

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**AMİODARONUN SIÇAN TESTİSİ ÜZERİNE MORFOLOJİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ahmet Kağan ÖZKAYA

TRABZON - 2012

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**AMİODARONUN SIÇAN TESTİSİ ÜZERİNE MORFOLOJİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

**THE ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL EFFECTS OF AMIODARONE ON RAT
TESTIS**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ahmet Kağan ÖZKAYA

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Embiya DİLBER**

TRABZON - 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar, ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Amiodaron.....	2
2.1.1. Amiodaronun Yapısı	2
2.1.2. Farmakoloji	3
2.1.3. Endikasyonları.....	4
2.1.4. Etkinlik	5
2.1.5. İlaç Etkileşimleri	6
2.1.6. Hemodinamik ve Yan Etkileri	7
2.2. Testis	13
2.2.1. Testisin Yapısı.....	13
2.2.2. Spermatogonial Hücrelerin Kökeni.....	15
2.2.3. Spermatogonial Çoğalma ve Kök Hücre Yenilenmesi	16
2.2.4. Spermiyogenezis	16
2.3. Apoptozis	17
3. MATERYAL VE METOD	20
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
7. ÖZET	40
8. SUMMARY	41
9. KAYNAKLAR.....	42

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Gruplarda İmmunohistokimyasal Boyanma Bulguları.....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Amiodaronun Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2. Testisin Yapısı	15
Şekil 3. Spermatogenik Seri Hücreleri ve Destek ya da Sertoli Hücreleri	16
Şekil 4. Apoptotik Olayların Şematik Sunumu	18

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) gruplarında Testis Dokusunda Hematoksilen-Eozin Boyaması	26
Resim 2. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda Kaspaz-3 İmmunohistokimya Boyaması.....	28
Resim 3. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda Kaspaz-9 İmmunohistokimya Boyaması.....	29
Resim 4. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda p53 İmmunohistokimya Boyaması.....	31
Resim 5. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda Bax İmmunohistokimya Boyaması	32
Resim 6. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda TUNEL Yöntemi ile İnceleme	33

KISALTMALAR LİSTESİ

BOP : *BH3- Only Proteins* (BH3-Yalnız Proteinler)

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

HspA2: *Heat-shock protein A2* (Isı-şok protein A2)

SVT : Supraventriküler Taşikardi

T4 : Tiroksin

T3 : Triiodotironin

TSH : Tirotropin

VT : Ventriküler Taşikardi

VF : Ventriküler Fibrilasyon

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amiodaron güçlü bir antiaritmik ilaç olup genellikle diğer antiaritmik ilaçlarla kontrol altına alınamayan ventriküler ve supraventriküler taşikardilerin tedavisinde kullanılır (1). Yan etki spektrumunun geniş olması, klinikte kullanımını sınırlayan en önemli etkindir. Kontrolü zor olan aritmilerin tedavisinde kullanılması nedeniyle tedaviye genellikle uzun süre devam edilir (2). Yüksek iyot içeriği ve yapısal olarak tiroid hormonlarına benzerliği sebebiyle başta tiroid olmak üzere birçok organ ve sistem üzerine istenmeyen etkiler oluşturur (2). Amiodaron kullanan hastalarda ve hayvan çalışmalarında, özellikle tiroit, periferik sinir dokusu, kalp, karaciğer, akciğer ve göz üzerine olan histopatolojik etkileri kapsamlı olarak araştırılmıştır (3). Amiodaronun üreme sistemi üzerine olan etkileri sınırlı sayıda klinik ve deneysel çalışmalarda incelenmiştir (2, 3).

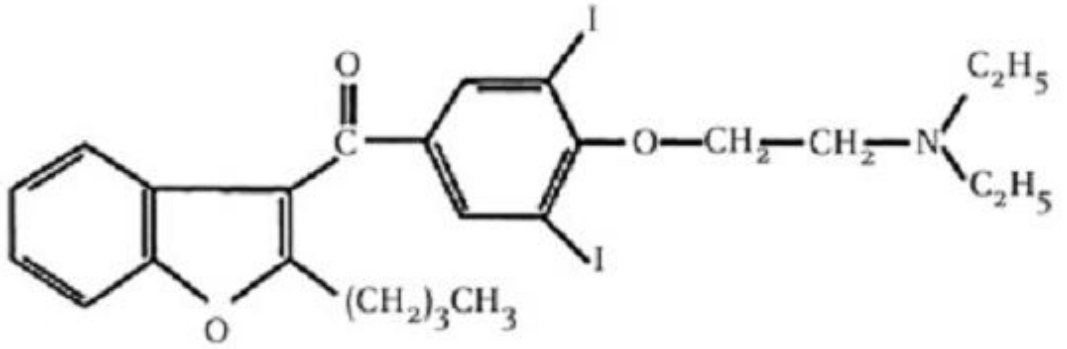
Bu çalışmada amiodaronun sıçan testisi üzerine morfolojik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede ilacın testis üzerine dolayısıyla üreme ve endokrin sistemdeki etkilerinin bilinmesine olanak sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amiodaron

2.1.1. Amiodaronun Yapısı

Amiodaron (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethyl amino)-ethoxy]-3-5-diiodophenyl ketone) diiyodinize benzofuran türevi (Şekil 1), güçlü antiaritmik bir ilaçtır. Başlangıçta vazodilatasyon özelliği nedeniyle antianginal bir ilaç olarak geliştirilmişse de antiaritmik etkisi belirgin olduğu saptanınca sıklıkla supraventriküler ve ventriküler taşikardilerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (1-3).



Şekil 1. Amiodaronun Kimyasal Yapısı

2.1.2. Farmakoloji

Farmakokinetik

Amiodaron bir benzofuran derivesi olup yapısal formülü tiroksin (T₄) ile yakın benzerlik gösterir (3). Molekül ağırlığının yaklaşık %37'si iyodinden oluşur. Ticari kullanımdaki formlarında sıklıkla solvent polisorbat-80 kullanılır ve bu solvent hipotansif yan etkiden sorumludur. Yine bu solventin kalp hızında azalma, atriyoventriküler nodal iletide gecikme, atriyal ve ventriküler refraktör periyotta uzama gibi etkileri vardır (4). Oldukça lipofilik olması nedeniyle dokuya geçişi güçlüdür ve geniş dağılım hacmine sahiptir. Oral ve intravenöz şekilde tedavide kullanılabilir ve oral alındıktan sonra emilimi (%30-70) sınırlıdır (3-5). İnsan vücudunda geniş bir dağılım hacmine sahip olması nedeniyle tedavi başlangıcında ilaç etkisinin başlaması geç olup eliminasyon yarı ömrü uzundur (5). Tedavi ağız yolu ile başlandığında, tedavi edici etkinin başlaması iki-üç haftaya kadar gecikebilir. Tedavi edici plazma düzeylerine erken ulaşılması için, ağız yolu ile tedavi başlanacaksa, tedavinin başlangıcında yüksek dozlar tercih edilir. Üç ile on gün sonrasında ilaç dozunun %50 azaltılması ve uzun süreli tedavinin bu şekilde devamı ile 13 ile 142 gün arasında değişen bir plazma yarılanma ömrüne sahiptir. İnfüzyon ile verildiğinde başta albümin olmak üzere, beta-lipoprotein ve alfa-1 asit glikoprotein gibi serum proteinlerine yüksek oranda bağlanır. Esas olarak p450 sitokrom oksidaz bağımlı oksidatif deetilasyon ile metabolize edilir (4). Ana metaboliti N-desethylamiodarone olup, ana molekül kadar aktif ve elektrofizyolojik etkileri benzerdir. Amiodarone gibi N-desethylamiodarone da uzun plazma yarılanma ömrüne sahiptir. İlacın glukronidasyon ve biliyer yolla atılım gibi başka metabolik yolları da bulunur. Damar yolu ile verildiğinde, dağılım kinetiği üç kompartman modeli ile açıklanan geniş bir dağılım alanı bulur (4). İnfüzyonu sırasında ilacın az bir bölümü plazmada bulunur. Yüksek konsantrasyonlardaki amiodaron ve ana metaboliti lenf nodu, karaciğer, akciğer ve yağ dokusu gibi dokularda depolanır. İnfüzyon süresi uzadıkça amiodarone ve ana metabolitin bu dokulardaki depolanması da artar. Bu dokulardaki depolanma, özellikle düşük dozlarda infüzyon ile tedaviye başlandığında, tedavi edici etkinliğin geç başlamasından sorumludur. Kas ve beyin gibi dokularda ise daha düşük miktarlarda depolanır. Tedavinin başlangıcında tedavi edici miyokardiyal ve plazma düzeylerinin erken başlaması için yüksek başlangıç infüzyon

