistiksel anlamda bir fark mevcut değildi. Lümenine Germinal Hücre Dökülen Tübül Sayısı yüzdesi VPA, VPA+FA ve VPA+Propolis Gruplarında Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak yükselirken, VPA+FA ve VPA+Propolis Gruplarında VPA Grubuna göre anlamlı bir azalış tespit edildi. Her iki tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu.

Tablo 8. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

	Kontrol mean± SD	VPA mean± SD	VPA+FA mean± SD	VPA+Propolis mean± SD
Seminifer Tübül Çapı (µm)	125,77±4,98	125,60±5,45	124,85±7,50	133,12±5,94
Germinal Epitel Kalınlığı (µm)	46,86±2,47	39,64±2,06 ^a	45,56±2,36 ^b	49,97±2,44 ^b
Lümenine Germinal Hücre Dökülen Tübül Sayısı (%)	8,62±1,10	48,67±5,64 ^c	31,16±3,67 ^{cd}	22,88±8,59 ^c

^a: Kontrol Grubuna göre VPA Grubunda epitel kalınlığı anlamlı olarak azaldı (p<0,008).

^b: VPA Grubuna göre VPA+FA ve VPA+Propolis Grubunda epitel kalınlığı anlamlı olarak arttı (p<0,008).

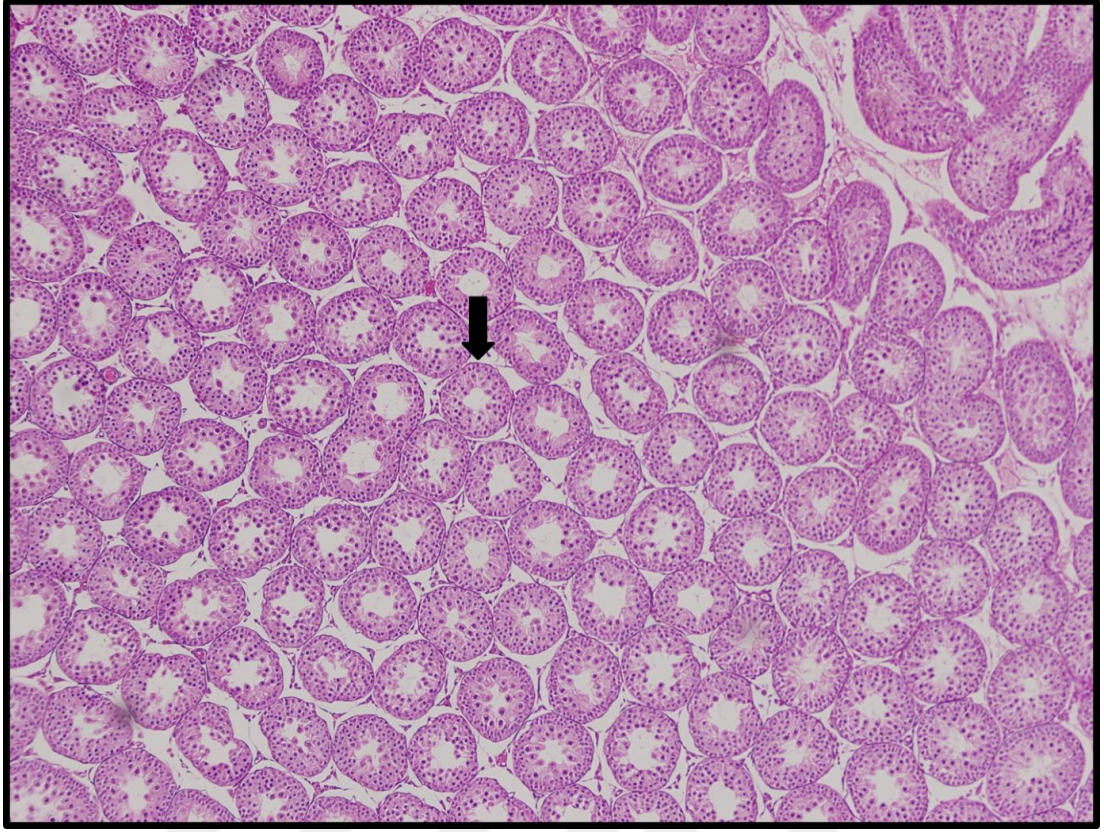
^c: Kontrol Grubuna göre VPA, VPA+FA, VPA+Propolis Grubunda lümenine germinal hücre dökülen tübül sayısı oranı anlamlı olarak arttı (p<0,008).

^d: VPA Grubuna göre VPA+FA ve VPA+Propolis Grubunda lümenine germinal hücre dökülen tübül sayısı oranı anlamlı olarak azaldı (p<0,008).

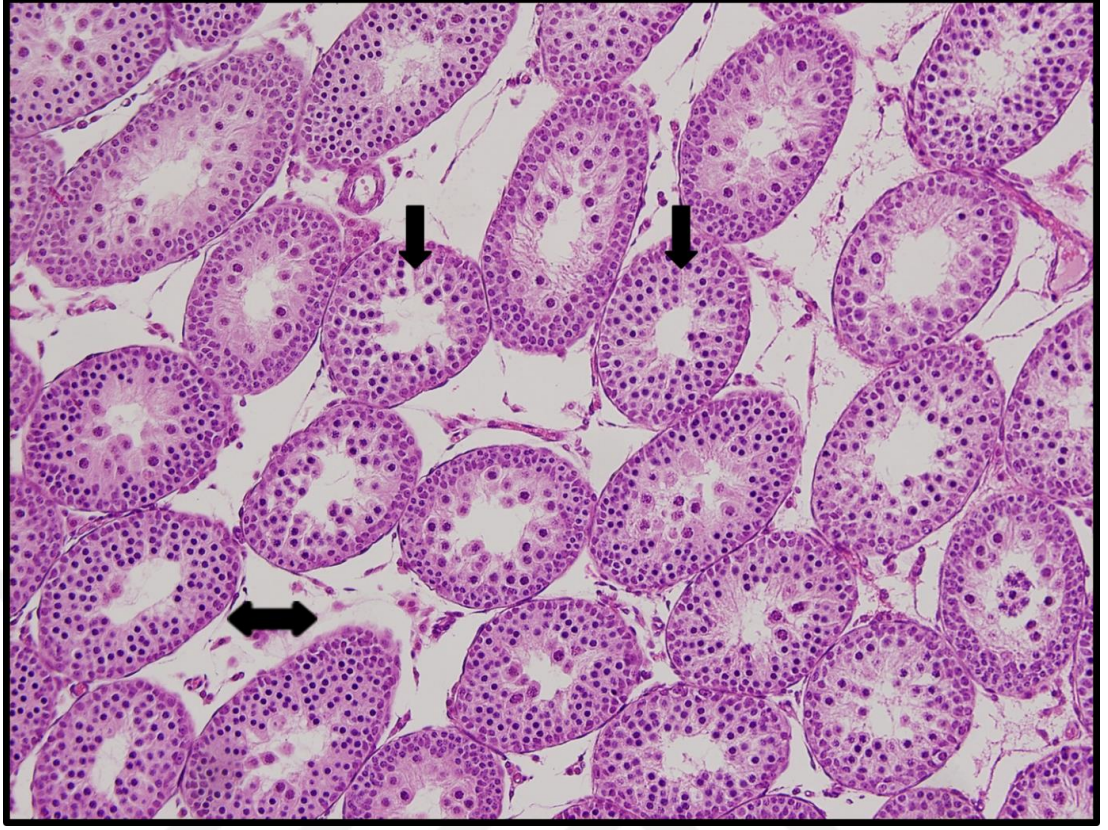
4.2. Morfolojik Bulgular

4.2.1. Hematoksilen Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

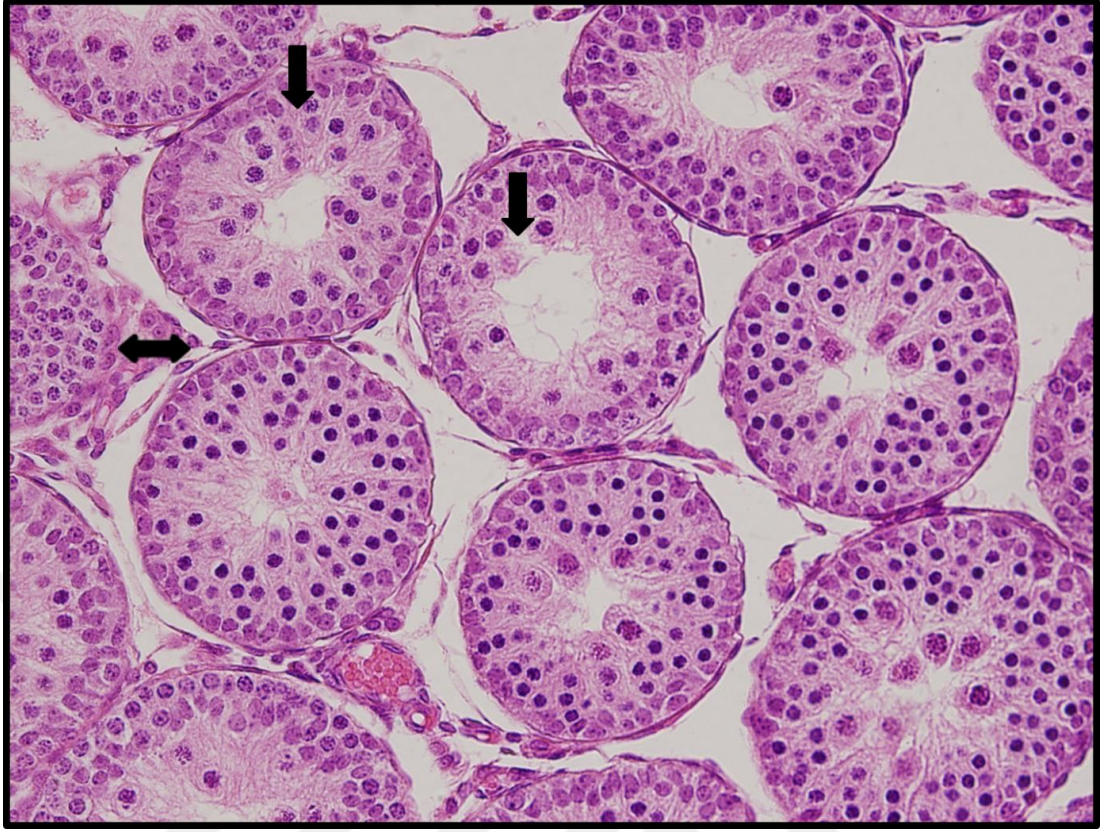
Testis dokusunun histolojik incelemesinde; Kontrol Grubuna ait testis kesitlerinde, seminifer tübüller, spermatogenik seriye ait hücreler ve interstisyel dokuda Leydig hücreleri normal yapıda izlendi ve herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. VPA Grubuna ait testis kesitlerinde ise interstisyel alanda yoğun ödemle beraber lümenine germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tubul sayısında artış, germinal epitelde yer yer vakuolizasyon ve germinal epitel kalınlığında azalma izlendi. VPA+FA Grubuna ait testis dokusunda, interstisyel alanda ödem, lümeninde germinal epitel hücreleri içeren tubüller, nadir alanlar da bozulmuş seminifer tubül yapısı ve germinal epitelin bazal membrandan ayrılması gibi bulgular gözlemlendi. Lümenine germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tubül sayısı, germinal epitelde vakuolizasyon ve germinal epitel kalınlığı gibi histopatolojik bulgular daha farkedilir şekilde azalırken interstisyel alandaki ödem bir miktar azalma gösterdi. VPA+Propolis Grubunda da interstisyel alanda ödem, lümenine germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tübüller ve germinal epitelin bazal membrandan ayrılması gibi bulgular gözlemlendi. Ancak VPA Grubu ile kıyaslandığında, interstisyel alandaki ödem miktarında çok daha belirgin olmak üzere yukarıda belirtilen histopatolojik bulgularda gerileme belirlendi.



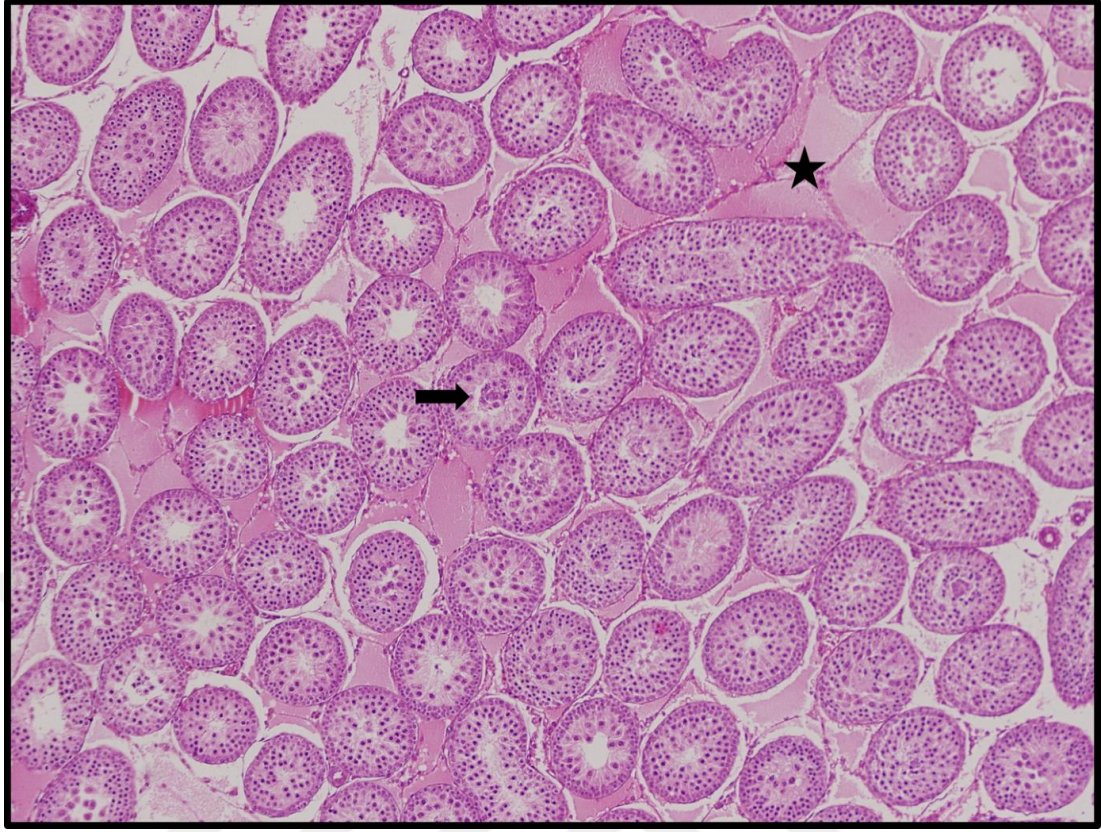
Resim 3. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ve Aralarındaki İnterstisyel Bağ Doku Normal Olarak İzlenmektedir (H&E, X100).



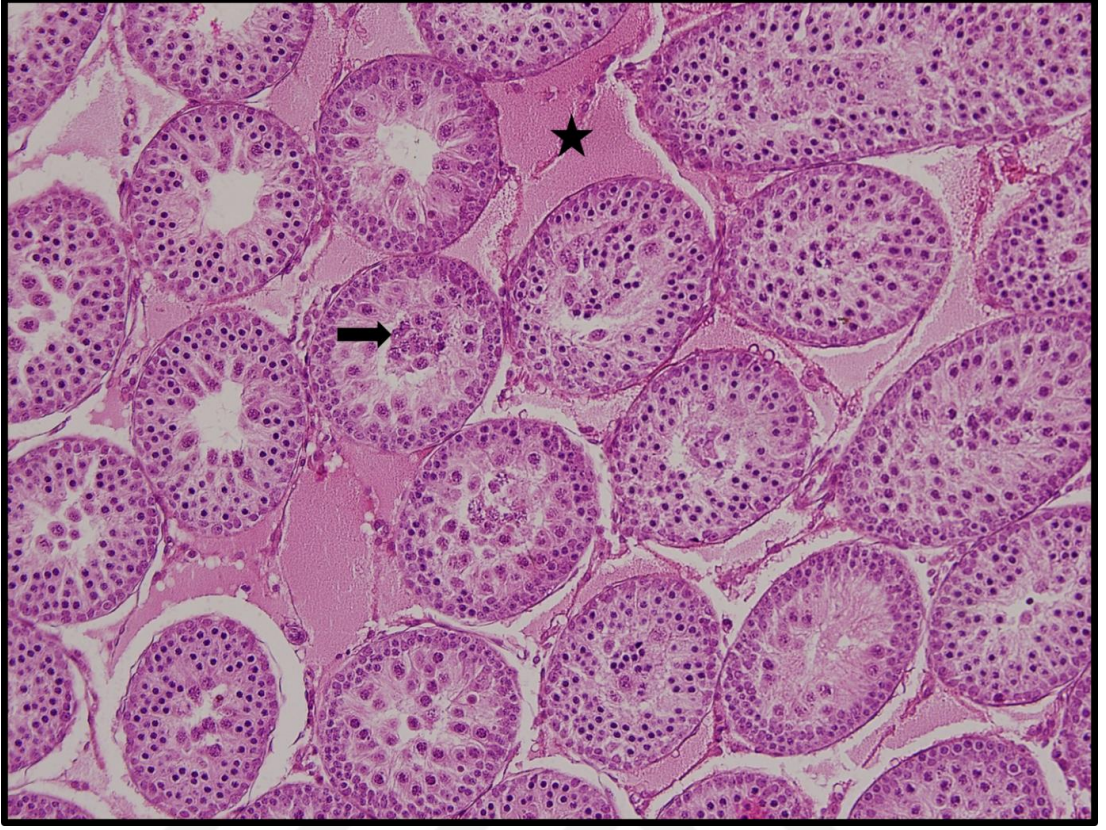
Resim 4. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ve Aralarındaki İnterstitial Bağ Doku (↔) Normal Olarak İzlenmektedir (H&E, X200).