dozları tercih edilir. Tedavinin kesilmesi sonrasında bu dokulardaki depolanmanın uzun süreli olarak yeniden plazmaya geçmesine bağlı olarak ilacın eliminasyon yarı ömrü uzundur. Amiodaron ve ana metabolitin tedavi edici plazma düzeyleri 0.5-2.5 µg/mL olup plazma düzeyi ile tedavi edici etki ve yan etki ilişkisi açık değildir. Eliminasyon biliyer sistem ile olup, böbrek yetmezliğinde doz ayarlaması gerekmez (4, 6-8). Amiodaron diyaliz ile vücuttan uzaklaştırılmaz.

Elektrofizyolojik Etkiler

Amiodaron grup III antiaritmik ilaç olmasına karşın grup I, II ve grup IV antiaritmik etkilere de sahiptir. Elektrofizyolojik etkileri kompleks olup bu etkilerin bir bölümü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Elektrofizyolojik etkiler, hızlı etki için ilacın damar yoluyla kullanımı ile uzun süreli ağızdan kullanımı arasında farklılıklar gösterir. Sodyum kanallarındaki blokaj etkisiyle (grup I antiaritmik etki) intraventriküler iletiyi ve kalp hızını yavaşlatır. Beta blokör (grup II antiaritmik etki) ve kalsiyum kanal blokör (grup IV antiaritmik etki) etkisiyle atriyoventriküler düğümde iletiyi geciktirir. Seçici olmayan hem alfa hemde beta blokör etki gösterir. Potasyum kanal blokör etkisiyle miyokardiyal repolarizasyonu uzatarak hücrelerin uyarılmaya karşı refrakter olmasını sağlar. Damar yolu ile uygulanması sırasında ortaya çıkan bu erken elektrofizyolojik etkiler, ağızdan uzun süreli kullanımı sırasında belirgin olmayabilir. Grup III antiaritmik ilaç olmasına rağmen damar yolu ile kullanımının erken dönemlerinde grup III etkileri belirgin değildir. Uzun süreli kullanımında potasyum kanal blokör etkileri önemli olup daha belirgin hale gelir. Uzun süreli kullanımda, kardiyak dokuların çoğunluğunda uyarılmaya karşı direnci artırır. Tiroksinin (T4) triiodotironine (T3) deiodinasyonunu inhibe edici etkisi de antiaritmik etkisine katkıda bulunur (5). Tedavi sırasında tiroit fonksiyonlarında beklenen değişim; tirotropin (TSH) seviyesinde normal veya hafif artış, T3 seviyesinde azalma, T4 ve reverse T3 seviyesinde artmadır (5, 9).

2.1.3. Endikasyonları

Amiodaron, diğer tedavilerin etkili olmadığı veya tolere edilemediği aritmilerin tedavisinde endikedir. Özellikle hemodinamik olarak kararsız durumun bulunduğu

ventriküler taşikardi (VT) ya da ventriküler fibrilasyon (VF) gibi hayatı tehdit eden tekrarlayan ventriküler aritmilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Atrial flutter ve atrial fibrilasyon gibi atrial aritmilerin tedavisinde de yaygın olarak kullanılır ve sonrasında sinüs ritminin devamını sağlamada birçok ilaca göre daha etkili olduğu bulunmuştur (1, 6, 10-12). Çocuklarda, konvansiyonel tedavilere dirençli olan veya hayatı tehdit eden taşiaritmilerin tedavisinde amiodaron etkin bir şekilde kullanılmaktadır (1-4, 6, 13-15).

Amiodaronun sinüs bradikardisi gibi istenmeyen etkisi olabileceğinden kalıcı kalp pili olan hastalarda daha güvenilir şekilde kullanılır. Kardiyak defibrilatör implantasyonu (ICD) yapılmış hastaların izleminde ikincil koruma olarak amiodaron kullanan hastaların yüzdesi %55-70 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (1, 6, 9, 11, 15-18).

Amiodaronun gebelikteki etkileri üzerine yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ancak plasental bariyeri geçerek maternal serum seviyesinin %10-25'ini oluşturacak şekilde fetal serum seviyesine ulaştığı bilinmektedir. Yeterli veri bulunmamakla birlikte, kalp yetmezliği ile ilişkili fetal taşikardilerde amiodaron etkili ve güvenli bir şekilde kullanılmaktadır (15). Hidrops varlığında fetal taşikardilerin ilaç ile tedavilerindeki başarı belirgin olarak azalır. Ancak amiodaronun gerek tek ilaç olarak gerekse diğer ilaçlar ile birlikte kullanımı ile yüksek oranlarda başarılar elde edilmiştir (15). Tedavi verilen anne ve fetuslarında amiodaron kullanımına bağlı yan etkiler ise nadirdir. Bu nedenle, hidropsu bulunan ve diğer antiaritmik tedaviler ile kontrol altına alınamayan fetal taşikardilerin tedavisinde amiodaron tercih edilmektedir.

2.1.4. Etkinlik

Amiodaronun atrial fibrilasyonlu hastalarda sinüs ritminin idamesinde diğer antiaritmik ilaçlara göre üstün bulunmuştur. Atriyal fibrilasyonda kullanılan diğer antiaritmik ilaçlar ile bir yıllık sürede ritim kontrolü sağlanması %50 ve daha düşük bulunurken amiodaron ile daha yüksek oranlarda ritim kontrolü sağlanmıştır. Karşılaştırmalı çalışmalarda, atriyal fibrilasyonda ritim kontrolü sağlanan hastalarda amiodaron tedavisinde bir yıllık izlemde başarı %60 iken sotalol tedavisinde bu oran %38 bulunmuştur (9). Amiodaron ile grup I antiaritmik ilaçlar karşılaştırıldığında ise, amiodaron ile atriyal fibrilasyonlu hastalarda bir yıl süresince vakaların %62'sinde ritim kontrolü sağlanırken bu oran grup I antiaritmik ilaçlarda %23 bulunmuştur (2). Kanada'da

yapılan benzer karşılaştırmalı çalışmalarda da, atriyal fibrilasyonlu hastalarda sinüs ritminin devam ettirilmesinde amiodaron, sotalol ve diğer antiaritmik ilaçlara göre daha başarılı bulunmuştur (19). Ektopik atriyal taşikardi ve multifokal atriyal taşikardiler nadir görülen ve kontrolü zor olan primer atriyal taşikardiler olup bu grup taşikardilerin tedavisinde amiodaron diğer antiaritmiklere göre daha başarılı bulunmuştur (6). Yine nodal taşikardiler çocukluk döneminde nadir ve kontrolü zor olan ritim bozukluklarından olup özellikle kardiyak operasyonlar sonrası oluşan bu grup taşikardilerde de amiodaron başarı ile kullanılmaktadır (6). Reentran döngülü supraventriküler taşikardiler çocukluk yaş grubunda en sık görülen taşikardiler olup genellikle diğer antiaritmik ilaçlar ile kontrolleri yapılabilmektedir. Kontrol altına alınamayan vakalarda amiodaron kullanılabilirlikle birlikte, uygun olan vakalarda kateter ablasyonu tercih edilmektedir. Özellikle yenidoğan dönemi ve küçük çocuklarda, diğer antiaritmik ilaçlarla kontrol alınamayan vakalarda, bu dönemde kateter ile ablasyonu riskli olabileceğinden amiodaronun uzun süreli kullanılması gerekebilmektedir (15, 20-22).