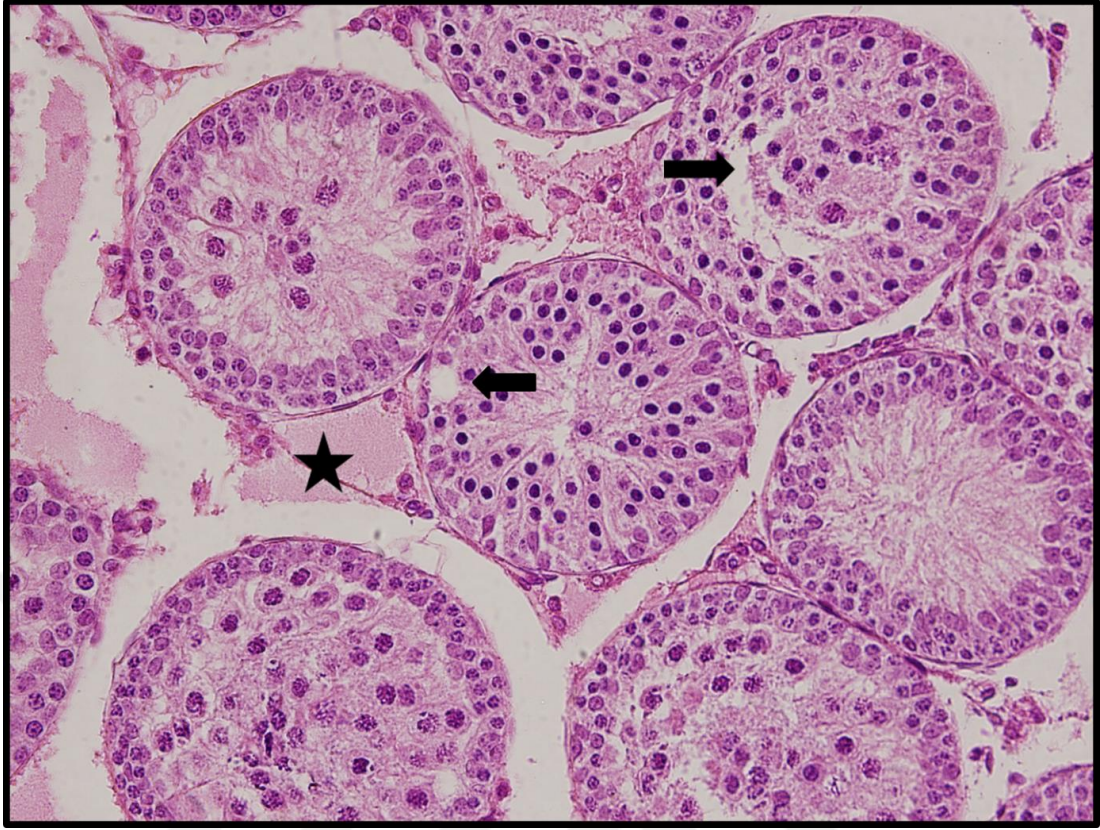
Resim 5. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer tübüller (↓) ve Aralarındaki İnterstisyel Bağ Doku (↔) Normal Olarak İzlenmektedir (H&E, X400).



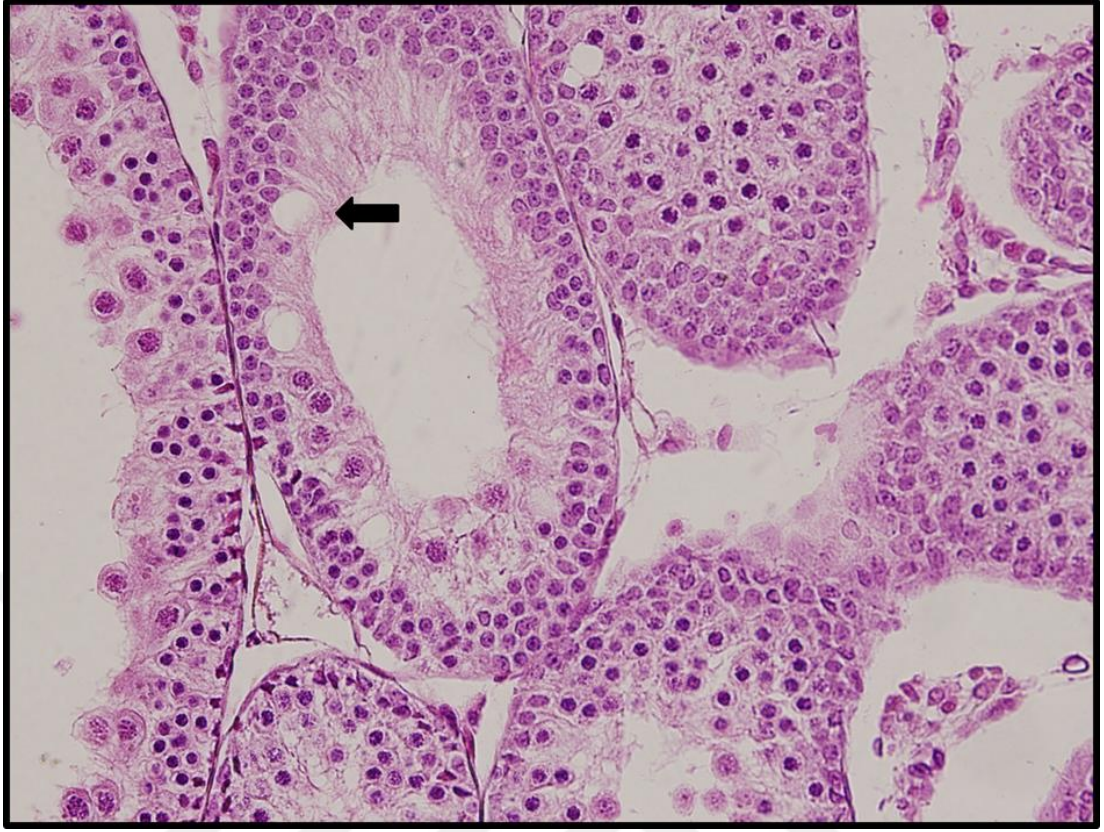
Resim 6. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X100).



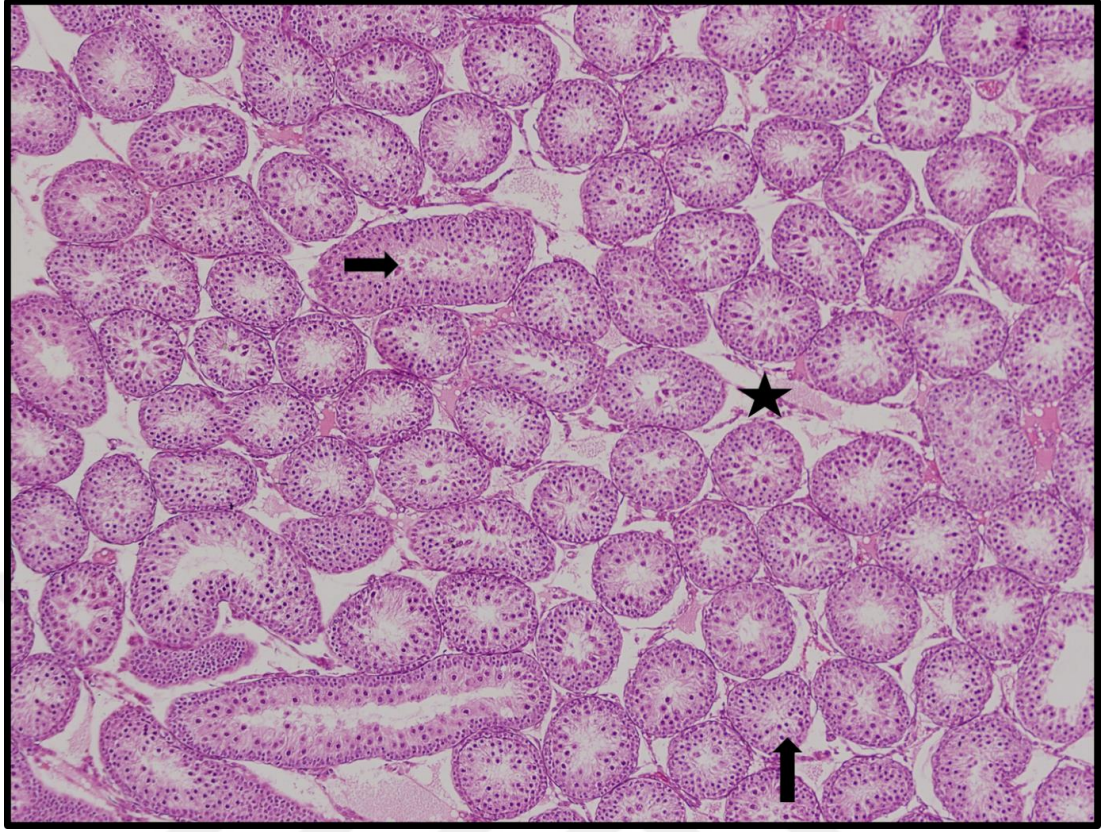
Resim 7. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X200).



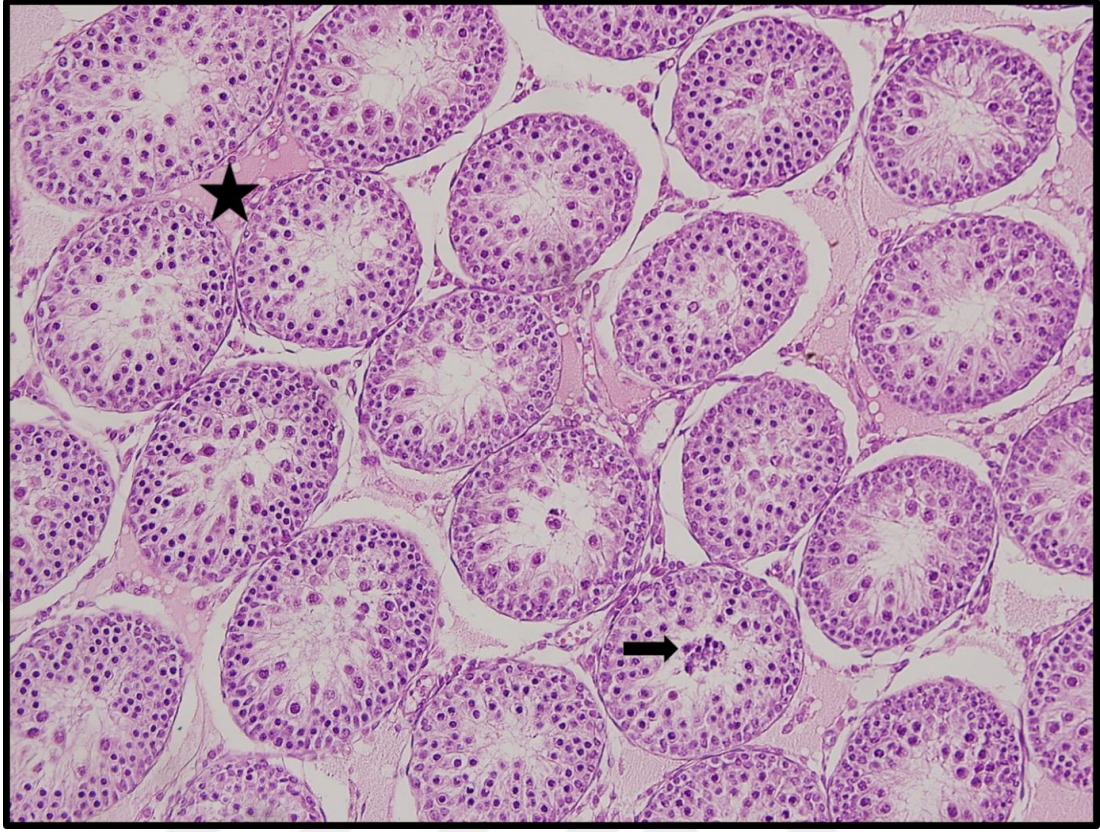
Resim 8. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) ve Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (H&E, X400).



Resim 9. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Vakuolizasyon (←) izlenmektedir (H&E, X400).



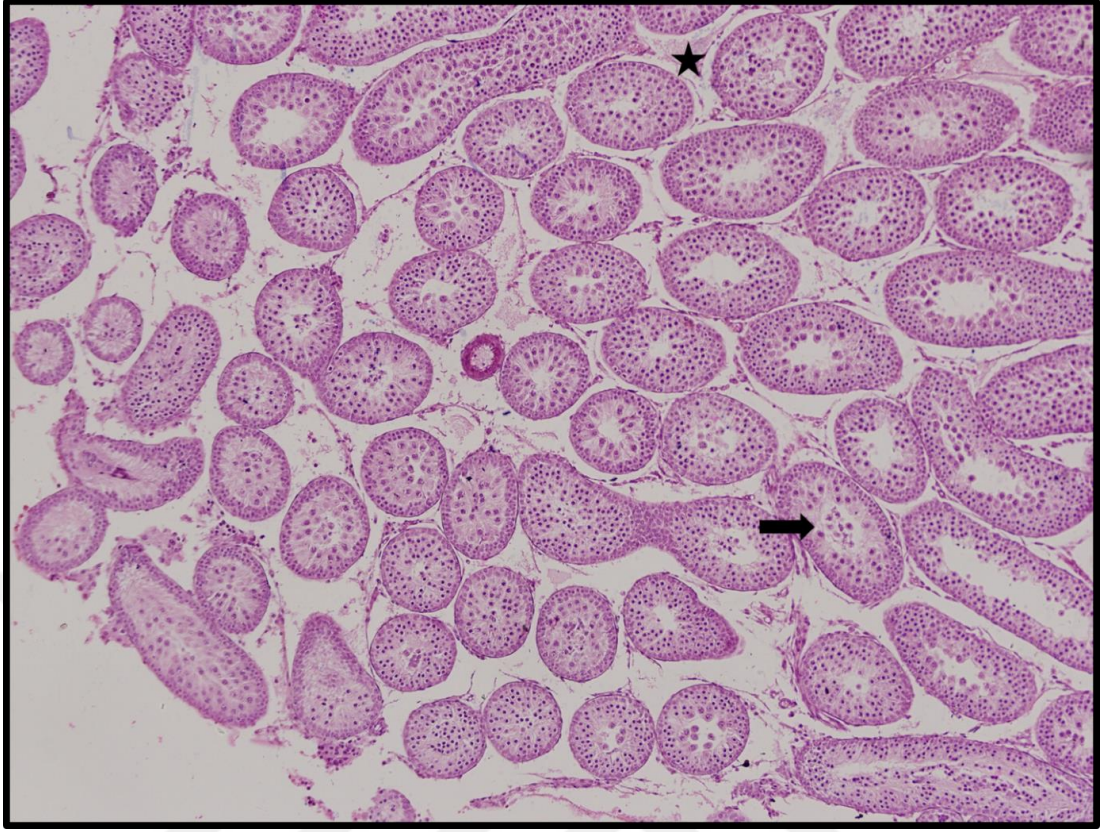
Resim 10. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) ve Seminifer Tübül Yapısında Düzensizlik (↑) İzlenmektedir (H&E, X100).



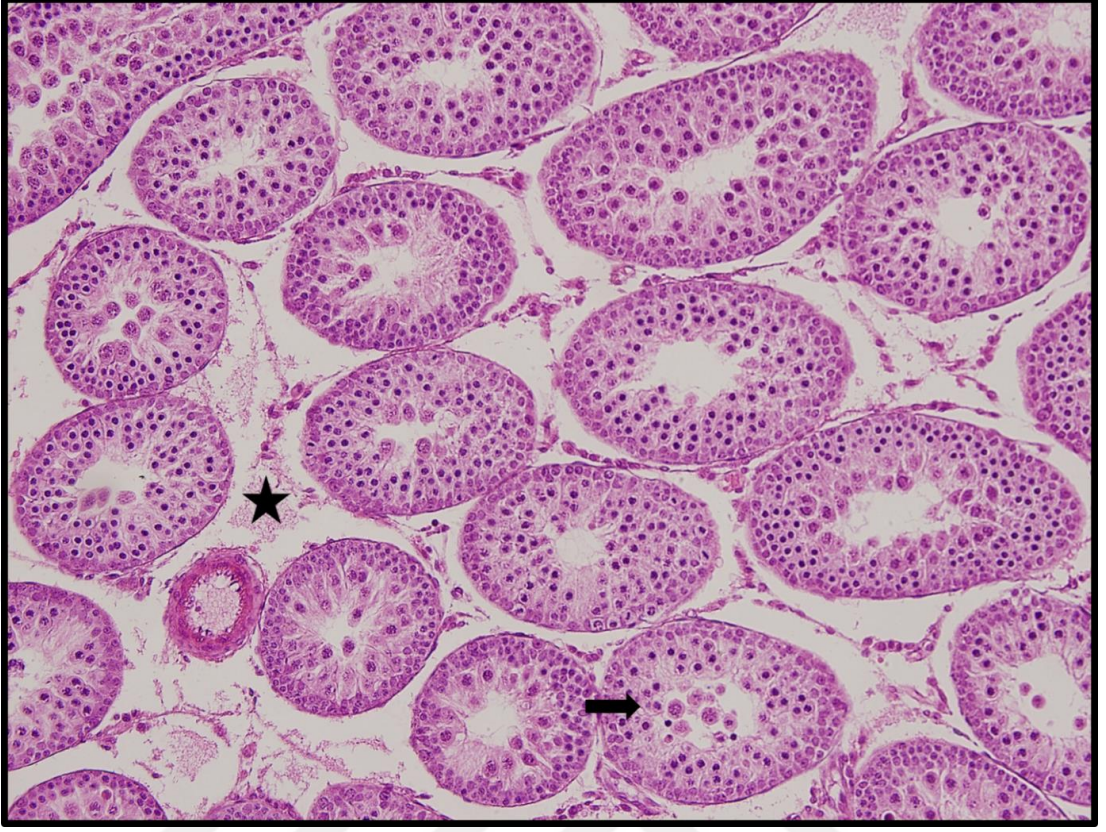
Resim 11. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X200).



Resim 12. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. İntersitisel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X400).



Resim 13. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X100).



Resim 14. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İntersitisyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (H&E, X200).



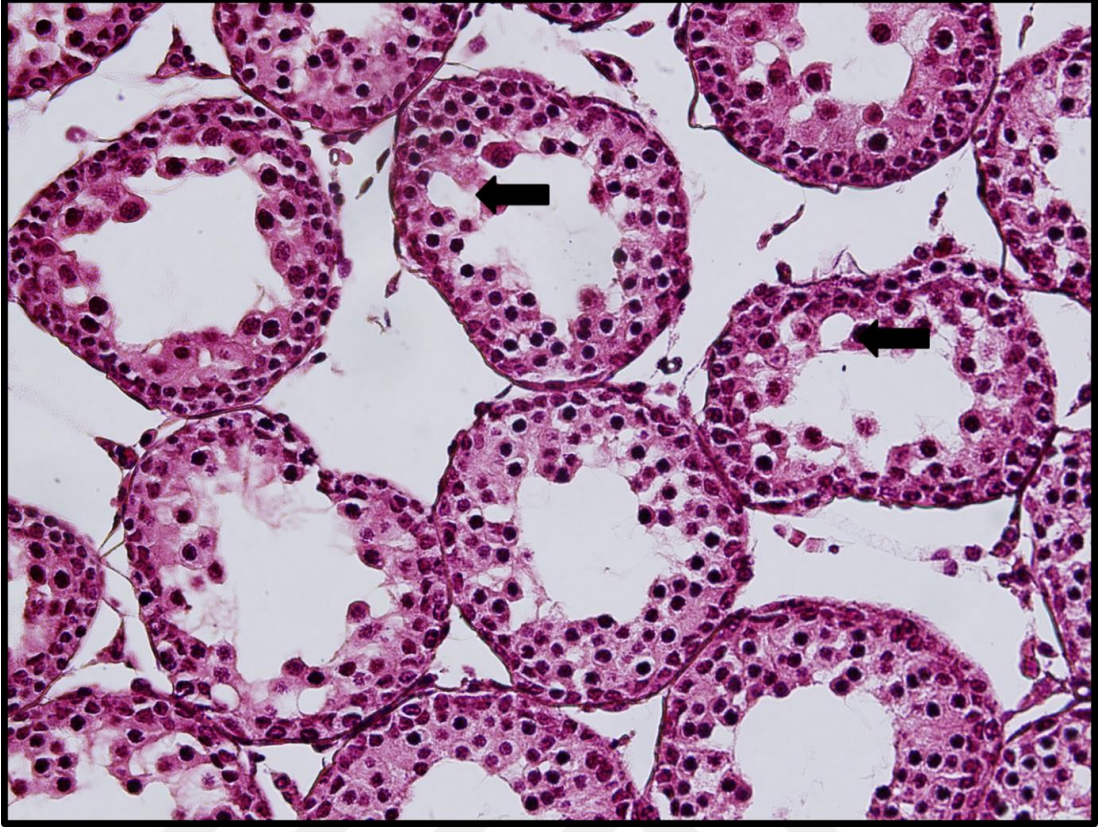
Resim 15. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümenine Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→), Germinal Epitelin Bazal Membrandan Ayrılması (▲) İzlenmektedir (H&E, X400).

4.2.2. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

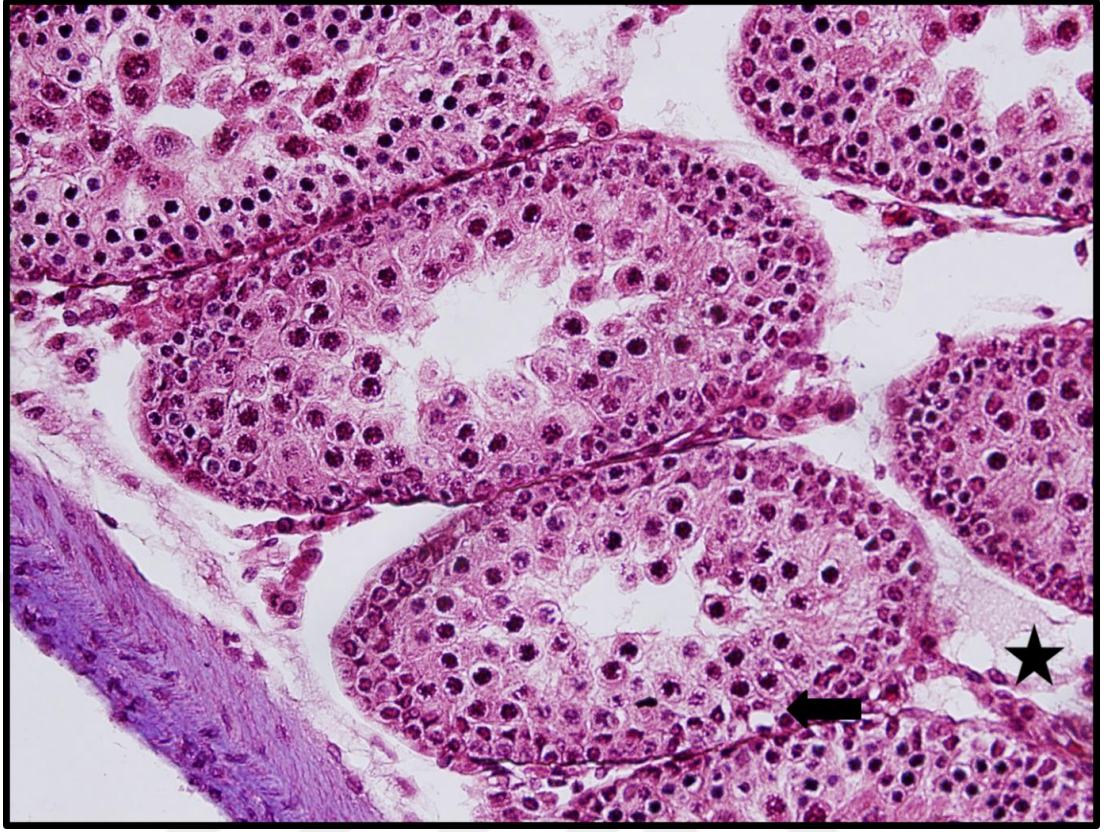
Testis dokusunun Masson Trikrom ile yapılan histolojik incelemesinde; Kontrol Grubuna ait testis kesitlerinde, normal yapıda seminifer tübüller, interstisyel dokuda Leydig hücreleri ve spermatogenik seriye ait hücreler izlendi. VPA Grubuna ait testis kesitlerinde ise seminifer tübül yapılarında düzensizlik, tübül epitelinde vakuolizasyon, lümenine germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tübül sayısında artış gibi patolojik bulgular saptandı. VPA+FA Grubuna ait testis dokusunda, interstisyel alanda ödem ve vakuolizasyon gibi bulgular, VPA Grubuna göre azalmakla birlikte yer yer görülmekteydi. VPA+Propolis Grubunda da bazı alanlarda, lümenine germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tübüller görülmekle birlikte VPA Grubuyla kıyasladığımızda bulgularda belirgin düzelme olduğunu tespit ettik.



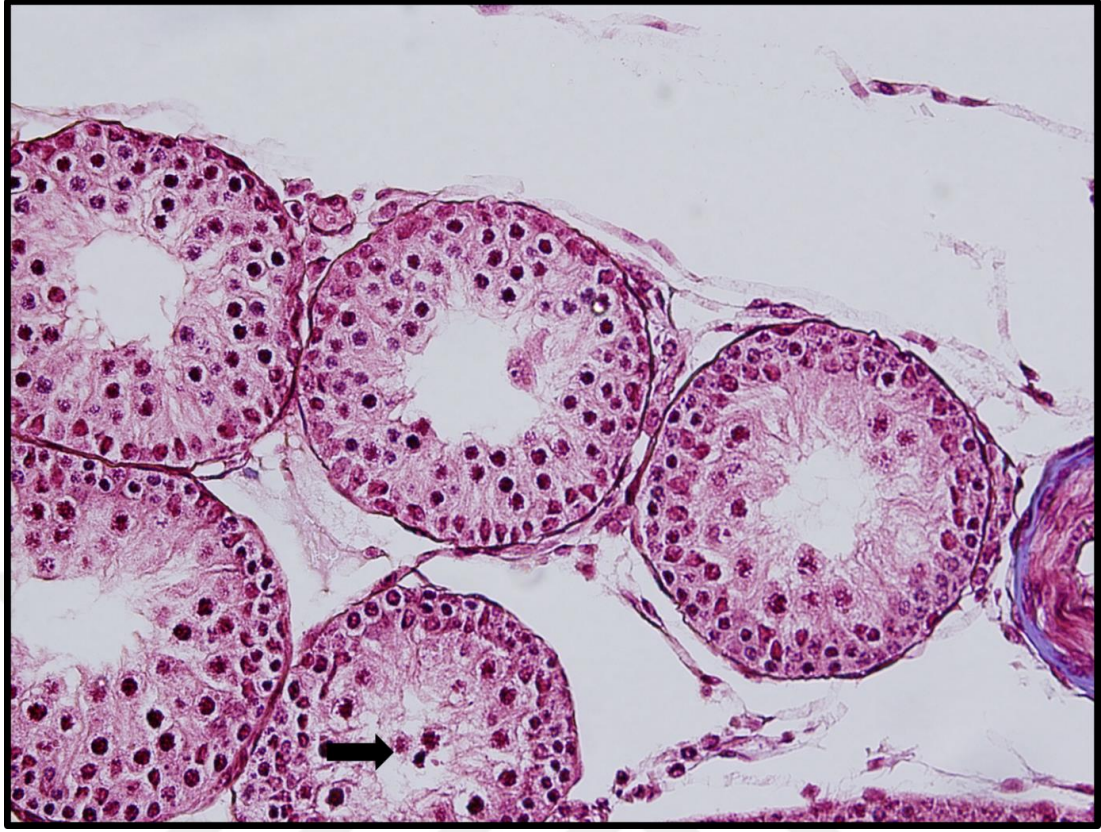
Resim 16. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ile Aralarındaki İnterstisyel Bağ Dokusu (↔) İzlenmektedir (Masson Trikrom, X400)



Resim 17. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Vakuolizasyon (←), Seminifer Tübül Yapılarında Düzensizlik Gözlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



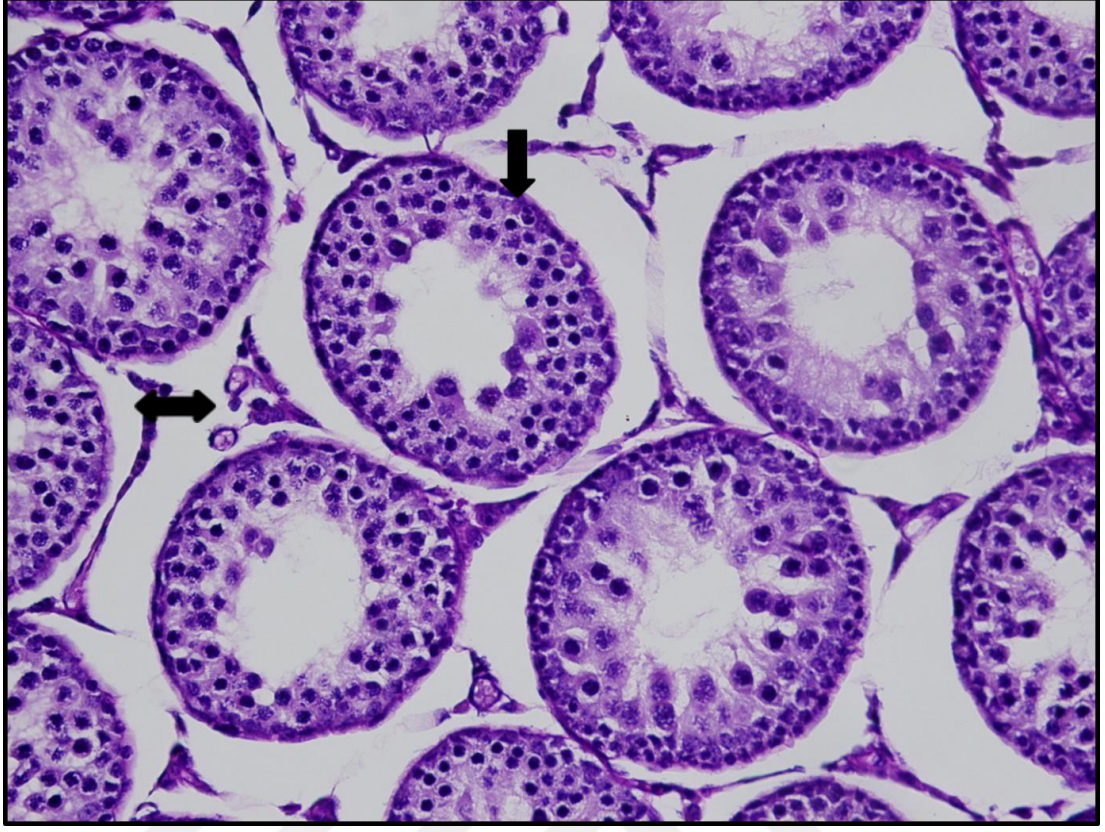
Resim 18. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. İntersitsiyel Alanda Ödem (★) ve Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



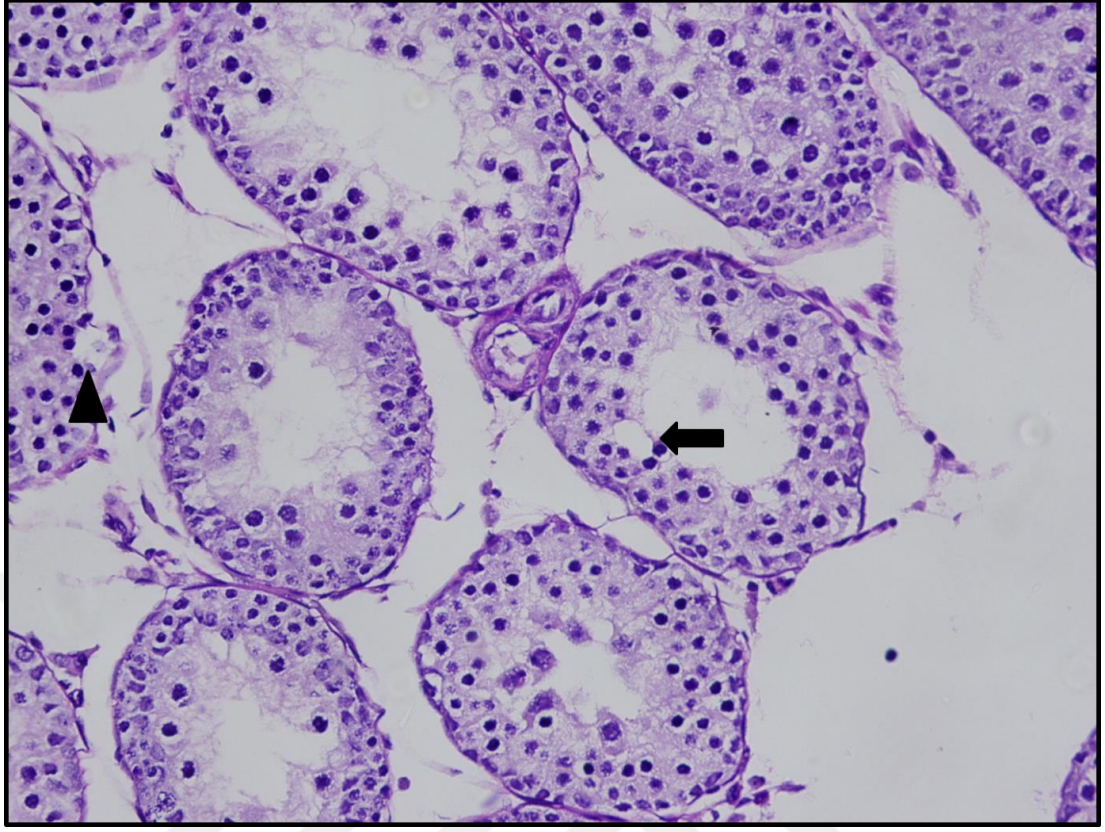
Resim 19. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümen Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İzlenmektedir (Masson Trikrom, X400).

4.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

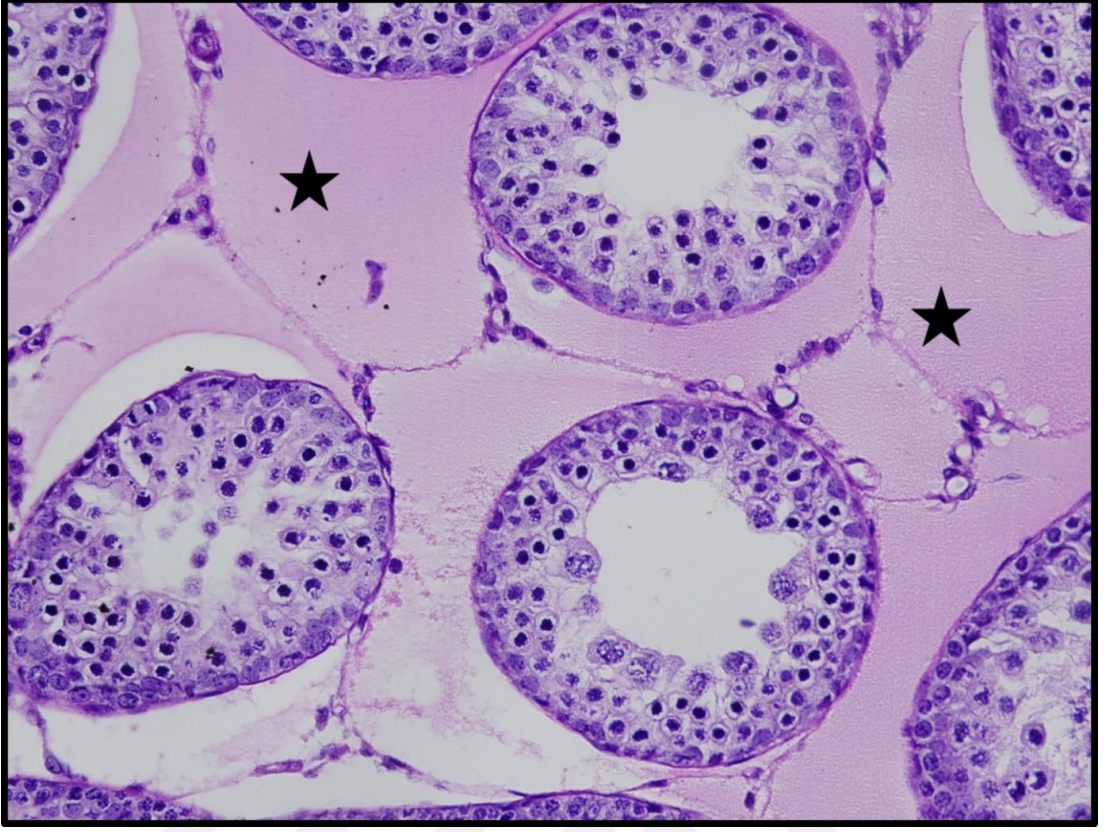
Testis dokusunun PAS ile yapılan histolojik incelemesinde; Kontrol Grubuna ait testis kesitlerinde, seminifer tübüller, interstisyel dokuda Leydig hücreleri ve spermatogenik seriye ait hücreler normal yapıda izlendi. VPA Grubuna ait testis kesitlerinde ise bazal membran yapılarında düzensizlik, tübül epitelinde vakuolizasyon, interstisyel alanda yoğun ödem ve lümeninde germinal epitel hücreleri içeren tübül sayısında artış gibi patolojik bulgular saptandı. VPA+FA Grubuna ait testis dokusunda, bazal membranda düzensizlik ve vakuolizasyon gibi bulgular VPA Grubuna göre azalmakla birlikte yer yer görülmekteydi. VPA+Propolis Grubunda da yer yer bazal membran yapısında düzensizlikler saptanmakla birlikte diğer bulgularda belirgin düzelme mevcuttu.