Çocukluk yaş grubunda hayatı tehdit eden ventriküler aritmiler nadiren görülmektedir. Ventriküler aritmi saptanan vakaların hemen tamamına yakınında altta yatan primer myokardiyal hastalık veya repolarizasyon bozuklukları bulunmaktadır.

Amiodaron, mortalite üzerine önemli etki yapmaksızın prematür ventriküler atımları ve azalmış sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonlu hastalarda non-sustained ventriküler taşikardi ataklarını baskılar (1, 6, 23).

Hastane dışında gelişen ventriküler fibrilasyonlarda amiodaronun intravenöz kullanımının etkinliği, randomize çift kör çalışmalarda amiodaronun plasebo ya da lidokain ile karşılaştırarak irdelenmiştir. Bu çalışmalarda amiodaron grubunda hastalar önemli oranda hastaneye ulaştırılmıştır (24, 25). İntravenöz amiodaron ayrıca resusitasyon sırasında lidokainin yerini almıştır (7, 25).

2.1.5. İlaç Etkileşimleri

Gerek damar yolu gerekse ağız yolu ile özellikle uzun süreli kullanıldığında fazla sayıdaki ilaç ile etkileşim gösterir. Amiodaron sitokrom p450 enzim sistemini inhibe eder. Bu yol ile metabolize edilen ilaçların serum düzeylerini artırır. Kinidin, prokainamid ve varfarin ile bu mekanizma üzerinden etkileşir (15). En önemli etkileşimi varfarin ile olur.

Birlikte kullanıldıklarında varfarin dozunun %25-50 azaltılması ve INR değerlerinin yakın takip edilmesi gerekir. Serum digoksin düzeylerindeki arttırıcı etkisi nedeniyle bu iki ilacın birlikte kullanıldığı durumlarda digoksin dozunun %50 kadar azaltılması ve digoksin düzeyinin yakın takibi gerekir (15). Etkileşim gösterdiği ve doz düzenlemesi gereken ilaçlardan birisi de teofilindir. Aritmi oluşturuvcu etkileri dikkate alınarak, özellikle QT mesafesini arttıracak diğer ilaçlarla birlikte kullanılmamasına dikkat edilmelidir. Bu nedenle amiodaronun, prokainamid ve lidokain gibi QT mesafesini uzatan grup I antiaritmik ilaçlarla kullanılması önerilmemektedir. Özellikle beta blokör ve kalsiyum kanal blokörü ilaçlarla birlikte kullanıldığında sinus nodunda belirgin baskılanma oluşturur. Barbitüratlar serum amiodaron düzeyinde azalma, simetidin ise artışa neden olur. Antibiyotikler, antifungal ilaçlar, antiepileptikler ve antihistaminikler gibi çocukluk döneminde sık olarak kullanılan diğer birçok ilaç da amiodaron ile etkileşim gösterir. Genel prensip olarak, amiodaron kullanmakta olan çocuklara başka bir ilaç başlanacaksa tedavi öncesinde bu ilaçların amiodaron ile etkileşimlerinin değerlendirilmesi uygun olacaktır (2, 15).

2.1.6. Hemodinamik ve Yan Etkileri

Hemodinamik Etkiler

Damar yolu ile kullanımında en belirgin hemodinamik etkisi arteriyel vazodilatasyon ve negatif inotropiye ikincil gelişen sistemik hipotansiyondur. Arteriyel vazodilatasyon etkisinden esas olarak, ilacın damar yolu ile verilen ticari formlarının hazırlanmasında kullanılan solvent polisorbata-80 sorumludur (4, 6, 11, 12, 16, 26). Çocuklarda, damar yolu ile verilen tedaviler sırasında %40'a varan sıklıklarda hipotansiyon rapor edilmiştir (15). Doz azaltılması veya kristalloid solüsyonları ile hipotansiyon kontrol altına alınabilir. Çocuklarda, tedavinin kesilmesini gerektirecek hipotansiyon nadiren gelişir. Sol ventrikül fonksiyonları normal olan hastalarda bile kan basıncı düşüklüğü sık görülür. İnfüzyon hızının azaltılması ile hipotansiyon kontrol altına alınabilir. Direkt olarak negatif inotropi oluşturuvcu etkisi zayıf olup genellikle geçicidir ve sıklıkla kardiyak debide azalma oluşturmaz. Öncesinde sol ventrikül sistolik fonksiyonlarında bozukluk olan hastalara damar yolu ile tedavi verilecekse yakın takipleri

gerekir. Az sayıda çalışmada, bu grup hastalarda belirgin bir hemodinamik bozulma rapor edilmemişse de, damar yolu ile tedavi sırasında hemodinamik kolaps rapor edilen vakalar mevcuttur (15).

Bradikardi oluşturuıcı etki özellikle diğer antiaritmik ilaçlarla birlikte kullanıldığında görülür. Amiodaron kullanımına bağlı QT mesafesinde uzama görülürse de buna bağlı belirgin aritmi görülmez. Ancak nadir de olsa ilaç kullanımına bağlı polimorfik ventriküler taşikardi (*torsade de pointes*) rapor edilmiştir. Polimorfik ventriküler taşikardi, sıklıkla ilacın uzun süre ve QT mesafesini uzatan diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığı durumlarda görülür. Yine hipokalemi, sol ventrikül sistolik fonksiyon bozukluğu ve bradikardi durumlarında ilaca bağlı polimorfik ventriküler taşikardi gelişebilir (2, 15).