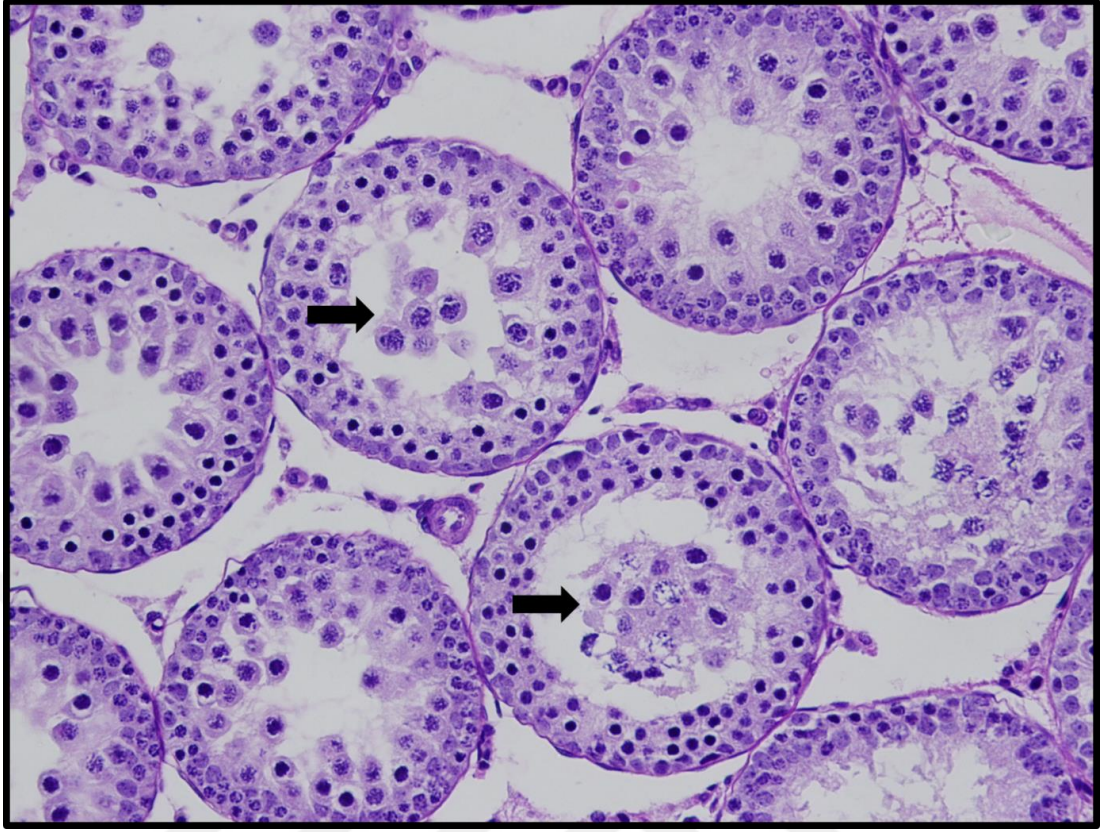
Resim 20. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Tübüller (↓) ile Aralarındaki İnterstisyel Bağ Dokusu (↔) İzlenmektedir (PAS, X400).



Resim 21. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Seminifer Epitelde Vakuolizasyon (←), Bazal Membranlarda Düzensizlik (▲) İzlenmektedir (PAS, X400).



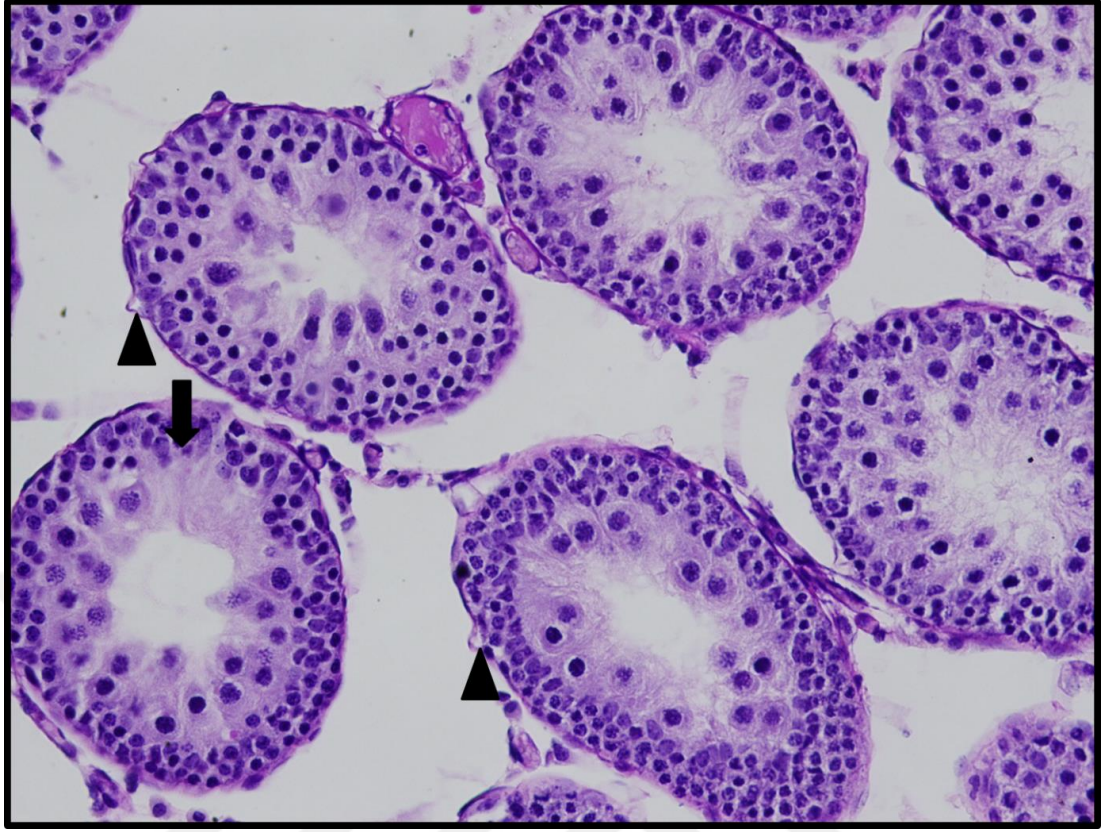
Resim 22. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. İntersitsiyel Alanda Ödem (★) İzlenmektedir (PAS, X400).



Resim 23. VPA Grubuna Ait Testis Dokusu. Lümeneye Dökülmüş İmmatür Germinal Hücreler (→) İzlenmektedir (PAS, X400).



Resim 24. VPA+FA Grubuna Ait Testis Dokusu. Normal Seminifer Tubül Yapısı (↓), Bazal Membranlarda Düzensizlik (▲) ve Vakuolizasyon (←) İzlenmektedir (PAS, X400).



Resim 25. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusu. Normal Seminifer Tubül Yapısı (↓) ve Bazal Memranlarda Düzensizlik (▲) İzlenmektedir (PAS, X400).

4.3. Apoptotik İndeks

Deney Gruplarına ait testis dokularında TUNEL tekniği ile değerlendirilen AI (apoptotik indeks) aşağıdaki tablo ve resimlerde verildi. Apoptotik indeks değerlendirmesine göre; AI'in VPA Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. VPA+FA ve VPA+Propolis Grupların da AI, VPA Grubuna göre azalmıştı; ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. AI, VPA+FA ve VPA+Propolis Gruplarında kontrol Grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

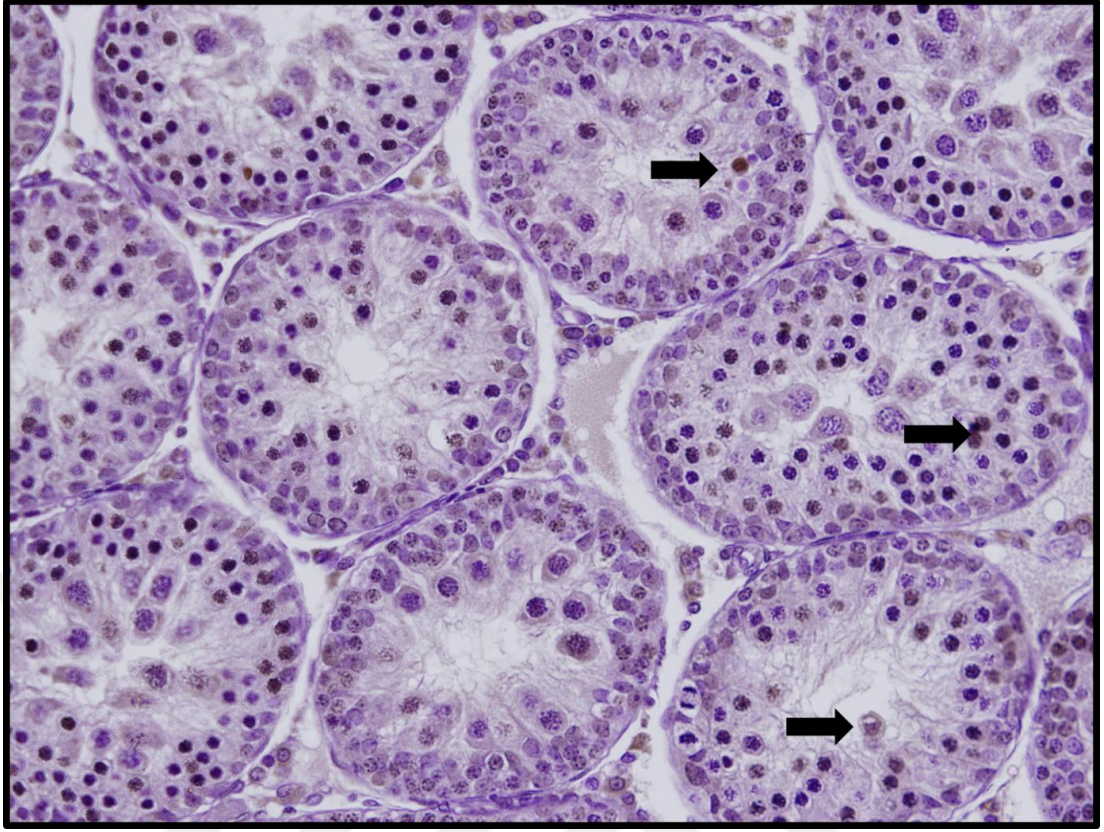
Tablo 9. Deney Gruplarına Ait AI Değerlendirmesi

	Kontrol mean± SD	VPA mean± SD	VPA+FA mean± SD	VPA+Propolis mean± SD
Apoptotik İndeks (%)	12,59±2,47	75,78±22,67 ^a	57,60±3,24 ^a	55,34±6,50 ^a

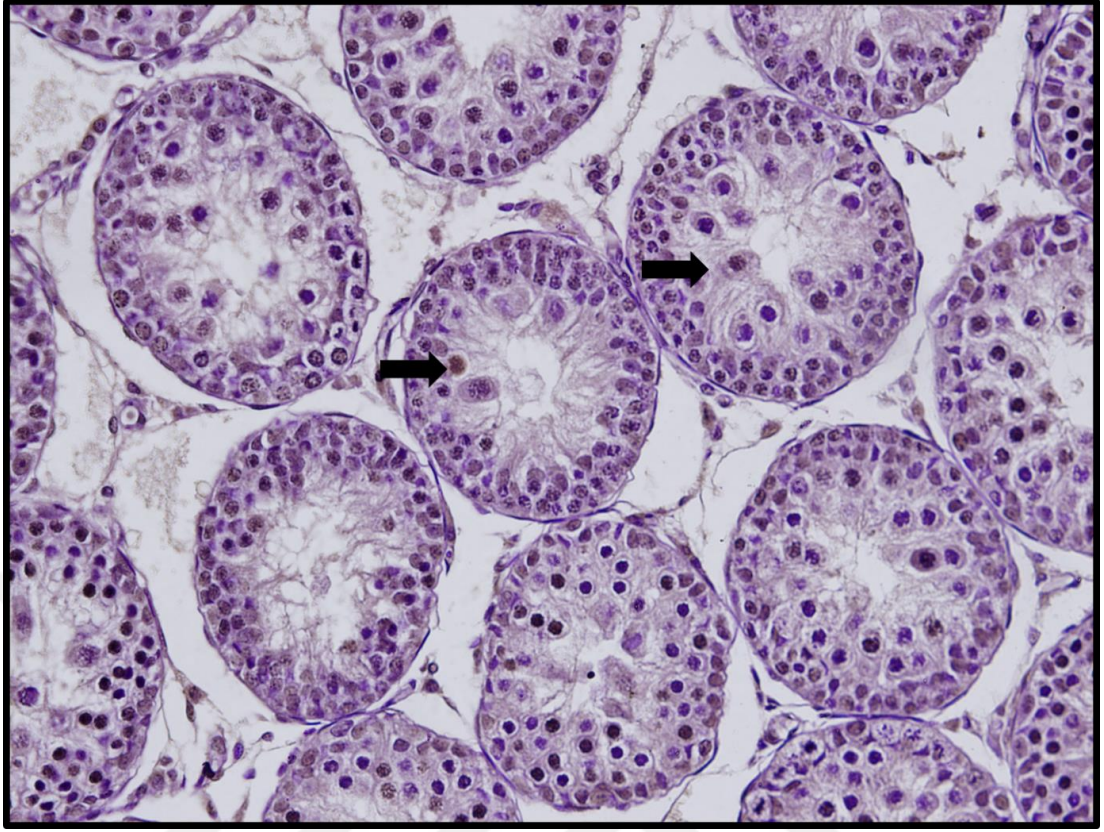
^a: Kontrol Grubuna göre apoptotik indeks anlamlı olarak arttı (p<0,008).



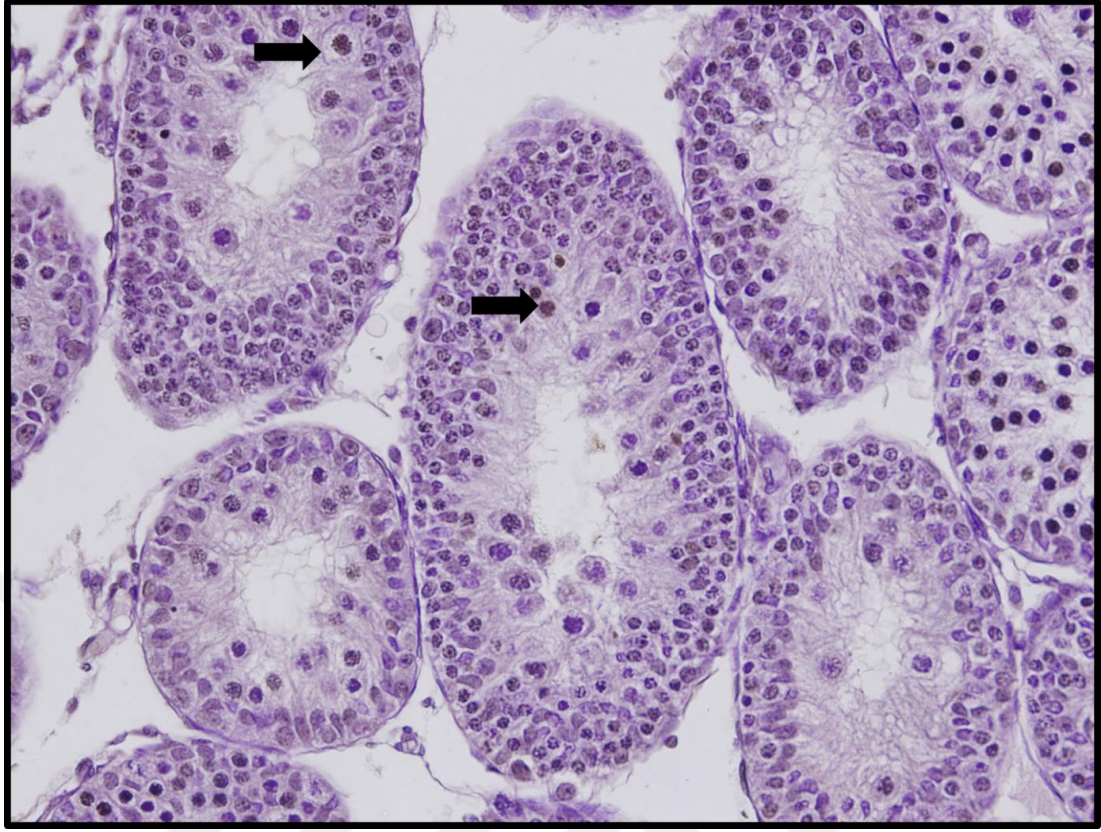
Resim 26. Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (→ (TUNEL X400)).



Resim 27. VPA Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (➡) (TUNEL X400).



Resim 28. VPA + FA Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (→) (TUNEL X400).



Resim 29. VPA+Propolis Grubuna Ait Testis Dokusunda Gözlenen TUNEL (+) Hücreler (→) (TUNEL X400).

4.4. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

4.4.1. Doku Biyokimyası

Çalışmamızdaki deney gruplarından alınan doku örneklerinden doku SOD, doku OHDG, doku CAT, doku GSH, doku TOS, doku TAS, doku OSI ve doku MDA sonuçlarına ilişkin bilgiler Tablo 10'da verilmiştir.

Doku CAT değeri VPA+FA Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttı ($p<0,008$). Doku GSH değeri VPA+FA Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldı ($p<0,008$). Doku TOS değeri VPA+FA ve VPA+Propolis Gruplarında Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p<0,008$). Doku OSI değeri VPA, VPA+FA ve VPA+Propolis Gruplarında, Kontrol Grubuna göre anlamlı oranda arttı ($p<0,008$). Gruplar doku MDA değerleri açısından karşılaştırıldıklarında VPA+FA Grubunda, Kontrol

Grubuna ve VPA Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma tespit edildi ($p<0,008$).

Tablo 10. Doku Biyokimyası Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	Kontrol	VPA	VPA + FA	VPA + PROPOLİS
SOD_doku	0,26±0,038	0,15±0,08	0,25±0,035	0,23±0,10
OHDG_doku	1,46±0,89	1,65±0,78	2,12±0,49	2,55±0,62
CAT_doku	697,61±34,97	760,73±61,67	810,78±35,97 ^a	782,40±96,40
GSH_doku	2,34±0,045	2,30±0,034	2,2870±0,0021 ^b	2,29±0,02
TOS_doku	5,42±0,72	10,50±6,84	11,87±6,19 ^a	10,75±4,35 ^a
TAS_doku	0,90±0,029	0,91±0,021	0,91±0,039	0,87±0,07
OSI_doku	0,5948±0,062	1,1473±0,75 ^a	1,29±0,65 ^a	1,25±0,55 ^a
MDA_doku	649,5±122,57	493,26±68,29	302,48±35,41 ^{bc}	430,46±96,31

^a : Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak arttı

^b : Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak azaldı.

^c : VPA Grubuna göre anlamlı olarak azaldı.

4.4.2. Serum Biyokimyası

Çalışmamızdaki deney gruplarından alınan serum örneklerinden de serum SOD, serum OHDG, serum CAT, serum GSH, serum TOS, serum TAS ve serum OSI sonuçlarına ilişkin bilgiler Tablo 11’de verilmiştir.

Gruplar serum TAS değeri açısından değerlendirildiğinde, VPA+FA Grubunun TAS değeri, Kontrol ve VPA Grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,008$). Diğer biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak herhangi bir artış veya azalış saptanmadı.

Tablo 11. Serum Biyokimyası Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	Kontrol	VPA	VPA + FA	VPA + PROPOLİS
SOD_serum	1,33±0,69	1,75±0,54	1,070±0,54	0,98±0,56
OHDG_serum	15,25±3,41	16,0067±0,74	13,423±0,54	12,99±2,73
CAT_serum	422,31±85,53	428,70±45,83	484,36±78,60	499,15±77,56
GSH_serum	5,01±2,02	4,54±0,88	3,80±1,12	3,59±0,95
TOS_serum	11,40±2,35	10,35±1,42	11,51±2,65	12,54±2,81
TAS_serum	1,44±0,14	1,55±0,18	1,89±0,14 ^a	1,59±0,19
OSI_serum	0,78±0,09	0,66±0,084	0,61±0,14	0,78±0,13

^a : Kontrol ve VPA Grubuna göre anlamlı olarak arttı.

5. TARTIŞMA

VPA hem yetişkinlerde hem de çocuklarda geniş bir antiepileptik aktivite yelpazesine sahip önemli bir antiepileptik ilaçtır (212). Öncelikle karaciğerde metabolize olur ve plasentayı kolayca geçmektedir. Fetusta anneden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. VPA'nın teratojenisitesini bildiren ilk çalışmalar 1980'lerin başında yayınlanmıştır. O zamandan bu yana, VPA'nın fetüsün konjenital malformasyon riski ile ilişkili olduğunu gösteren önemli kanıtlar birikmiştir (100, 213-215).

Ayrıca VPA'nın üreme endokrin fonksiyonu üzerine olası etkileri konusunda artan bir endişe mevcuttur. Bu etkiler testiküler atrofi, spermatogenez de azalma, prostat atrofisi, seminal vezikül ve epididim atrofisini kapsamaktadır (8, 216). Erkeklerde, kronik valproat tedavisinden sonra testiküler atrofi, hem sıçanlarda hem de köpeklerde daha önce gösterilmiştir (217). Buna ek olarak, kronik valproat tedavisinin, farelerde testis büyümesi ve spermatogenez hızını azaltarak pubertal olgunlaşmayı yavaşlattığı da gösterilmiştir (218). Etkilerini erkek üreme sisteminde doza bağımlı bir şekilde gösterdiği düşünülmektedir. Yakın tarihli yapılan bir çalışmada 400 mg/kg gün dozunda VPA uygulanan sıçanlarda testiküler atrofi ve spermatogenez arresti saptanırken, 200 mg/kg gün dozunda yapılan uygulamada herhangi bir patoloji saptanmamıştır (219). Sodyum valproatın, kaspaz-3 aktivitesini arttırarak insan ve fare granülosa hücreleri üzerinde apoptoz teşvik edici etkisi olduğu da gösterilmiştir (8). VPA bu etkilerini gerçekleştirirken hücresel mekanizmaları toksisiteye yol açabilecek farklı şekillerde bozabilir. Testisin yapısını ve fonksiyonunu bozabilen kimyasal mekanizmalar olan serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu indükleyebilir (220). Yapılan çalışmalar VPA ile tedaviyi takiben serbest radikal seviyelerinin artmakta olduğunu göstermektedir. Olası bir VPA biyotransformasyonu ve / veya doğal antioksidanlardaki değişiklikler VPA'ya bağlı komplikasyonlara katkıda bulunabilir (221). Ana antioksidan aktivitesinin tükenmesi, normalde her türlü biyolojik molekülün zarar görmesine yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) yükselmesine izin verir. Lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyon ürünleri oksidatif stresin güvenilir biyolojik belirteçleri olarak gösterilmiştir (222). Bu nedenle, VPA tedavisiyle ilişkili testiküler yaralanma,

serbest radikallerin aşırı üretilmesi ve dolayısıyla oksidatif stresin en azından kısmen açıklanmasına neden olabilir. Günümüzde, prooksidanın indüklediği oksidatif hasarın çeşitli diyet antioksidanlarının kullanımı ile etkili bir şekilde zayıflatılabileceği kabul edilmektedir (223).

Oksidatif stres, vurgulanan dokunun antioksidan kapasitesini aşan oksijen radikallerin üretiminden kaynaklanmaktadır. Erkek infertilitesi ile ilişkili birçok durum veya olay, oksidatif stresin indükleyicisidir. Örneğin, X ışınlanması veya çevresel toksik maddelere maruz kalma, varikozel ve kriptorşidizm gibi fiziksel koşulların testiküler oksidatif stresi arttırdığı ve germ hücresi apoptozunda ve daha sonra ortaya çıkan hipospermatogenezde artışa neden olduğu gösterildi. Bu stres koşulları, testiküler mikrovasküler kan akışının, endokrin sinyalizasyonun ve germ hücresi apoptozunun dinamiklerinde değişikliğe neden olabilir. Testiküler oksidatif stres, erkek infertilitesinin temelini oluşturan şeylerin çoğunda ortak bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumun, ilgili hipospermatogenez vakalarında antioksidan tedavilerin geliştirilmesinde yararlarının olabileceği düşünülmektedir (224).

FA, kırmızı kan hücrelerinin üretimi ve DNA sentezi için, erkeklerde ve kadınlarda normal doğurganlık için gereklidir. Bebeklik ve gebelik gibi hücre bölünmesi ve büyüme dönemlerinde önemlidir. Erkeklerde ayrıca spermatogenez için gereklidir. Yapılan çalışmalarda FA'in serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine karşı etkili olduğu bildirilmiştir (108, 225).

Hamilelik sırasında antikonvulsan ilaçlar kandaki FA konsantrasyonunu azaltır. İlaçların inaktivasyon oranında azalmaya neden olabilecek şekilde FA seviyesindeki düşüş, antikonvulsanların kan konsantrasyonlarının yükselmesine neden olur ve bu durum ilacın toksisitesini artırır. Bu yüzden teratojenik etkiler FA'in birlikte kullanımı ile azaltılabilir. Diğer taraftan serumdaki yüksek FA konsantrasyonu ilacın hızlı inaktivasyonuna neden olur (123).

Propolis, bal arısı tarafından toplanan ve kullanılan yapışkan bir maddedir. Onlarca yıldır geleneksel tıpta kullanılmıştır. Polifenoller, terpenoidler, steroidler ve amino asitler de dahil olmak üzere 300'den fazla farmakolojik olarak aktif bileşik ihtiva eder. Antioksidan, antikanser, anti-inflamatuvar, immünregülatör, antibakteriyel ve bakteriyostatik aktivitelere sahiptir. Aynı zamanda, farklı dışsal

toksik uyarılara karşı güçlü, sitoprotektif etki gösterir (226, 227). Propolisin antioksidan aktivitesi esas olarak flavonoid içeriklidir. Serbest radikalleri süpürebilir ve dolayısıyla lipid peroksidasyonuna karşı koruma yeteneğine sahiptir (228).

FA ve Propolisin sayılan bu özelliklerinin ve antioksidan kapasitelerinin, intrauterin dönemde uygulanan VPA'nın yavru sıçan testislerindeki toksik etkiler üzerinde de koruyucu ya da önleyici etkileri olabilir.

Khan ve arkadaşları VPA'nın erkek fareler üzerindeki germ hücre hasarı, oksidatif stres ve genotoksisitesini inceledikleri çalışmalarında; 100, 200, 400 ve 500 mg/kg/gün şeklinde farklı dozlar kullanarak, VPA'nın testis üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Testis dokusu üzerinde 200, 400 ve 500 mg/kg/gün dozlarda H&E ile yaptıkları incelemede seminifer tübüllerde düzensizlik, seminifer tübül yapılarındaki germ hücrelerinde dejenerasyon ve tübül lümenlerinde açılma, vakuolizasyon ve seminifer tübül çapında azalma saptamışlardır (9). Bizde kendi çalışmamızda sıçanlar üzerinde 300 mg/kg/gün VPA uyguladığımızda seminifer epitel yapılarında düzensizlik, vakuolizasyon saptadık. Seminifer tübül çapında istatistiksel olmayan, epitel kalınlığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gördük. Bu azalışın Khan ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi seminifer tübül içerisindeki germ hücrelerinin dejenerasyonundan kaynaklandığını düşünüyoruz. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, Khan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Girish ve arkadaşları 400 mg/kg/gün VPA'nın üreme toksisitesi üzerine ellagic asidin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi, germ hücrelerinde dejenerasyon, ödem ve konjesyon gözlemişlerdir (229). Bizim de çalışmamızda seminifer tübüllerde vakuoler dejenerasyon, lümeninde germ hücrelerinin görüldüğü tübül sayısında artma, epitel kalınlığında azalma ve ödem bulgularına rastlandı. Bu açıdan bulgularımız Girish ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla uyumludur.

Cansu ve arkadaşlarının, sıçanlar üzerinde yaptıkları, valproat ve okskarbazepin ile kronik tedavinin testis gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 90 gün boyunca 300 mg/kg/gün dozunda VPA uyguladıkları 21-24 günlük sıçanların testislerinde histopatolojik bir anomali saptamamışlardır. TUNEL metoduyla tespit ettikleri apoptotik hücre oranında ise istatistiksel anlamda bir artış

saptamışlardır (214). Biz, Cansu ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları dozda VPA uygulayarak benzer şekilde apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak artma gördük. Bu bulguya ilave olarak ödem, vakuolizasyon, germ hücrelerinin lümene dökülmesi gibi histopatolojik bulgularla da karşılaştık. Çalışmamızı intrauterin dönemin implantasyondan doğuma kadarki sürecinde çok daha genç sıçanlara uyguladığımızdan 300 mg/kg/gün dozunda kullanılan VPA'nın daha genç yaşta daha toksik olabileceği sonucunu çıkarabiliriz.

Roste ve arkadaşları 2 aylık Erkek Wistar sıçanlarında, 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün şeklinde düşük ve yüksek dozda, uzun süreli valproat tedavisi sonrası, testiste görülen morfolojik değişiklikleri incelemiştir. 90 günlük uygulamanın sonunda düşük doz VPA uygulanan sıçanlarda belirgin bir histopatoloji saptanmazken, yüksek doz VPA uygulanan sıçanlarda orta ve ileri derecede testiküler atrofi saptamışlardır (219). Bizim çalışmamızda da belirgin olarak seminifer epitel kalınlığında azalmaya eşlik eden pekçok histopatolojik bulgu gözlemledik. Bu muhtemelen kullandığımız dozun Roste ve arkadaşlarının kullandığı dozların arasında bir değer olmasından kaynaklanmaktaydı. Çalışmamızda, uygulama süresinin kısalığına rağmen, hasar ortaya çıkmış olmasını, VPA'nın daha genç yaştaki sıçanlar üzerinde daha toksik etkiler oluşturabileceğine bağlayabiliriz.

Hamza ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada VPA'ya bağlı üreme toksisitesi üzerinde *Apium graveolens* etkilerini incelemiştir. 500 mg/kg/gün VPA, 7 gün süreyle 3 aylık sıçanlara uygulanmış ve çalışmalarında histopatolojik olarak testis dokusunu değerlendirdiklerinde seminifer tübül yapılarında germ hücrelerinin dejenerasyonu ile birlikte testiküler atrofi saptamışlardır. Seminifer tübüller arasında Leydig hücrelerinde azalma, lümeninde Sertoli hücreleri ile az sayıda germ hücresi saptamışlardır. Ayrıca interstisyel alanda dejenere olmuş Leydig hücresi ve kan damarlarında şiddetli hemoraji gözlemlemiştir (230). Hamza ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonucunda elde ettikleri histopatolojik bulgular bizim çalışmamızla örtüşmekle birlikte, muhtemelen dozun daha yüksek olması nedeniyle sonuçlar daha belirgin olarak değerlendirilmiş olabilir. Ayrıca biz çalışmamızda doğum sonrası yavru sıçanlara herhangi bir uygulama yapmayıp 21. gün sakrifiye ettik. Bu zaman zarfında toksik maddenin şiddetinde azalma ve hücre

içi savunma mekanizmalarının artışına bağlı bir miktar düzelme olması söz konusu olabilir.

Sakr ve arkadaşlar, 150 ± 5 gr ağırlığındaki albino sıçanlarda VPA'ya bağlı sitogenetik ve testiküler değişiklikler üzerine Safranın (*Crocus sativus* L.) etkilerini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Buna göre bir Kontrol Grubu, bir 80 mg/kg/gün dozunda 6 hafta boyunca uygulama yaptıkları VPA Grubu ve 20 mg/kg/gün dozunda yine 6 hafta boyunca uygulama yaptıkları Safran Grubu ile VPA ve Safranı birlikte verdikleri bir grup oluşturmuşlardır. Çalışmalarının histolojik değerlendirmesinde VPA Grubunda seminifer tubül çaplarında azalma ve lümenlerde genişleme gözleyip, germ hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığını ve interstisyel bağ dokusunda hemoraji olduğunu saptamışlardır. Spermatogenetik seriye ait hücrelerde önemli miktarda azalma ve lümende olgunlaşmamış germ hücreleri içeren seminifer tubüllerin sayısında artış belirlemişlerdir. Morfometrik olarak seminifer tubül çapı ve epitel yüksekliği ölçümleri yapıldığında VPA Grubunda Kontrol Grubuna kıyasla belirgin derecede azalma saptandığını bildirmişlerdir (231). Biz de çalışmamızda benzer histopatolojik bulgular bulduk. Morfometrik bulgularımız belirgin olarak azalmıştı ancak sadece epitel çapındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi. Biyokimyasal belirteçlerde ise MDA'da artış, CAT'de azalış saptadılar (231). Bizim çalışmamızda ise MDA ve CAT değerleri istatistiksel anlamda değişiklik göstermedi. Sebebi Sakr ve arkadaşlarının çalışmalarını 6 haftalık bir süre boyunca uygulamaları, kullandıkları deney hayvanlarının ağırlıklarının bizim çalışmamızda kullandığımız deney hayvanlarından daha düşük oluşu ve hayvanları sonrasında hemen sakrifiye etmiş olmaları olabilir. Biz VPA'yı intrauterin dönemde 15 gün boyunca uyguladık ve yavru sıçanlar dünyaya geldikten 21 gün sonra sıçanları sakrifiye ettik. Bu dönemde mevcut biyokimyasal parametrelerde düzelme olmuş ve VPA'nın oluşturmuş olabileceği oksidatif sitrese karşı savunma mekanizması gelişmiş olabilir.

Khan ve arkadaşları VPA'nın farklı dozlarının testis üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında histopatolojik bulgulara ilaveten biyokimyasal parametreleri de değerlendirmişlerdir. Buna göre MDA sonuçları değerlendirildiğinde yüksek dozlarda VPA uygulanan farelerde MDA düzeyi belirgin olarak artarken, düşük dozlarda MDA düzeyinde farklılık saptamamışlardır (9). Biz

de sıçanlar üzerinde VPA'yı 300 mg/kg/gün olarak uyguladık ve MDA düzeyi açısından Kontrol Grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptamadık. Yine Khan ve arkadaşlarının çalışmalarında GSH, yüksek dozlarda istatistiksel olarak anlamlı oranda artış gösterirken, 100 ve 200 mg/kg/günlük düşük dozlarda ki artış istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da GSH, VPA uygulanan sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermedi. Benzer dozların benzer sonuçlara neden olması neticesinde, daha farklı ve yüksek dozlar deneyerek sonuçlar irdelenebilir.