Yan Etkiler

Amiodaron, yan etki profili geniş olan bir ilaçtır. En sık yan etkiler ciltte pigmentasyon değişikliği, fotosensitivite, hepatit, tiroit fonksiyonlarında bozulma, korneal depolanma, pulmoner fibrozis, kemik iliği baskılanmasıdır (15). Bu etkileşimler ilaç kullanımının devamına engel oluşturabilir. Yan etkiler sıklıkla ilacın kümülatif dozu ile ilişkili olmakla birlikte idiyosenkratik reaksiyonlar da rapor edilmiştir. Bu etkilerin çoğunluğu ilacın kesilmesi ile düzelirken bu etkilerde hızlı ilerleme ve ölüm de görülebilir. Ciddi ilaç toksisitesi ile ilgili çocukluk döneminde az sayıda rapor bulunmakta olup çocuklarda daha güvenli bir ilaç olduğu düşünölmektedir (15). Yan etkilerin daha az rapor edilmesi, ilacın çocukluk döneminde nispeten daha kısa sürelerde kullanılmasına ve kümülatif dozun az olmasına bağlanabilir. Görölen yan etkilerin çoğunluğu tedavi dozlarında bir değişiklik yapılmadan kendiliğinden düzelir. Çocukluk döneminde görölen yan etkilerin %20'sinden daha azında amiodaron tedavisinin kesilmesi gerekir. Kullanıldığı ilk yılda yan etki prevalansı %15 iken uzun süreli kullanıldığında %50' ye kadar çıkan bir ilaçtır. Yaklaşık olarak hastaların %20-50' si yan etkileri nedeniyle ilacı bırakmak zorunda kalır (2, 3, 6, 27). Amiodaronun yan etkileri ile ilgili olarak yapılan birçok hayvan çalışmasında tiroit bezi, karaciğer, akciğer, sinir dokusu üzerine etkiler ortaya konmuştur. Bu çalışmaların birçoğunda amiodaronun hücre organizasyonunda değişiklikler, nekroz ve apoptoz, inklüzyon cisimcikleri oluşumu, lipofuksin birikimi,

endoplazmik retikulumda dilatasyon, hücrede ve hücre organellerinde fosfolipid birikimi gibi morfolojik etkileri irdelenmiştir (28-30).

Tiroit

Bir benzofuran derivesi olan amiodaron tiroit hormonlarından tiroksinin yapısal analogudur (3, 15). Molekül ağırlığının %37'si iyodinden oluşur. Vücuda alınan molekülün, bir günde yaklaşık %10'u deiyodine olarak idame tedavi alan bir erişkinde günlük yaklaşık 7-12 mg iyodin serbestleştirilir. Bu miktar, normal iyodin alan bir erişkinin günlük aldığı miktarın 50-100 katı kadardır. Postmortem çalışmalarda, ötiroid kişilerde amiodaron ve metaboliti desetilamiodaronun tiroit dokusundaki konsantrasyonu sırası ile 14 mg/kg ve 64 mg/kg bulunmuştur (3, 31). Amiodaron başta karaciğer olmak üzere dokularda, 5'-deiyodinaz aktivitesini inhibe ederek tiroksinden triiodotironin oluşumunu engeller. Bu etki ilaç tedavisinin kesilmesinden sonra aylarca devam edebilir. Amiodaron ayrıca tiroit hormonlarının dokulara girişini de inhibe eder. Bu iki mekanizma ile uzun süreli ilaç kullanımında, serum tiroksin konsantrasyonu artarken, triiodotironin konsantrasyonu azalır. Bu etkiler ile genellikle tiroksin düzeyi normalin üst sınırında, triiodotironin düzeyi de normalin alt sınırında bulunur. Tedavi başlangıcında yüksek dozlarda amiodaron kullanıldığında TSH düzeyinde geçici bir artış gözlenebilir. Bu değişim genellikle tiroit hormonları üzerine olan etkisine ikincil gelişir. Ancak amiodaron direkt olarak TSH salınımını da etkileyebilir. Deneysel çalışmalarda amiodaron ve desetilamiodaronun tiroit dokusu üzerine sitotoksik etkileri de rapor edilmiştir (3, 25, 32). Hayvan çalışmalarında tedaviye ikincil, tiroit dokusunda apopitoz, nekroz, inklüzyon cisimcikleri, makrofaj infiltrasyonu ve endoplazmik retikulumlarda dilatasyon gösterilmiştir (3, 33). Tedavi sırasında benzer değişiklikler karaciğer, kalp, deri, kornea, periferik sinir hücreleri ve lökositlerde de gösterilmiştir (3).

Amiodaron tedavisi alanların çoğunluğu tedavi süresince ötiroid kalmaları ile birlikte az bir kısmında hipotiroidi veya hipertiroidi gelişebilir. Tedaviye bağlı, hipotiroidi daha çok iyodin alımının düşük olduğu coğrafi bölgelerde görülürken tirotoksikoz sıklıkla iyodin alımının yeterli olduğu coğrafi bölgelerde görülür (3, 16). Tedaviye ikincil tirotoksikoz, iyodin alımının yeterli olduğu bölgelerde %2 sıklığında iken, iyodin alımının

yetersiz olduğu bölgelerde %10 sıklığında rapor edilmiştir (3, 34). Aynı bölgelerde tedaviye ikincil hipotiroidi sıklığı ise sırası ile %5 ve %22 bulunmuştur.

Amiodaron kullanımına bağlı tirotoksikoz, tedavinin başlangıcında veya uzun süreli tedavi sonrasında genellikle hızlı gelişir (3, 35). İlacın dokuda uzun süreli depolanması nedeniyle tedavinin kesilmesinden sonra da gelişebilir. Tirotoksikoz önceden tahmin edilemez ve genellikle günlük alınan doz miktarı veya kümülatif doz ile ilişkili değildir. Tedavi öncesinde normal olan veya olmayan tiroit dokusunda gelişebilir. Patogeneizde düşünülen muhtemel mekanizmalar, amiodaron tedavisi ile alınan yüksek iyodin miktarına bağlı artmış hormon sentezi ve ilacın tiroit dokusunda oluşturduğu hasara bağlı artmış hormon salınımıdır (3). Amiodaronun antiadrenerjik etkisinden ve tiroksinin triiodotironine dönüşüm yetersizliğinden dolayı tirotoksikoza ait belirtiler bulunmayabilir. Tirotoksikozun ilk belirtisi genellikle ritim anormallikleri ve anjina gibi altta yatan kardiyak sorunun kontrolünün bozulmasıdır. Tedavi sırasında bu sorunlarla karşılaşılması durumunda tiroit fonksiyonlarının kontrolü uygun olur. Genellikle hayatı tehdit eden ritim sorunlarının diğer antiaritmik ilaçlarla kontrol altına alınmadığı durumlarda amiodaron tedavisi başlandığından tirotoksikoz gelişen hastalarda ilacın kesilmesi sıklıkla mümkün olmamaktadır. Ancak uygun olan vakalarda ilaç tedavisi değişikliğinin düşünülmesi uygun olur. Amiodaron kullanımı sırasında tirotoksikoz geliştiğinde, tiroit dokusunda yüksek konsantrasyonda iyodin bulunması thionamid grubu ilaçların etkinliğini azaltır. Yüksek dozlarda metimazol veya propiltiourasil kullanılması gerekebilir. Tedavide ayrıca, iyodinin tiroit dokusuna geçişinin engellenmesi amaçlanabilir. Bazı hastalarda, bu iki tedavi seçeneğinin birlikte kullanımı başarı sağlayabilir. Bu iki tedavi seçeneği, amiodaronun tiroit dokusunda oluşturduğu hasar sonucu oluşan artmış hormon salınımı durumunda etkili değildir. Bu grup hastalarda steroid tedavisi ile başarılı sonuçlar alınabilir. Tedaviye dirençli vakalarda tiroidektomi düşünülebilir (3). Plazmaferez, artmış tiroit hormonlarının azalmasını sağlarsa da bu genellikle geçici bir çözüm olup tirotoksikoz tablosunda alevlenmelere neden olur.

Amiodaron kullanımına ikincil hipotiroidi iyodin yetersizliği olan bölgelerde daha sık görülür (3). Genellikle amiodaron kullanımına bağlı tirotoksikozdan daha erken gelişir. Özellikle dolaşımda tiroit antikorları bulunan bayanlar ilaca ikincil hipotiroidi gelişimine daha duyarlıdır. Altta yatan, kliniğe yansımamış bir hormonogenez bozukluğu varlığında iyodinin tiroit hormon sentezi üzerine olan inhibitör etkisi ile (akut Wolff-

Chaikoff etkisinden kaçamama) hipotiroidi gelişimi açıklanmaktadır (3, 36). Amiodaron kullanımına ikincil gelişen hipotiroidi kendiliğinden düzelebilir. İlaça ikincil gelişen hipotiroidinin tedavisi, hipertiroidi kadar sorun oluşturmaz. Amiodaron tedavisi kesilemeyecekse tiroit hormon tedavisi başlanır. Amiodaron kullanımına ikincil gelişecek hipotiroidi tedavisinde tiroksin tercih edilir. Amiodaron ile birlikte kullanıldığında, amiodaronun tiroit hormon dönüşümünü inhibe edici etkisinden dolayı, TSH düzeyinin normalleşmesi için genellikle yüksek dozlarda tiroksin verilmesi gerekir (3). Takipte en önemli parametre TSH düzeyidir. Amiodaron tedavisi kesilebilirse, özellikle altta yatan tiroit hormonal bozukluğu bulunmayanlarda, hipotiroidi sıklıkla kendiliğinden düzelir (3, 37, 38).

Akciğer

Amiodaron kullanımına bağlı oluşan pulmoner toksisite geriye dönüşümsüz ve fatal olabilen yan etkilerdendir (15, 39). Görülme sıklığı %5 ile %13 arasında değişir (39). Pulmoner toksisite gelişimini etkileyen potansiyel risk faktörleri ilacın yüksek günlük dozu, kümülatif dozu ve hasta yaşının büyüklüğüdür. Amiodarona bağlı akciğer toksisitesi, çocuklarda son derece nadir görülür. Altta yatan akciğer hastalığı bulunmasının da risk oluşturabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, ilaç tedavisinin başlangıcından yıllar sonra pulmoner toksisite gelişebileceği gibi, tedavinin henüz başlangıcında da gelişebilir. Amiodaron kullanımına bağlı oluşan pulmoner toksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Hücrelere ilacın direkt toksik etkisi ve indirekt immünolojik reaksiyonların önemli olduğu düşünülmektedir. Amiodaron ve ana metaboliti desetilamiodaron, akciğer dokusunda serumdakine göre 100 ile 500 kat daha fazla depolanır. Özellikle tip II pnömositlerdeki bu yüksek depolanma, tedavi edici plazma düzeylerinde bile hücrelere toksik etki gösterir. Dokulardan amiodaron klerensi yavaş olup tedavinin kesilmesinden bir yıl sonra bile akciğer dokusunda bulunur. Amiodarona bağlı pulmoner toksisite, ilacın akciğerde bu yüksek birikimine bağlı olabilir. Doku hasarıyla oluşan kronik inflamasyon pulmoner fibrozise neden olabilir. Özellikle hayvan çalışmalarında, amiodaron kullanımına bağlı pulmoner interstisyum ve bronkoalveoler lavaj sıvısında, hipersensitivite pnömonisine benzer nötrofil ve lenfositik infiltrasyonun gelişmesi, immünolojik reaksiyonların da pulmoner toksisitede önemli olduğunu

düşündürmektedir (39, 40). Amiodaron kullanımına bağlı farklı pulmoner hastalıklar gelişebilir. En sık görülen patolojiler organize pnömoni, akut respiratuvar distres sendromu ve soliter pulmoner kitledir (39). Hastalar kliniğe uzun süreli dispne, halsizlik, kuru öksürük ve göğüs ağrısı gibi belirtilerle gelebilirler. Plevral effüzyon gelişebilir. Alveoler ve interstisiyel alanlarda etkilenim görülebilir. Patolojik olarak kronik interstisiyel pnömoni ve intraalveoler köpüksü makrofaj infiltrasyonu görülür. Pulmoner toksisiteden şüphelenilen vakalarda başta solunum fonksiyon testleri ve bronkoalveoler lavaj olmak üzere ayrıntılı araştırmalar yapılmalıdır. Amiodaron kullanımına bağlı pulmoner toksisite geliştiğinde ilaç kesilmelidir. Prognoz genellikle iyidir (27-29, 39).

Deri

Çocuklarda ilacın kullanımı ile en sık görülen yan etkiler ciltte pigmentasyon değişikliği ve fotosensitivitedir. Hastaların yaklaşık olarak yarısında fotosensitivite görülmektedir. Genellikle büyük çocuklarda görülür. Güneşe karşı hassasiyet artar ve değişik düzeylerde güneş yanıkları oluşur. Kronik olarak amiodaron alan hastalarda cilt eritematöz bir görünüm alabilir. Uzun süreli yüksek doz kullanan hastaların yaklaşık olarak %1-2'sinde, özellikle yüz cildinde lipofuksin birikmesine bağlı olarak gri-mavi renk değişikliği oluşur. Cilt ile ilgili oluşan istenmeyen etkiler güneşten koruyucu kremlerin kullanılması ile genellikle kontrol altına alınır ve ilaç kesilmesi gerekmez. Alopesi ise nadir görülen bir yan etkidir (2, 5, 27, 32, 41).

Göz

Hemen hemen hastaların tümünde korneada mikrodepositler birikir ve bu durum çoğunlukla ilacın kesilmesini gerektirmez. Bu depolanmalar, amiodaronun lakrimal sıvıya salınması ve özellikle korneal bölgenin alt kısmında birikmesi sonucu oluşur. Bu tablo dozdan bağımsız bir durumdur, normal ilaç depolanmasıdır ve ilaç kesildikten sonra düzelir. Özellikle karanlıkta hastaların halo şeklinde görüntüler gördüklerini dile getirdiklerinde ilacın değiştirilmesi veya dozunun azaltılması gerekmektedir. Optik nörit son derece nadir olarak görülür, özellikle tedavinin ilk 12 ayı içinde başlar ve optik nöritli olgularda amiodaronun kesilmesi gerekmektedir (1, 2, 6, 27, 34).

Diğer Yan Etkiler

Özellikle amiodaronu yüksek doz alan ve yaşlı hastalarda, nörolojik yan etkiler %30' lara varan oranlarda görülebilmektedir. En sık olarak gözlemlenen durumlar tremor, ataksi, periferik nöropati, yorgunluk, uyku bozuklukları, baş dönmesi ve baş ağrısıdır (27, 42-45). Bu durumlarda genellikle ilacın dozunun azaltılması yeterli olmaktadır, nadiren ilacın kesilmesi gerekmektedir (39, 46). Gastrointestinal yan etkiler genellikle tedavinin başlangıcında oluşur. Özellikle artmış aminotransferazlar ve alkalin fosfataz konsantrasyonları, karaciğer fonksiyon testlerindeki anormallikler, hastaların %4-25'inde oluşmaktadır (27, 33, 47, 48).

Epididimit ve erektil disfonksiyon son derece nadir olarak görülmektedir. Amiodarona bağlı epididimit gelişen, literatürde yaklaşık olarak 20 olgu bulunmaktadır ve ilacın dozunun azaltılması veya kesilmesi ile düzelme sağlanmaktadır (49, 50). Yetişkinlerde uzun süreli amiodaron kullanımına bağlı olarak serum Folikül Uyarıcı Hormon, serum Luteinizan Hormon düzeylerinde artış, hastalarda libidoda ve seksüel fonksiyonlarda azalma gibi etkilerin olduğu görülmüştür. Bu etkilerin amiodaronun yanı sıra, ileri yaşın, kronik hastalığın ağırlığı, hipotalamus-hipofizer aksın diğer nedenlerle değişmesi, tiroit disfonksiyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir (51). Diğer doku ve organlarda amiodaronun etkileri araştırılmasına rağmen sınırlı sayıda çalışmada üreme sistemi üzerine etkileri araştırılmış ancak hayvan modeli çalışmada testis üzerine etkileri histopatolojik açıdan incelenmemiştir.