Hamza ve arkadaşları çalışmalarında VPA'ya bağlı üreme toksisitesi üzerinde *Apium graveolens*'in biyokimyasal etkilerini de incelemişlerdir. 500 mg/kg/gün VPA 7 gün süreyle 3 aylık sıçanlara uygulanmış ve çalışmalarında testis dokusunda MDA, GSH ve SOD çalışmışlardır. MDA ve GSH açısından istatistiksel anlamda bir değişiklik olmadığını ancak SOD'nin azaldığını tespit etmişlerdir. SOD'nin hasar tespit edilen dokularda arttığını da azaldığını da bildiren yayınlar mevcuttur (230). Buna rağmen bizim çalışmamızda dokuda azalma, serum da ise artma eğilimi göstermiş olmasına rağmen bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hem doku hem de serum MDA ve GSH değerlerimiz de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık sergilemedi. Sonuçları değerlendirdiğimizde çalışmamızda kullandığımız VPA dozunu artırdığımız takdirde biyokimyasal parametrelerde de farklılıklar görmeye başlayacağımızı düşünebiliriz.

Çalışmamız da testis dokusunun OSI değeri VPA Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek çıkarken, serumda istatistiksel bir fark saptanmamıştır. 8-OHdG değerleri ölçüldüğünde ise hem doku da hem de serumda minimal bir artış gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Schulpis ve arkadaşları VPA monoterapisinin DNA'nın oksidatif hasarını uyarıp uyarmadığını inceledikleri çalışmalarında, epilepsi hastası 50 çocuk ve sağlıklı 30 çocuk kullanmışlardır. Epilepsi hastası 50 çocuğun serum VPA düzeyleri, VPA tedavisi başladıktan 60 gün sonra ölçülerek, sırasıyla $81,0 \pm 8,0$ ve $114 \pm 9,7$ $\mu\text{g/mL}$ olan $n= 26$ ve $n= 24$ olacak şekilde iki ayrı grup oluşturulmuştur. Serum TAS, TOS, OSI ve 8-OHdG değerleri ölçülmüştür. Buna göre serum VPA düzeyi yüksek olan grupta TOS ve TOS/TAS değeri olan OSI istatistiksel anlamda yüksek bulunurken, TAS değeri her iki hasta grubunda kontrolden daha düşük bulunmuştur. DNA hasar

göstergesi olan 8-OHdG de serum VPA düzeyi yüksek olan grupta daha fazla olmak üzere her iki hasta grubunda Kontrol Grubuna göre oldukça yüksek ölçülmüştür (232). Bu sonuçlardan yola çıkarak VPA'nın vücutta oksidatif stresi artırıcı yönde etki ettiğini söyleyebiliriz. Bu etki artan doz ve sürelerde muhtemelen daha şiddetli olacaktır.

Shalaby ve arkadaşları erkek sıçanlarda methomyl insecticide'in üreme toksisitesi ve FA'in koruyucu etkisi üzerine bir inceleme yapmışlardır. Çalışmalarında 16-18 haftalık Sprague Dawley cinsi sıçanlar kullanmışlardır. Metomil, FA ve bunların erkek fertilitesi üzerindeki etkisini tahmin etmek için, 30 olgun erkek sıçan, altı eşit gruba ayrılmıştır. 1. Gruba yalnız distile su verilerek Kontrol Grubu oluşturulmuş, 2. ve 3. Gruplara sırasıyla 1ve 0,5 mg/kg metomil verilmiştir. 4. Gruba 1,1 mg/kg FA ve 5 ve 6. Gruplara da FA ile birlikte yine sırasıyla 1ve 0,5 mg/kg metomil verilmiştir. Oral uygulamalar spermatogenetik döngüyü kapsamaması açısından 65 gün devam ettirilmiştir. Öncelikle sıçanların fertilitite indeksleri hesaplanmış ve buna göre metomilin artan dozlarda fertilitite oranını azalttığı, FA uygulanan gruplarda ise fertilitite oranlarında artış olduğu tespit edilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede Kontrol Grubu ve sadece FA verilen gruplarda herhangi bir patoloji saptanmazken, yüksek dozda metomil verilen gruplarda spermatogenik hücreler belirgin dejenerasyon göstermiştir. Daha düşük dozda interstisyel ödem ve nisbeten daha ılımlı bulgular gözlenmiştir. FA ilave edilen gruplarda ise bir miktar tübüler dilatasyonla birlikte bulgularda düzelme ve spermatogenetik serinin normaleştiği görülmüştür. FA'in metomil ile kombinasyonu sonucu, tedavi edilen sıçanlarda üreme toksisitesini önemli derecede antagonize ettiği görülmüştür (233). Biz de çalışmamızda intrauterin dönemde VPA'ya bağlı oluşan üreme toksisitesini antagonize etmesi amacıyla 400 µg/gün FA'i VPA ile beraber gebelik döneminde anne sıçanlara uyguladık. VPA'ya bağlı olarak interstisyel alanda yoğun ödem, lümeninde germinal epitel hücreleri, germinal epitelde yer yer vakuolizasyon ve germinal epitel kalınlığında azalma gibi bulgular izledik. FA ilavesiyle bulgularda kısmen düzelme oldu ancak özellikle interstisyel ödem yoğunluğunu korumaya devam etti. Bu açıdan değerlendirildiğinde Shalaby ve arkadaşlarının elde ettikleri histopatolojik bulgulardaki düzelmelerin bizim çalışmamızdakilere göre daha belirgin olduğu söylenebilir. Çalışmalarımız FA

açısından benzer dozlara sahip olmakla birlikte bizim uygulama yapma süremiz 15 günle kısıtlıydı. Bu açıdan FA'in iyileştirici etkisini göstermeye başlamış olduğunu ancak yeterli etkin düzeye ulaşacak zamanı bulamadığını düşünülebiliriz.

Bhattacharjee ve arkadaşları sıçan pankreatik adacıklarında, nikotin kaynaklı oksidatif stres ve apoptoza karşı FA ve vitamin B12'nin sinerjik koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Nikotinin neden olduğu toksikolojik etkilerin altında yatan mekanizmada oksidatif stres hasarının rolünü araştırmak için pankreas doku homojenatlarında nitrik oksit üretimi, lipid peroksidasyonu, GSH içeriği, CAT ve SOD aktivitesini analiz etmişlerdir. 21 gün boyunca nikotini tek başına veya 36 µg/kg/gün FA ve B12 ile birlikte vermişlerdir. Lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA Ölçümü yapıldığında Nikotin Grubunda Kontrol Grubuna göre belirgin bir artış görülürken, FA ile nikotinin birlikte uygulandığı grupta pankreas dokusunda MDA düzeyi anlamlı düzeyde azalma göstermiştir. Yine doku GSH düzeylerindeki azalma FA ilavesi ile tersine dönmüştür. CAT aktivitesi de hasar grubuna kıyasla FA ile muamele edilen Grupta anlamlı olarak artış göstermiştir (234). Bizim çalışmamızda da Bhattacharjee ve arkadaşlarının çalışmasıyla örtüşür şekilde FA ile muamele sonrası biyokimyasal parametrelerden MDA azaldı ve doku CAT'ı arttı. Bu açıdan bulgularımız Bhattacharjee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla uyumludur.

FA+VPA Gruplarında Kontrol Grubuna kıyasla TOS, OSI ve ilaveten GSH değerlerimiz anlamlı olarak yüksek çıktı. Histopatolojik olarak yararlı özelliklerini gördüğümüz ve ilaveten kimi biyokimyasal belirteçlerle antioksidan özellikte gösterdiğini düşündüğümüz FA'in prooksidan gibi davranmasını literatürde antioksidatif stres olarak adlandırılan kavrama bağlayabiliriz. Kısaca, yalnızca bir antioksidan alımı, hücrelerin endojen antioksidan savunmasının kompleks sistemini değiştirebilir veya hücre apoptoz yollarını değiştirebilir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS); hücre içi sinyal iletimi, redoks regülasyonu dahil olmak üzere pek çok hücrel kullanım alanı vardır ve sentetik antioksidanlar yararlı rolü olan radikalleri diğerlerinden ayırt edemezler. Antioksidan takviyelerinin uygulanması total ROS oluşumunu azaltırsa, aynı zamanda bakterilerle savaşmak için görev alan bağışıklık sistemine ve hasar gören hücrelerin çıkarılması için gerekli savunma

mekanizmalarına müdahale edebilir. Çok miktarda antioksidan besin alındığında oksidatif stresin artmasıyla prooksidanların oluşmasına neden olabilir (235- 239).

Serum VPA+FA değerlerine baktığımızda Kontrol ve VPA Grubuna göre anlamlı bir TAS artışı değeri görüyoruz. Literatürde FA'in pekçok organ üzerinde antioksidan etkiye sahip olduğunu gösteren bulgu var (108). Doku bulgularımızda FA'in prooksidan gibi davranıp TOS değerini artırdığını belirtmiş olsak da muhtemelen diğer organlarda antioksidan gibi davranış göstermesi serumda TAS değerini yüksek bulmamıza neden oldu.

Pirimetamin bir dehidrofolat redüktaz inhibitörüdür, yani folat metabolizmasını bozabilmektedir. Literatürde VPA'nın da folat metabolizmasını bozduğuna dair yayımlar mevcuttur (10).

Gutiérrez-Pérez ve arkadaşları pirimetamin tedavisinin, erkek fare testiküler hücre popülasyonu gelişimi üzerine etkisini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Bunun için Pirimetamin, Pirimetamin+FA ve Kontrol Grubu olmak üzere üç grup oluşturmuşlar ve 21 gün süreyle uygulama yapmışlardır. 7, 14, 35 ve 90. günlerde de değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışmada epitel alanı ölçümünde, 14, 35 ve 90 günlük yaşlarda Pirimetamin Grubunda Kontrol Grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu bildirilmiştir. Epitel alanı Pirimetamin+FA Grubunda, 14 ve 35 günlük yaş gruplarında Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak artmış, ancak 90 günlük yaş grubunda farklılık görülmemiştir. AI sadece 14 günlük yaş grubunda Pirimetamin Grubunda anlamlı artış göstermiştir (240). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde epitel çapı VPA Grubunda anlamlı bir azalış gösterirken, VPA+FA Grubunda anlamlı bir artış oldu. Yine benzeri şekilde AI hasar grubumuzda arttı. FA ilave ettiğimiz grupta azalma eğilimi görmüş olmamıza rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bulgularımız Gutiérrez-Pérez ve arkadaşlarının çalışmasıyla oldukça uyumlu gözükmektedir. Bu açıdan baktığımızda VPA'nın testis dokusunda oksidatif hasara neden olması ve FA'in antioksidan etki göstermesinin yanısıra, VPA'nın Folat metabolizmasını bozucu etkileri sebebiyle de testis hasarına neden olmuş olabileceğini düşünebiliriz.

Çilenk ve arkadaşları erkek albino sıçanlarda propolisin kadmiyum kaynaklı üreme toksisitesi üzerine etkisini incelemiştir. 50mg/kg dozda 17 gün süreyle propolis uygulanması sonrası kadmiyumun oluşturduğu testis damar tıkanıklığı,

interstisyel alan bağ dokusunda artış, mononükleer hücrelerin infiltrasyonu, epitel hücrelerinin lümene dökülmesi, seminifer tübül epitel bozukluğu, çok çekirdekli dev hücre oluşumu, seminifer tübüllerde nekroz ve atrofi gibi bulguların düzeldiğini tespit etmişlerdir. TUNEL tekniğiyle yapılan AI hesaplamasında yine propolis tedavisi uygulanan grupta hasar grubuna göre belirgin düzelme saptamışlardır (241). Bizim çalışmamızda da VPA Grubuna ait testis kesitlerinde interstisyel alanda yoğun ödem, lümende germinal epitel hücreleri, germinal epitelde yer yer vakuolizasyon ve germinal epitel kalınlığında azalma izlendi. 100 mg/kg propolis uygulandıktan sonra interstisyel alanda ödem, lümende germinal epitel hücreleri ve germinal epitelin bazal membrandan ayrılması gibi dejeneratif bulgular yer yer gözlenmekle birlikte bu bozukluklarda belirgin bir gerileme oldu. AI hesaplamasında propolis uygulanan grupta VPA'ya bağlı olduğu düşünölen apoptotik hücre hasarında azalma olduğu gözlendi, ancak bu veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çilenk ve arkadaşlarının elde ettikleri biyokimyasal bulgularda propolis uygulanan grupta MDA düzeyinde istatistiksel anlamda bir azalış saptadılar (241). Bizim çalışmamızda ise Kontrol Grubuyla kıyasladığımızda VPA+Propolis Grubunda MDA'da azalış mevcuttu, ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çilenk ve arkadaşları toplamda 18 gün propolis uygulamışlar ve sıçanlara deneye başladıktan 8 gün sonra kadmiyum vermeye başlamışlardır. Yani propolisin 8 günlük bir ön kullanımı söz konusu olmuştur (241). Biz ise çalışmamızda VPA ve Propolis uygulamalarını eş zamanlı olarak başlattık ve doğuma kadar 15 gün süreyle devam ettirdik. Propolisin hasar düzeltici etkisini görmüş olmamıza rağmen Çilenk ve arkadaşlarının çalışmasındaki olumlu bulgular daha belirgindi. Bu durumun propolisin ön kullanıma bağlı olduğunu söyleyebiliriz. Bu bulgulardan hareketle bu konuda ilerde yapılacak destekleyici ilave çalışmalarla VPA kullanan ve gebelik düşünölen epileptik anne adaylarına propolis kullanmaları önerilebilecektir.

Sönmez ve arkadaşları sıçanlarda propolisin metotreksata (MTX) bağlı testis hasarına karşı koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla sekiz haftalık Wistar cinsi sıçanlar, Kontrol, MTX, MTX+Propolis ve Propolis olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Propolis 100 mg/kg dozunda ve 15 gün boyunca, MTX ise sadece 8. gün intraperitoneal olarak tek doz uygulanmıştır. Çalışmalarında histopatolojik olarak,

MTX Grubu seminifer epitel hücrelerinde vakuol oluşumu, seminifer epitel hücrelerinde deskuamasyon, germinal epitelde bozukluk gibi bulgulara rastlamışlardır. Tedavi olarak propolis uygulanan grupta ise bulgularda belirgin olarak düzelme tespit etmişlerdir. Ortalama seminifer tübül çaplarını hesapladıklarında hasar grubunda kontrole göre anlamlı azalma, propolis grubunda ise anlamlı artış saptamışlardır. TUNEL metoduyla inceledikleri apoptotik hücrelerin sayısında, hasar grubunda bir artma eğilimi olduğunu, terapötik ajan olarak verilen propolisin ise herhangi bir azalmaya neden olmadığını bulmuşlardır. Biyokimyasal olarak da MDA'nın MTX verilen sıçanlarda artma eğiliminde olduğu, propolisle tedavi edilenlerde de azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (242). Yaptığımız çalışmada VPA ile oluştuğunu düşündüğümüz bozuklukların düzeyinde propolis uygulandıktan sonra bir azalma saptadık. Morfometrik ölçümlerde epitel yükseklikleri propolis ilave edilen grupta anlamlı olarak artmıştı. Hasar grubumuzda apoptotik hücre oranı belirgin olarak artmış, propolisle tedavi sonrası azalmış; ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Doku MDA'sı azalmış olmakla birlikte bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgular Sönmez ve arkadaşlarının bulgularıyla örtüşmektedir.

Yousef ve arkadaşları erkek sıçanlarda alüminyum klorürün ($AlCl_3$) neden olduğu üreme toksisitesi üzerinde propolisin koruyucu etkilerini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla Kontrol, $AlCl_3$, $AlCl_3$ +Propolis ve sadece Propolis olmak üzere 4 grup oluşturmuşlardır. Uygulamalara spermatogenetik siklusu tamamlamak amacıyla 70 gün boyunca devam etmişler ve Propolis dozunu 50 mg/kg şeklinde belirlemişlerdir. Yayınlarında $AlCl_3$ uygulandıktan sonra seminifer tübüllerde yapısal bozukluklar, vakuolizasyon, lümende olgunlaşmamış germ hücrelerinin bulunması, interstisyel alanda genişleme ve ödem gibi bulgular gözlendiğini bildirmişlerdir. $AlCl_3$ +Propolis Grubunda ise seminifer tübüllerin ve testisin hemen hemen tamamıyla normal yapısına kavuştuğunu tespit etmişlerdir. Biyokimyasal olarak CAT'ın arttığını, GSH'nın azaldığını belirlemişlerdir (227). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz histopatolojik bulgularda Kontrol Grubuna göre bir miktar düzelme belirlendi. Biyokimyasal olarak doku ve serum CAT ve GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı.

Yousef ve arkadaşları çalışmalarını 70 gün gibi uzun bir sürece yaymışlardır (228). Biz ise intrauterin dönemdeki toksik etkileri incelemek amacıyla çalışma süremizi gebeliğin bitimiyle birlikte sonlandırdık. Buradan hareketle hasar yapıcı ve tedavi edici madde ile temas süresinin uzunluğunun, vücudun oluşturduğu cevapla korele olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca propolisin bölgeler arası farklı özellikler gösterdiğini de akılda tutmakta fayda vardır (163).

Yılmaz ve arkadaşları CAPE'nin fluoksetin ile indüklenen hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında TAS, TOS ve OSI değerlerini ölçmüşlerdir. 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün fluoksetin verdikleri sıçanlara yine 7 gün 10mg/kg/gün olacak şekilde CAPE uygulamışlardır. Deney sonucunda Kontrol ve sadece CAPE uygulanan gruplara kıyasla, sadece fluoksetin uygulanan grupta serum ve karaciğer dokularında TOS ve OSI'de artış ve TAS düzeylerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. CAPE ile tedavi sonrası, CAPE+Fluoksetin Grubunda serum ve karaciğerde TAS'ın artmasıyla TOS ve OSI düzeyi azalmıştır. Karaciğerin histopatolojik incelemesinde fluoksetin tedavisinden sonra hepatik hasar görüldüğü ve CAPE tedavisi ile hasarda düzelmeler olduğu belirtilmiştir (243). Bizim çalışmamızda ise histopatolojik olarak bulgularda düzelmeler olmasına rağmen TAS, TOS ve OSI değerlerinde beklenenin aksi yönde veriler elde edilmiştir. Bunu VPA+FA Grubunda açıkladığımız gibi literatürdeki antioksidatif stres olarak adlandırılan kavrama dayandırabiliriz. Yani antioksidan olarak verdiğimiz propolis aynen FA örneğinde olduğu gibi prooksidan olarak davranmış olabilir (235-239). Diğer açıdan karaciğer hücreleri metabolizmasıyla germinal hücre metabolizmasındaki farklılıklarda bu bulguların ortaya çıkmasının nedeni olabilir.