2.2. Testis

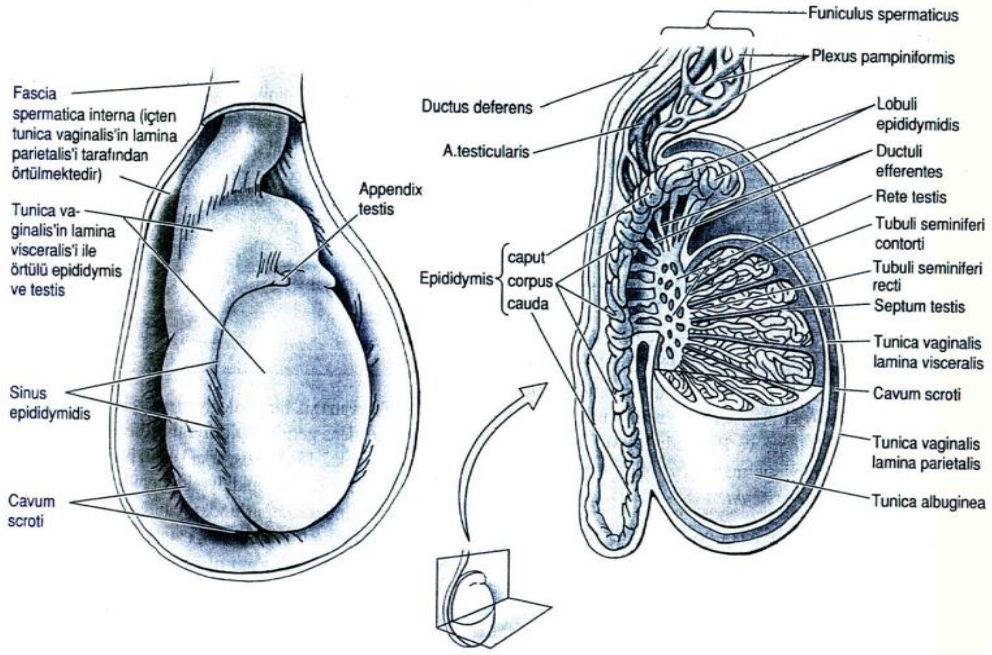
2.2.1. Testisin Yapısı

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar yardımcı bezler ve penisten oluşur. Testisler, erkek üreme sisteminin esas fonksiyonel organlarıdır. Skrotum içinde funikulus spermatikusa asılı dururlar ve gametogenezis, spermatogenezis ve steroidogenezisten sorumludurlar. Testisler, skrotumun içinde vücudun dışında yer alması nedeniyle vücut sıcaklığına göre daha düşük sıcaklıkta bulunurlar ve bu durum spermatogenezis için gereklidir (52, 53).

Skrotum içinde testisler sırasıyla en dıştan içe doğru deri, tunika dartosa, fascia spermatika eksterna, fascia kremasterika, fascia spermatika interna ve tunica vaginalis testis ile sarılıdır. Tunica vaginalis testisin hemen altında tunica albuginea yer alır ve mediastinum testis aracılığı ile testis içine septum testis denilen uzantılar ışınal olarak uzanır (Şekil 2). Mediastinum testisten organ içine giren ince fibröz bölmeler, testisi piramit şeklinde 250-300 lobcuğa (lobuli testis) ayırır. Her lopçuğun içinde tubulus seminiferus kontortus (seminifer tubuller) denen tubuller ve interstisyum bulunur. İntersitisyum kan ve lenf damarlarından zengindir. Seminifer tubuller, testislerin arka yüzü boyunca uzanan, spermiyumların ileri doğru hareket etme özelliklerini kazandıkları 4-6 metre uzunluğunda oldukça kıvrımlı bir kanaldır ve tubulleri kan damarları ile düz kas hücrelerinden zengin sıkı bağ dokusu sarar. Tubuller, silindirik silyalı epitelle örtülüdür ve başlangıçta kör uçludur, sonlanırken lümen daralır ve tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tubuller seminifer tubullerin rete testis denilen, epitelyum ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır. Duktus epididimis, duktuli efferentislerin devamı şeklindedir ve çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile beraber epididimisi oluşturur. Epididimis, baş (caput), gövde (corpus) ve kuyruk (cauda) olarak üç esas bölümden oluşmuştur. Kuyruk duktus (vas) deferens ile devam eder. Duktus deferens de üretraya açılır. Duktus epididimis ve duktus deferens yuvarlak bazal hücreler ve silindirik hücrelerden oluşan yalancı çok katlı epitelyum ile döşelidir (52-54).

Testis ve epididimis, aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Testis ve epididimisin venleri, önce funiculus spermaticusu saran bir ağ şeklinde pleksus pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena testikularisi oluştururlar. Bunlar da sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya açılır (57, 60, 61).

Testisin intersitisyumunda çeşitli hücre tipleri vardır. Bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağdoku hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar, myoid hücreler ve Leydig hücreleri bulunur (Şekil 3). Leydig hücreleri, puberte sırasında sekonder seks karakterlerini belirleyen testosteron hormonunu üretip salgılayan hücreleridir (60).



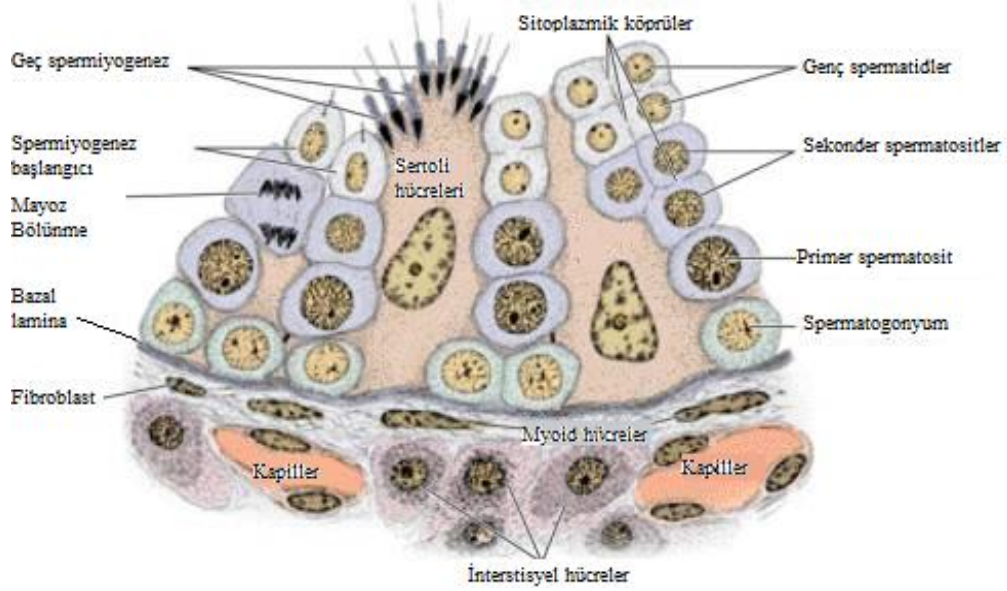
Şekil 2. Testisin Yapısı

Testisin parankimini oluşturan seminifer tubuller kör uçlarla başlayan kıvrımlanmış, 150-300 μm çapında kanalcıklardır. Seminifer tubuller fibröz bağdoku kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve germinal epitelyumdan oluşur. Aynı zamanda Sertoli hücreleri diye adlandırılan destek hücrelerine de sahiptirler. Sertoli hücreleri, seminifer tubul epiteli içerisinde iki daimi (bazal ve adluminal) bir geçici (ara) kompartman şekillendirir. Bazal kompartmanda spermatogoniumlar ve mayozun erken fazındaki spermatozoidler bulunur. Bazolateral yüzeylerde Sertoli hücreleri arasında tight junctionlar ve zonula okludens, bazalden adluminal kompartmanı sınırlandırır. Bu yapıya kan-testis bariyeri adı verilir ve bu yapıyla sınırlı miktarda molekül germ hücrelerine ulaşır (58).

2.2.2. Spermatogonial Hücrelerin Kökeni

Primordial germ hücreleri ve Sertoli hücreleri birlikte seminifer kord olarak adlandırılan bir hücre dizisini oluştururlar. Gelişim süresince bu hücre dizileri bir lümen şekillendirir ve böylelikle seminifer kord oluşur. Seminifer kord içerisinde mevcut olan germ hücreleri morfolojik olarak primordial germ hücrelerinden farklıdır ve gonositler olarak adlandırılırlar. Gonositler birkaç gün çoğalırlar ve sonra hücre siklusunun G_0/G_1

fazında tutulurlar. Doğumdan çok kısa bir süre sonra gonositler spermatogonium A'yı oluşturmak için yeniden çoğalmaya (spermatogenezis) başlar.



Şekil 3. Spermatogenez Seri Hücreleri ve Destek ya da Sertoli Hücreleri

2.2.3. Spermatogonial Çoğalma ve Kök Hücre Yenilenmesi

Spermatogonyum, çekirdeklerinde heterokromatin içermeyen önce spermatogonyum A ve bol miktarda heterokromatine sahip spermatogonyum B olmak üzere ikiye ayrılır. Farklılaşma fazının sonunda en olgun spermatogonyum genç primer spermatositleri oluşturmak için bölünür. Mayoz sürecinin sonunda haploid yapıdaki çok sayıda spermatidler meydana gelir (52).

2.2.4. Spermiyogenezis

Spermatidler, Sertoli hücreleri arasındaki kompartmanların lümenine yakın bölümünde yer alan yuvarlak hücrelerdir ve bunlar erken evre spermatidleri olarak adlandırılırlar. Daha sonra Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu yapısal değişiklikler:

- 1) Akrozom oluşumu,
- 2) Flagellum şekillenmesi,

- 3) Kromatin kondensasyonu,
- 4) Fazla sitoplazmanın atılmasıdır.

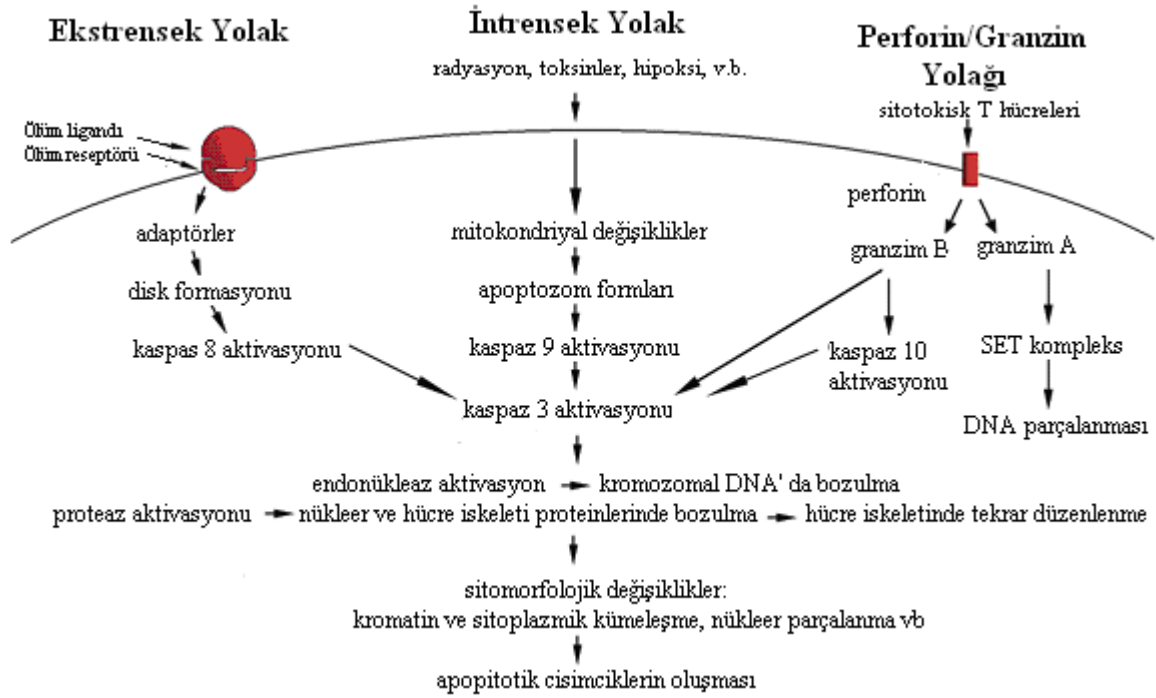
Spermatidin bu yapısal değişiklikleri geçirdiği dönem olgun spermatid evresi (spermatozoon) olarak bilinir (53).

2.3. Apoptozis

Hücre strese karşı, çevresel faktörler ve etki eden uyarıya göre çeşitli şekillerde adaptasyon, proliferasyon, diferansiyasyon, dejenerasyon veya ölüm şeklinde cevap verebilir. Temel olarak hücre ölümü nekroz ve apoptozis şeklinde gerçekleşir. Apoptozis birçok fizyolojik ve patolojik olayda yer alan, hücre ve dokunun kararlı durumunun sağlanması için gerekli programlanmış hücre ölümüdür (55).

Apoptozisin mekanizması oldukça karışıktır ve bir takım moleküler olayların enerji bağımlı kaskadını içerir. Araştırmalar iki ana apoptotik yolağın olduğunu ortaya koymuştur. Bu iki ana yolak aynı zamanda birbirini ile ilişkilidir ve burada yer alan moleküller bir yolağı etkilerken diğer yolağı da etkileyebilmektedir. Yolaklardan biri ekstrinsek veya ölüm reseptörleri yolu, diğeri intrinsek veya mitokondriyal yolaktır (Şekil 4). Ayrıca T hücre aracılı sitotoksite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren başka bir yolak da bulunmaktadır. Ekstrinsek, intrinsek ve perforin-granzim yolağı aynı noktada birleşirler ve kaspaz-3' ün aktivasyonu başlatılır. Bunu DNA fragmentasyonu, nükleer proteinler ve hücre iskeletinin bozulması, fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması, proteinlerin çapraz yer değiştirmesi, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücrelerin reseptörleri için ligandların eksprese edilmesi ve son olarak da fagositik hücrelerce ortadan kaldırılması izler. Kaspazlar, tüm vertebralıların hücrelerinde apoptozisin hem başlangıç hem de final aşamalarında yer alan hücre içi sistein proteazları kapsar. Bu süreçte yer alan 11 kaspaz molekülü bulunmaktadır ve kaspazlar kaskad şeklinde aktive olmaktadır. Kaspaz-8 ekstrinsek, kaspaz-9 intrinsek yolakda aktive olup kaskadda yer almaktadır. Kaspaz-3 gibi efektör kaspazlar da başlatıcı kaspazların etkisiyle etkin hale geçmektedir. T hücre aracılı sitotoksite ve perforin-granzim bağımlı yolak da hem kaspazlardan bağımsız olarak hem de kaspazlara bağımlı bir yolla hücre ölümüne neden olmaktadır (55, 56).