Sonuç olarak prenatal dönemde uygulanan VPA'nın yavru sıçanların testis gelişimini olumsuz etkilediğini ve FA ve Propolis eklenmesinin histopatolojik ve biyokimyasal bulgularda belli bir ölçüde düzelmeye sağladığını söyleyebiliriz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

VPA'nın prenatal testis dokusundaki toksik etkilerine karşı FA ve propolis'in koruyucu etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmamızın sonucunda,

- VPA sıçan testislerinde:
 - Seminifer tübül bazal membranında ve germinal epitelinde düzensizliklere yol açmıştır.
 - İnterstisyel alanda ödeme neden olmuştur.
 - Seminifer tübül lümenine germinal epitel hücrelerinin dökülmesine yol açmıştır.
 - Germinal epitel kalınlığında azalmaya sebep olmuştur.
 - Lümenin de germinal epitel hücrelerinin görüldüğü seminifer tubül sayısı artmıştır.
 - AI'de artışa neden olmuştur.
 - Doku OSI değerlerini artırmıştır.
- VPA+FA uygulanan sıçan testislerinde:
 - Seminifer tübül bazal membranında ve germinal epitelinde düzensizliklerde azalma gözlenmiştir.
 - Lümenin de germinal epitel hücrelerinin görüldüğü seminifer tubül sayısı azalmıştır.
 - Germinal epitel kalınlığı artmıştır.
 - VPA Grubuna göre doku MDA istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmıştır ve serum TAS istatistiksel olarak anlamlı oranda artmıştır.
- VPA+Propolis uygulanan sıçan testislerinde:
 - Seminifer tubül bazal membranında ve germinal epitelinde düzensizliklerde azalma gözlenmiştir.
 - Lümenin de germinal epitel hücrelerinin görüldüğü seminifer tubül sayısı azalmıştır.
 - İnterstisyel alanda ödem de belirgin azalma saptanmıştır.
 - Germinal epitel kalınlığında artışa neden olmuştur.

Çalışma bulgularından yola çıkılarak, bu konuda yeni çalışma yapacak araştırmacılara bulguların zenginleştirilebilmesi açısından elektron mikroskobu,

moleküler biyoloji gibi daha ileri teknoloji ve teknikler kullanabileceklerini önerebiliriz. VPA, FA ve Propolisin farklı ve daha yüksek doz ve sürelerde kullanılması bulguların daha çarpıcı olmasını sağlayabilir. Çalışmamızda FA’i antioksidan olarak Propolisle kıyaslamamızın nedeni günümüz koşullarında gebe her kadına profilaktik olarak FA tedavisi öneriliyor olmasıydı. Bu amaçla yapılacak bir sonraki çalışmada propolis ve FA’in sinerjik etkilerinin anlaşılabilmesi için Propolis+FA şeklinde bir grubun daha ilave edilmesinin oldukça yararlı olacağını düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Adab N, Tudur SC, Vinten J, Williamson P, Winterbottom J. Common antiepileptic drugs in pregnancy in women with epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; 3.
2. Brosh K¹, Matok I, Sheiner E, Koren G, Wiznitzer A, Gorodischer R, Levy A. Teratogenic determinants of first-trimester exposure to antiepileptic medications. *J Popul Ther Clin Pharmacol.* 2011; 18: 89-98.
3. Meador KJ, Baker GA, Finnell RH, Kalayjian LA, Liporace JD, Loring DW, Mawer G, Pennell PB, Smith JC. In utero antiepileptic drug exposure: fetal death and malformations. *Neurology.* 2006; 67(3): 407-12
4. Ushigome F, Takanaga H, Matsuo H, Tsukimori K, Nakano H, Ohtani H, Sawada Y. Uptake mechanism of valproic acid in human placental choriocarcinoma cell line (BeWo). *Eur J Pharmacol.* 2001; 417(3): 169- 76.
5. Radatz M, Ehlers K, Yagen B, Bialer M, Nau H. Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid. *Epilepsy Res.* 1998; 30(1): 41-8
6. Krogenaes AK, Taubøll E, Stien A, Oskam IC, Lyche JL, Dahl E, Thomassen RF, Sweeney T, Ropstad E. Valproate affects reproductive endocrine function, testis diameter and some semen variables in non-epileptic adolescent goat bucks. *Theriogenology.* 2008; 70(1): 15-26.
7. Samrén EB, van Duijn CM, Koch S, Hiilesmaa VK, Klepel H, Bardy AH, Mannagetta GB, Deichl AW, Gaily E, Granström ML, Meinardi H, Grobbee DE, Hofman A, Janz D, Lindhout D. Maternal use of antiepileptic drugs and the risk of major congenital malformations: a joint European prospective study of human teratogenesis associated with maternal epilepsy. *Epilepsia.* 1997; 38(9): 981-90.
8. Cansu A. Antiepileptic drugs and hormones in children. *Epilepsy Res.* 2010; 89(1); 89-95
9. Khan S, Ahmad T, Parekh CV, Trivedi PP, Kushwaha S, Jena G. Investigation on sodium valproate induced germ cell damage, oxidative stress and genotoxicity in male Swiss mice. *Reprod Toxicol.* 2011; 32(4): 385-94.
10. Spiegelstein O, Chatterjie N, Alexander G, Finnell RH. Teratogenicity of valproate conjugates with anticonvulsant activity in mice. *Epilepsy Res.* 2003; 57(2-3): 145-52

11. B. Tosi, A. Donini, C. Romagnoli, A. Bruni. Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents. *Phytotherapy Research*. 1996; 10: 335-336.
12. Hegazi AG, Abd El Hady FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C*. 2000; 55(1-2):70-5.
13. Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J, Shani J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int J Radiat Biol*. 1990; 57(3): 461-5
14. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamedi M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN. Antioxidant power of Iranian propolis extract, *Food Chemistry*. 2007; 103(3): 729-733
15. Fathy Ahmed Fetouh, Azab El Saied Azab. Ameliorating effects of curcumin and propolis against the reproductive toxicity of gentamicin in adult male guinea pigs: Quantitative analysis and morphological study. *American Journal of Life Sciences*. 2014; 2(3): 138-149.
16. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human. Clinically oriented embryology*. 8th Ed. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2008.
17. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA; 2004. p. 321-362.
18. Drews U. *Color Atlas of Embryology*. Thieme Flexibook, New York; 1995.
19. Kashimada K, Koopman P. Sry: The master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010; 137(23): 3921-30.
20. Barsoum IB, Yao HH. Fetal Leydig Cells: Progenitor Cell Maintenance and Differentiation. *J Androl*. 2010; 31 (1) :11–15
21. Gürsoy E, Koptagel E. *Embriyoloji Atlası*, Ankara; Esnaf Ofset Matbaacılık. 1997; 140-164
22. Rosai J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Ninth ed. New York: Elsevier Inc. 2004; 1412-1456.
23. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* 2000; 258:210–220.
24. Ojeda SR, Advis JP, Andrews WW. Neuroendocrine Control of The Onset of Puberty in The Rat. *Fed Proc*. 1980; 39(7): 2365–71.

25. Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. Postnatal Ovary Development in The Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicol Pathol.* 2015; 43(3): 343– 353.
26. Beck F, Lloyd JB. Comparative Placental Transfer. In: *A Handbook of Teratology*, Vol. III, Ed. Wilson JG and Fraser FC, New York, Plenum Press, 1977;155-186.
27. Magre S, Jost A . Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*1984; 81(24): 7831-4.
28. Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 64: 133– 47.
29. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003;262(1):1–15.
30. Töhönen V, Ritzén EM, Nordqvist K, Wedell A. Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. *Endocr Dev.* 2003; 5: 1–23.
31. Fiegel HC, Rolle U, Metzger R, Gfroerer S, Kluth D. Embryology of the testicular descent. *Semin Pediatr Surg.* 2011; 20(3): 170-5
32. Dorostghoal M, Sorooshnia F, Zardkaf A. Stereological analysis of Wistar rat testis during early post-natal development. *Anat Histol Embryol.* 2011; 40(2): 89-94
33. Wilson ME, Handa RJ. Gonadotropin secretion in infantile rats exposed to ethanol in utero. *Alcohol.*1997; 14(5): 497-501.
34. Chen H, Ge RS, Zirkin BR. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 306(1-2): 9-16.
35. Huo S, Xu Z, Zhang X, Zhang J, Cui S. Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis. *J Reprod Dev.*2010; 56(4): 370-8
36. Barrow PC, Barbellion S, Stadler J. Preclinical Evaluation of Juvenile Toxicity. *Methods Mol Biol.* 2011; 691: 17–35.
37. Yıldırım M. İnsan Anatomisi. 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2003. 226-232.
38. Tortora GJ, Derrickson B. *Principles Anatomy and Physiology.* 12 rd ed. America: John Wiley & Sons, Inc, 2009. 1082-1093.

39. Kazos EA, Stalikas CD, Nanos CG, Konidari CN. Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*. 2007; 68(11): 2104-10
40. Dere F. Nöroanatomi Fonksiyonel Nöroloji Atlası ve Ders Kitabı 1, 2. Baskı, Adana: Nobel Tıp Kitapevi. 2000
41. Şenol TH. Metay Anatomi Ders Notları. 1. Baskı, Ankara; Saray Medikal Yayıncılık. 1996; 375-418
42. Ferner H, Staubesand J. Urogenital System In: Sobotta, München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg. 1985; 175-201.
43. Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. 5. Baskı. Ankara. ODTÜ Yayıncılık, 1999
44. Gartner LP, Hiatt JL (2007). *Color Textbook Of Histology*. 3. Baskı. Philadelphia: Saunders Company. 2007. 489-501.
45. Snell RS. Klinik Anatomi. Çeviren: Yıldırım M, 6.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2004. 236.
46. Burukoğlu D, Bayçu C (2008). Protective effects of zinc on testes of cadmium-treated rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008; 81(6): 521-524.
47. Dere F. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı. Adana: Nobel Tıp Kitabevleri.1999
48. Murono EP, Derk RC, de Leo'n JH. Differential effects of octylphenol, 17 bestradiol, endosulfan, or bisphenol A on the steroidogenic competence of cultured adult rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology*.2001; 15: 551–560.
49. Sternberg SS. *Histology for Pathologist*. New York: Lippincott-Raven; 1997
50. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text & Atlas*. Tenth Edition. Lange Medical Books McGraw-Hill, USA; 2003. 431-449.
51. Pointis G, Gilleron J, Carette D, Segretain D. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R. Lond B Biol Sci*.2010; 365(1546); 1607–1620.
52. Ding Y, Tang J, Zou J, She R, Wang Y, Yue Z, Tian J, Xia K, Yin J, Wang D. The effect of microgravity on tissue structure and function of rat testis. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 44(12): 1243-50.

53. Pop OT, Cotoi CG, Pleşea IE, Gherghiceanu M, Enache SD, Mandache E, Hortopan G, Pleşea RM. Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Rom J Morphol Embryol.*2011; 52: 241–248.
54. Leeson T.S, Leeson C.R, Paparo A.A. *Text/Atlas of Histology*, Philadelphia W.B. Saunders International Edition,1988; 635-668.
55. Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol.* 1996; 59(1): 1-13.
56. Bloom W, Fawcett DW. *Textbook of Histology*. Philadelphia. 1975: 796-834.
57. Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Phenotypic and functional characteristics of male germline stem cells in rats. *Dev Biol.*2004; 274(1): 158-170
58. Erbeni T. *Histoloji*. İkinci baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Yayınları. 1990; 153-190.
59. Erdoğan D, Hatiboğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. *Özel Histoloji*. Ankara; SBAD Yayınları. 1996; 156-170.
60. Eroschenko VP. *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Eleventh Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,2008; 409-431.
61. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972; 52(1): 198–236.
62. Soylu S.M. Rat Fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine.* 2010; 23:2
63. Adler ID. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res.*1996; 352(1-2): 169–172.
64. Foster WG, Maharaj-Briceño S, Cyr DG. Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. *Review. Ciência & Saúde Coletiva.* 2011; 16(6): 2893-2905.
65. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Çeviren: Demir R, Ankara: Palme Yayıncılık;2006. 532-550.
66. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev.*2002; 82(4): 825-74.

67. Rey R, Al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fekete C, Chaussain JL, Josso N. Testicular dysgenesis does not affect expression of antimüllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am. J. Pathol.*1996; 148(5): 1689–1698.
68. Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Tumors of the Testis, Adnexa, Spermatic Cord and Scrotum. *Atlas of Tumor Pathology. Third Series Fascicle 25 AFIP*, Washington DC. 1999; 86-87.
69. Ross MH, Pawlina W (2006). *Male Reproductive System. Histology. Fifth Edition* Lippincott Williams&Wilkins;2006. 728-759.
70. Krinke GJ. *The Laboratory Rat. 1st Ed. Switzerland: Academic Press; 2000. s: 150-152, 311-312.*
71. Dökmeci İ. *Toksikoloji, 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 6-17.*
72. Vural N. *Toksikoloji, Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1996;1-20.*
73. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji. Ed. Kayaalp SO. İlaçların toksik tesirleri ve toksikolojinin temel kavramları. 12. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2009.*
74. Bailey J, Knight A, Balcombe J. *The Future of Teratology research is in vitro. Biogenic. Amine. 2005; 19: 97-145.*
75. Stanley F.C, Bower, C. *Teratogenic drugs in pregnancy. Medical Journal of Australia 1986, 11-12 (145):596-599.*
76. McBride WG. *Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet. 1961;16:1358.*
77. Brent RL, Beckman DA, and Landel CP. *Clinical Teratology. Curr Opin Pediatr 1993;5(2):201- 211.*
78. Queenan JT, Hobbins JC, Spong CY (eds). *Hazards to Pregnancy. Protocols For Highrisk Pregnancies, 4th edition, Blackwell Pub 2005s:1–53*
79. Koren G, Klinger G, Ohlsson A. *Fetal pharmacotherapy. Drugs 2002; 62(5): 757–773.*
80. Parnham MJ. Bruinvels J. *Valproate; Birkhauser Verlag, Germany p:1-3,1999.*
81. Rotiroti D, Palella B, Losi E, Nistico G, Caputi AP. *Evidence that a GABAergic mechanism influences the development of DOCA-salt hypertension in the rat. Eur J Pharmacol.1982; 10;83(1-2):153-154.*

82. Shiloh R, Nutt D, Weizman A. Psikiyatrik Farmakoterapi Atlası (Çeviren. S Kırılı). Yelkovan Yayıncılık, İstanbul, 2000.
83. Gram L, Bentsen DK. Valproate, an updated review, *Acta Neurol. Scand.* 1985; 72: 129-139
84. Rogiers V, Vanderbergh Y, Callaerts A, Sonck W, Maes V, Vercruyssen A. The inducing and inhibiting effects of sodium valproate in vivo on the biotransformation systems of xenobiotics in isolated rat hepatocytes. *Xenobiotica.* 1988; 18(6) : 759-765
85. Ketter TA, Wang PW. The emerging differential roles of GABAergic and ant glutamatergic agents in bipolar disorders. *J Clin Psychiatry* 2003; 64 Suppl 3: 15-20.
86. Gobbi G, Janiri L. Sodium- and magnesium-valproate in vivo modulate glutamatergic and GABAergic synapses in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 185: 255-62.
87. Kanai H, Sawa A, Chen RW et al. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J* 2004; 4: 336-44.
88. Rosenberg JM, Salzman C. Update: new uses for lithium and anticonvulsants. *CNS Spectr* 2007; 12: 831-41.
89. Tunca Z, Özerdem A. Temel Psikofarmakoloji. In Yüksel N (ed). Birinci Baskı edition. Ankara: BAYT 2010;719-52. 183.
90. Goodsell DS, The molecular perspective: Histone deacetylase, *The Oncologist.* 2003; 8(4): 389-391.
91. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the national cancer institute.* 2000; vol. 92, no. 15; 1210-1216.
92. Ünay B, Kalman S, Serdar M, Akın R, Gökçay E. Antiepileptik tedavi alan çocuklarda serum hormon düzeyleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2002; 46: 182-186
93. Unal E, Kaya U, Aydın K. Fatal valproate overdose in a newborn baby. *Hum Exp Toxicol.* 2007;26(5):453-6.
94. Spiller HA, Krenzelok EP, Klein-Schwartz W, Winter ML, Weber JA, Sollee DR, et al. Multicenter case series of valproic acid ingestion: serum concentrations and toxicity. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38(7):755-60.

95. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol*, 2009; 28: 1-10.
96. Ardinger HH, Atkin JF, Blackston RD, Elsas LJ, Clarren SK, Livingstone S, Flannery DB, Pellock JM, Harrod MJ, Lammer EJ, et al. Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. *Am J Med Genet*. 1988; 29(1) :171-85.
97. Morrow J, Russell A, Guthrie E, Parsons L, Robertson I, Waddell R, et al. Malformation risks of antiepileptic drugs in pregnancy: a prospective study from the UK Epilepsy and Pregnancy Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77: 193-8.
98. Bescoby-Chambers N, Forster P, Bates G. Foetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev Med Child Neurol* 2001; 43:202-6.
99. Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, Dean JC. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Medical Genetics*. 2000; 37: 489-97.
100. Wyszynski DF, Nambisan M, Surve T, Alsdorf RM, Smith CR, Holmes LB. Increased rate of major malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy. *Neurology*. 2005; 64 (6): 961-5.
101. Staunton H. Valproate, spina bifida, and birth defect registries. *Lancet*. 1989; 18;1(8634):381
102. Harden CL, Pennell PB, Koppel BS, Hovinga CA, Gidal B, Meador KJ, et al. Practice parameter update: management issues for women with epilepsy--focus on pregnancy (an evidence-based review): vitamin K, folic acid, blood levels, and breastfeeding: report of the Quality Standards Subcommittee and Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and American Epilepsy Society. *Neurology* 2009; 73(2): 142-9
103. Scott JM. Folate and Vitamin B12. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1999; 58(2): 441-8.
104. Bhagavan NV. *Medical Biochemistry*. 4'th Edition. Ed by Bhagavan NV. Academic Pres; 2002
105. Scheindlin S. Vicissitudes of a vitamin. *Modern Drug Discovery (MDD)*. 2001; 4(8) : 61-63.
106. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 30 th edition. 2015

107. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. Harrison's Principles of Internal Medicine, 16.th Edition, Megaloblastic Anemias, P: 601-607
108. Mohammadi A, Omrani L, Omrani LR, Kiani F, Eshraghian A, Azizi Z, Omrani GR. Protective effect of folic acid on cyclosporine-induced bone loss in rats. *Transplant International*. 2012; 25(1): 127-133.
109. Healty Eating During Pregnancy and Lactation (Trainig Course and Workshop Curriculum for Health Professionals Revised Draft) WHO, 1998
110. Budak N. Folik Asitin Kadın ve Çocuk Sağlığındaki Önemi, Erciyes Tıp Dergisi. *Erciyes Medical journal*. 2002; 24(4): 209-214.
111. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 21.07.2017. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16. Nutrient Data Laboratory Home Page, http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl
112. Miles EW, Metzler DE. Esmod Emerson Snell (1914-2003) Biographical article. The American Society for Nutritional sciences, The Journal of Nutrition. 2004; 134: 2907-10
113. Ommaty R. *Vademecum modern ilaç rehberi*. 25. baskı: Ankara: Pelikan Yayıncılık. 2004
114. Butterworth CE Jr, Tamura T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1989; 50(2) :353-8
115. Olson BH, Keast DR, Song WO, Morris DH. Effectiveness and Safety of Folic Acid Fortification. *Nutrition Today*. 2004; 39(4) : 169-75.
116. Van der Put NM, Van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview. *Exp Bio Med*. 2001; 226(4): 243-70.
117. Geisel J. Folic Acid and Neural Tube Defects in Pregnancy: A Review. *J Perinat Neonatal Nurs*. 2003; 17(4): 268-79.
118. Kayaalp S.O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Onbirinci baskı. Ankara: Hacettepe T.A.Ş; 2005.
119. Oakley GP Jr, Ericson JD, Adams MJ Jr. Urgent need to increase folic acid consumption *JAMA*.1995; 274(21) :1717-18.
120. Mitchel LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS. Spina Bifida. *Lancet* 2004; 364(9448): 1885-95.

121. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. Abnormal folat metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for down syndrome. *AJCN*. 1999; 70 (4): 495 –501.
122. Fleming A. The role of folate in the prevention of neural tube defects: human and animal studies. *Nutrition Reviews*. 2001; 59: 13-20.
123. Sullivan F.M, Mcelhatton P.R. Teratogenic activity of the antiepileptic drugs phenobarbital, phenytoin and primidone in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1975: 34(2); 271-282.
124. Nisson K, Gustafson L, Hultberg B. Plasma homocysteine concentration relates to the severity but not to the duration of Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2004;19(7): 666-72.
125. Fava M, Borus JS, Alpert JE, Nierenberg AA, Rosenbaum, JF, Bottiglieri T. Folate, Vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. *Am. j. Psychiatry*. 1997;154(3): 426-8.
126. Lao JI, Bayer K, Ariza A. The Homocysteine Pathway: A New Target For Alzheimer Disease treatment? *Drug Development Research*. 2004; 62(3): 221-30.
127. Prasad K. Homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease. *Int J Angiol*. 1999; 8(1): 76-86.
128. Deol PS, Barnes TA, Dampier K, Pasi KJ, Cristina Oppeheimer C, Sue R, Pavort SR. The effect of folic acid supplements on coagulation status in pregnancy. *Br J Haematol*. 2004;127: 204-8.
129. Lekakis JP, Papamichel CM, Ppapaioannou TG, Dagle AG. Oral folic acid enhances endothelial function in patients with hypercholesterolemia receiving statins. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2004;11(5): 416-20.
130. Tawakol A, Migrino RQ, Aziz KS, Waitkowskova J. High-Dose Folic Acid Acutely Improves Coronary Vasodilator Function in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45(10): 1580-4.
131. Schröder CH, de Boer AW, Giesen AM, Monnens LA, Henk Blom H. Treatment of hyperhomocysteinemia in children on dialysis by folic acid. *Pediatr Nephrol*. 1999;13(7): 583-5.
132. Kang HG, Lee BS, Hahn H, Lee JH. Reduction of plasma homocysteine by folic acid in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*. 2002;17: 511-14.

133. Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannuci El, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE. Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocysteine, and Risk Of Breast Cancer. *JNCI*. 2003; 95(5): 373-80.
134. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionin-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *JNCI*. 1995;87(4): 265-73.
135. Thomson JR. Maternal folat supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case control study. *The Lancet* 2001; 358: 1935-40.
136. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*. 2002; 77(3): 491-8.
137. Sato E, Ohru T, Matsui T, Arai H, Sasaki H. Folat deficiency and risk of pneumonia in older people. *J Am Geriatr Soc*. 2001; 49(12): 1739-40.
138. Chowers Y, Sela BA, Holland R, Fidler H, Simoni FB, Bar-Meir S. Increased levels of homocysteine in patient with Chron's disease are related to folat levels. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95: 3498-502.
139. Houston DK, Johnson MA, Nozza RJ, Gunter EW, Shea KJ, Cutler GM, Edmonds JT. Age-related hearing loss, Vitamin B12 and folat in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69(3): 564-71.
140. Field CJ, Arne Van Aerde A, Drager KL, Goruk S, Basu T. Dietary folat improves age related decreases in lymphocyte function. *J Nutr Biochem*. 2006;17(1): 37-4
141. Ghisalberti, E.L. Propolis: a review, *Bee World*, 1979; 60(2) : 59-84
142. Velikova M, Bankova V, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift Fur Naturforschung C A Journal of Biosciences*. 2000; 55(9-10) :785-789.
143. Bankova VS, De castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*.2000; 31: 3-15.
144. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*. 2005; 160: 189-195

145. Kumova U, Korkmaz A, Avcı B.C, Güney C. Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 2002; 10-23
146. Şahinler N. Arı Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi, *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2000; 5(1 -2): 139 -148
147. Walker P, Crane E. Constituents of propolis. *Apidologie*. 1987; 18(4) : 327–34
148. Qian WL, Khan Z, Watson DG, Fearnley J. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; 21(1):78-83. 98.
149. Marcucci M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 25: 83-99
150. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*. 2014; 19(12) :19610-19632
151. Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006; 7(1): 22-31
152. Hepşen I.F, Tilgen F, Er H. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*. 1996; 3(4): 386-391
153. Koo H, Rosalen P.L, Cury J.A. Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity, *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 1302-09
154. Russo R, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin, *Fitoterapia*. 2002; 73(1); 21-29
155. Wagh VD. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2013;1-11
156. Pena RC. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Ciencia e Investigacion Agraria*. 2008; 35(1) :17-26
157. Hassan M. The role of busulfan in bone marrow transplantation. *Med Oncol*. 1999; 16(3): 166-76
158. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK et al. Hepatoprotective and antihelicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*. 2001; 8(1) : 16-23

159. Trusehva B, Popova M, Bankova V et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2006; 3(2) : 249- 54
160. Park Y.K, Alencar S.M, et al. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50 (9): 2502–06
161. Bankova V. Popova M. Stefan B. Sabatini A. Chemical composition of European propolis expected and unexpected results, *Z. Naturforsch C*, 2002; 57(5-6), 530-533 p.19
162. Poonkuzhali B, Srivastava A, Quernin M.H. et al. Pharmacokinetics of oral busulphan in children with beta thalassaemia major undergoing allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24 (1): 5-11
163. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 133(2): 253-260
164. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55(6) :481-504.
165. Shohaib T, Shafique M, Dhanya N, Divakar M. Importance of flavonoids in therapeutics. *Hygeia: Journal for Drugs and Medicines*. 2011; 3(1):1-18.
166. Vermerris W, Nicholson RL. *Phenolic compound biochemistry*. USA. Springer Science & Business Media.2007.
167. Heim K E, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13(10) : 572-584
168. Giada MDLR. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*. 2013; 87-112
169. Ötleş S. *Bal ve Bal Teknolojisi*. İzmir: Alaşehir Meslek Yüksekokulu Yayınları; 1995
170. Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J of Ethnopharmacol*. 2001; 76(2): 165-170
171. Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*. 2003; 80(1): 29-33

172. Kolankaya D, Selmanoglu G, Sorkun K, Salih B. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats, *Food Chemistry*. 2002; 78: 213-217
173. Aksoy Z, Dığrak M. Bingöl yöresinde toplanan bal ve propolisin antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar. *Science and Eng, J. of Fırat Univ.* 2006; 18(4): 471-478
174. Hoşnuter M, Gürel A, Babuçu O, Armutçu F, Kargı E, Işıkdemir A. The effect of cape on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*. 2004; 30(2): 121-125
175. Borrelli F, İzzo AA, Di Carlo G. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in rat colon. *Fitoterapia*. 2002; 73(1) : 38-43
176. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol.*1998; 36(4); 347-363
177. Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. 1999, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *Journal of Ethnopharmacol.* 1999; 64(3) : 235-240
178. Nieva Moreno MI, Isla MI, Cudmani NG et al. Screening of antibacterial activity of amaiche del valle (tucuman, argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 68(1-3): 97-102
179. Koç AN, Silici S, Ayangil D, et al. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. Mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Blackwell Publishing Ltd. Mycoses*. 2005; 48: 205–10
180. Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC et al. Effect of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophage against *Paracoccidioides brasiliensis*, *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79(3) : 331-34
181. Özcan M, Ünver A, Ceylan DA, Yetisir R. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. *Nahrung*. 48(3) : 188–194
182. Amaros M, Lurton E, Boustie J, Gire L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-Herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-butyl-2-enyl caffeate, *J Nat Prod*. 1994; 57(5) : 644–647
183. El hady, Faten K. Abd; Hegazı, Ahmed G. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2002; 57(3-4): 386-394

184. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull.* 1997; 20(5) : 496–501
185. Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytotherapy Resarch.* 21(5): 452-56
186. Paintz M, Metzner Y. On the lokal anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie.* 1979; 34 (12): 839–41 p. 200
187. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences.* 2007; 80(4): 370–77
188. Orhan H, Marol S, Hepşen IF et al. Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. *Toxicology.* 1999; 139(3): 219–32
189. Fischer G, Cleff MB, Dummer LA. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 116(1-2) : 79-84
190. Fischer G, Conceicao FR, Leite FP. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with suhv-1. *Vaccine.* 2007. 25(7): 1250-56
191. Munker R, Andreeff M. Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion molecules (CD54) on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF- α and IFN- γ , *Cytokines Mol Ther.* 1996; 2(3) : 147–159
192. Banskota, A.H, Tezuka Y, Prasain J.K. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Product.* 1998; 61(7) : 896–00 p. 24
193. Dohle GR. Male infertility in cancer patients, review of the literature, *International Journal of Urology.* 2010; 17(4): 327-331
194. Paulino N, Teixeira C, Martins R. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med.* 2006; 72(10): 899- 906
195. Bayankova L, Derejian S, Koumanova R et al. Inhibition of helicobacter pylori growth in vitro by bulgarian propolis: preliminary report, *Journal Of Medical Microbiology.* 2003; 52(5) : 417-19

196. Popova M, Silici S, Kaftanoğlu O, Bankova, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 2005; 12(3): 221-228
197. Özkul Y, Silici S, Eroğlu E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine*. 2005. 12(10): 742-47
198. Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement Med*. 2002; 8(1): 77-83
199. Arı dünyası 'sağlıklı yaşam alanı'. 21.07.2017. <http://www.aridunyasi.com.tr/propolis-faydalari.html>
200. Kutluca S, Genç F, Korkmaz A. Propolis. Samsun, Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü, 2008
201. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(5): 749-760
202. El-khawaga O, Salem T, Elshal M. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chimica Acta*.2003; 338(1-2): 11-16
203. Talas ZS, Gülhan MF. Effect of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol and Environmental. Safety*. 2009; 72(7): 1994-1998
204. Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of Reproduction. In: Krinke GJ, editor. *The Laboratory Rat*, New York: Academic Press; 2000. p. 145–176
205. Demir R, Yılmaz S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 9-10.
206. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of Histological Technics and Their Diagnostic Application*, Churchill Livingstone, Edingburg, 1994.
207. Potten CS. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer*. 1996; 74(11): 1743-8.
208. Demir S. Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon. 2010
209. Turan I. Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon. 2011

210. Mihara M, Uchiyama M, (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
211. Turkmen S, Mentese S, Mentese A, Uzun Sumer A, Saglam K, Yulug E, Turedi S, Gunduz A. The value of signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein 1 and oxidative stress parameters in the diagnosis of acute mesenteric ischemia. *Academic Emergency Medicine*. 2013; 20: 257-264.
212. Kwan P, Brodie JM. Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on? *Seizure*. 2000; 9(7): 464-468
213. Samren E B, van Duijn C M, Koch S, Hiilesmaa V K, Klepel H, Bardy A H. Maternal use of antiepileptic drugs and the risk of major congenital malformations: a joint European prospective study of human teratogenesis associated with maternal epilepsy. *Epilepsia*. 1997; 38 (9): 981-990
214. Wide K, Winbladh B, Källén B. Major malformations in infants exposed to antiepileptic drugs in utero, with emphasis on carbamazepine and valproic acid: a nation-wide, population-based register study. *Acta Paediatrica*. 2004; 93(2): 174-176.
215. Artama M, Auvinen A, Raudaskoski T, Isojärvi I, Isojärvi J. Antiepileptic drug use of women with epilepsy and congenital malformations in offspring. *Neurology*. 2005; 64(11): 1874-1878.
216. Cansu A, Ekinci Ö, Serdaroglu A, Gürgen S G, Ekinci Ö, Erdogan D, Tunc L. Effects of chronic treatment with valproate and oxcarbazepine on testicular development in rats. *Seizure*. 2011; 20(3): 203-207.
217. Walker RM, Smith GS, Barsoum NJ, Macallum GE. Preclinical toxicology of the anticonvulsant calcium valproate. *Toxicology*. 1990; 63: 137-155
218. Synder P J, Badura L L. Chronic administration of sodium valproic acid slows pubertal maturation in inbred DBA/2J mice: Skeletal, histological and endocrinological evidence. *Epilepsy Research*. 1995; 20: 203-211.
219. Roste L S, Tauboll E, Berner A, Berg KA, Aleksandersen M, Gjerstad L. Morphological changes in the testis after long-term valproate treatment in male Wistar rats. *Seizure*. 2001; 10(8): 559-565.
220. Tamber MS, Mountz JM. Advances in the diagnosis and treatment of epilepsy. In *Seminars in Nuclear Medicine*. 2012; 42(6): 371-386
221. Bykov IL, Mal T, Gurinovich VA, Nefedov LI. Biochemical basis of valproic acid toxicity: role of oxidative stress and effects of L-carnitine. *Biomed Khim*. 2004; 50: 384-389.

222. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003; 329: 23–38.
223. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res*. 2005; 579:200–224.
224. Turner T T, Lysiak J J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology*. 2008; 29(5): 488-498.
225. Kamen B. Folate and antifolate pharmacology. In *Seminars in Oncology*. 1997; 24(5): 18-30.
226. Rizk S M, Zaki HF, Mina MA. Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food and chemical toxicology*. 2014; 67: 176-186.
227. Bueno-Silva B, Alencar S M, Koo H, Ikegaki M, Silva GV, Napimog MH, Rosalen PL. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(19): 4546-4550.
228. Yousef M I, Salama A F. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47(6): 1168-1175.
229. Girish C, Shweta O, Raj V, Balakrishnan S, G'boy Varghese R. Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014; 58(4): 416-422
230. Hamza A A, Amin A. *Apium graveolens* modulates sodium valproate-induced reproductive toxicity in rats. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 2007; 307(4): 199-206.
231. Sakr SA, Zowail ME, Marzouk AM. Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on sodium valporate induced cytogenetic and testicular alterations in albino rats. *Anat Cell Biol*. 2014; 47(3): 171-179.
232. Schulpis KH, Lazaropoulou C, Regoutas S, Karikas GA, Margeli A, Tsakiris S, Papassotiriou I. Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative damage. *Toxicology*. 2006; 217(2): 228-232.
233. Shalaby MA, El Zorba HY, Ziada RM. Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48(11): 3221-3226.
234. Bhattacharjee A, Prasad SK, Pal S, Maji B, Syamal AK, Mukherjee S. Synergistic protective effect of folic acid and vitamin B12 against nicotine-

- induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic islets of the rat. *Pharmaceutical Biology*. 2016; 54(3): 433-444.
235. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Hindawi Publishing Corporation. 2013; 2013
236. Poljsak B, Milisav I. The neglected significance of “antioxidative stress”. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Hindawi Publishing Corporation. 2012; 2012
237. Verhaegen S, McGowan AJ, Brophy AR, Fernandes RS, Cotter TG. Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. *Biochemical Pharmacology*. 1995; 50(7): 1021-1029.
238. Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001; 20(5): 464-472.
239. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998; 392(6676): 559.
240. Gutiérrez-Pérez O, Durand-Montaña C, Rojas-Castañeda JC, Chavez-Saldaña M, Viguera-Villaseñor RM. Effect of pyrimethamine treatment on male rat testicular cell population development. *Andrology*. 2014; 2(5): 780-786.
241. Çilenk KT, Öztürk İ, Sönmez MF. Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Experimental and molecular pathology*. 2016; 101(2): 207-213.
242. Sönmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Ünalımsı S, Deligönül E, Öztürk İ, Kaymak E. Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 79: 44-51.
243. Yılmaz A, Elbey B, Yazgan ÜC, Dönder A, Arslan N, Arslan S, Aslanhan H. Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Fluoxetine-Induced Hepatotoxicity: An Experimental Study. *BioMed Research International*. 2016; 2016: 8