Bcl-2 ailesine ait proteinler apoptozisde düzenleyici anahtar rol oynamaktadır ve ana görevi, mitokondriyal geçirgenliği, organellerden apoptotik proteinlerin mitokondriye geçişini kontrol etmektir. Bcl-2 ailesi proteinleri yapısına ve apoptozisdeki rolüne göre üç grupta incelenir; anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik proteinler ve BH3-only proteinler (BOP). Bax, pro-apoptotik proteinlerden birisidir ve Bcl-2 ile beraber, p53 tumor supresör geni ile ekspresyonu düzenlenmektedir. p53 tumor supresör geni hücre siklusunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. İnsan kanser olgularının yarısından fazlasında p53 geninde mutasyon saptanmıştır ve bu nedenden dolayı p53, tümör oluşumunda kritik role sahiptir. p53, DNA hasarı olduğunda, DNA onarım proteinlerini aktive edebilir, hücre siklusunu G₁/S aşamasında durdurabilir ve eğer DNA hasarı onarılamayacak ise apoptozis başlatmasına aracılık eder (55-57).



Şekil 4. Apoptotik Olayların Şematik Sunumu

Apoptozis testislerde spermatogonia, spermatositler ve spermatidlerde yaygın olarak araştırılmış ve birçok apoptotik faktör tanımlanmıştır (57). Spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu durum, spermatozoon oluşumunda kritik rol oynar. Sonuçta spermatozoon potansiyel sayısı tahminen %75'i kadar azalır. Testiküler germ hücre apoptozisi, fizyolojik ve

devamlı olarak hayat boyu meydana gelir. Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktır (57, 58). Bu sayede insan üreme havuzundan defektli germ hücrelerinin eliminasyonu gerçekleştireceği görüşü ortaya çıkmıştır. Sakkas ve arkadaşları (60) 1999'da apoptotik eliminasyon hatası sonucu ejakulattaki spermatozoonda görünen apoptozisi 'abortif apoptozis' olarak tanımlamıştır ve bu hücrelerin bir şekilde apoptozisten kaçtığını öne sürmüştür. Apoptozis çeşitli patolojilerin ve spermatogenez kontrol sistemlerinin kaldırılmasının sonucu olabilir. Yapılan bir çalışmada DNA hasarı ve muhtemel DNA tamirinin azalan seviyeleri karşısında apoptozisin, hatalı genetik bilginin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür (61). Spermatozoon apoptozisi ve spermatozoon DNA'sında hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptozis ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur. p53, p21, CD 95, kaspaz-3, kaspaz 1-8, Bcl-2, Bcl-xl ve Fas düzeyleriyle, germ hücrelerinde değişik yollarla saptanabilmektedir (60, 62, 63). Spermatogenez ve apoptoz ile ilgili bir çalışmada antiapoptotik fonksiyon sergileyen ve spermatozoon matürite işareti olarak kabul edilen Isı-şok protein A2 (HspA2) adlı protein ve erkek fertilitesi irdelenmiştir. HspA2 bir spermatozoon matürite işareti Hsp70 şaperon protein ailesinin üyesi olan testis spesifik proteindir. Hsp70'in apoptoziste çalışma mekanizması, apoptotik enzimler olan kaspaz-3 ve kaspaz-9'un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HspA2, apoptotik sürecin olası inhibitörüdür (64, 65).

3. MATERYAL VE METOD

Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İmmunohistokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın materyalini 2.5 aylık, puberte dönemindeki 350±50 gram, 21 adet Spraque Dawney albino soyu erkek sıçanlar oluşturdu. Bu hayvanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden aynı doğum tarihli farelerin doğumlarından cinsiyet ayrımı yapılarak elde edilmiştir. Hayvanlar ad libitum, pelet şeklindeki standart sıçan yemi ile beslendiler. İçme suyunu serbest olarak tükettiler. On iki saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodunda tutuldular. Klima ile buldukları oda sıcaklığı 21–23° C, nem ise %50–70 oranında sabitlendi. Sıçanların canlı ağırlıkları deneyin başında, bir haftanın ve deneyin sonunda tartıldı.

Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylandı (Karar No: 17.01.2012/1).

Deney Planı

Sıçanlar kontrol, düşük doz, yüksek doz olmak üzere yedişer fareden oluşan üç gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara amiodaron yerine içme suyu, günde iki defa olmak üzere, ikinci gruba, oral gavaj ile düşük doz amiodaron (20 mg/kg/g), üçüncü gruba ise yüksek doz amiodaron (200 mg/kg/g) 14 gün boyunca verildi. Amiodaron (Cordarone®) distile su içerisinde çözdürülüp, oral gavaj ile uygulandı.

Hayvanların Canlı Ağırlıkların Ölçümü, Testislerin Alınması, Ağırlıklarının Ölçülmesi, Tespit ve Takip

Üç gruptaki deney hayvanlarına deneyin başlangıcında ağırlıkları tartıldı ve amiodaron alacak sıçanların ilaç dozları ayarlandı. Bir haftanın sonunda ağırlık değişimi olabileceğinden tüm sıçanlar tekrar tartıldı ve ilaç dozları tekrar ayarlandı. Çalışmanın sonunda sıçanların anestezi (ketamin 0.1 mg/kg intraperitoneal) altında karın boşluğu açıldı, her iki testis ingiunal kanaldan alınıp çekildikten sonra intrakardiyak kansızlaştırma ile ötenazi sağlandı. Sıçanların testis ve epididimisleri, hassas terazide tartıldıktan sonra 24 saat süre ile Bouin tespitine konuldu. Gonadosomatik indeks yüzdesi, $GSI\% = \frac{\text{Testis ağırlığı}}{\text{vücut ağırlığı}} \times 100$, şeklinde hesaplandı. Rutin doku takibi uygulandı ve parafin bloklara gömüldü. Ayrıca, çalışmada yer alan sıçanların testis dokularının bir kısmı elektron mikroskopi incelemeleri için saklanmıştır.

Histolojik İnceleme

Hematoksilen-Eozin Boyaması

Bouin fiksatifinden çıkarılan testis dokuları rutin doku takip protokolüne uygun olarak, ethanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilende şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Mikrotom ile alınan 5µ'luk kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı. Preparatlar, bağımsız bir araştırmacı tarafından değerlendirildi ve preparatların fotoğrafları Olympus CX31 ışık mikroskopunda (Olympus, Tokyo, Japan) çekildi.

Histokimyasal Yöntem

Bouin fiksatifinden çıkarılan testis dokuları rutin doku takip protokolüne uygun olarak, ethanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilende şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Mikrotom ile alınan 5µ'luk kesitlere immunohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri uygulandı. Fotoğrafları Olympus CX31 ışık mikroskobunda (Olympus, Tokyo, Japan) çekildi.

İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimya için kesitler ksilende deparafinize edildi ve ethanol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Antijenik bölgelerini açığa çıkarabilmek için 37°C’ de 15 dakika Tris buffer (Distile suda çözünmüş 50 mM Tris base ve 150 mM NaCl) içindeki %2 tripsin (Sigma-Adrich) de bekletildi. Kesitler endojenöz peroksidaz aktivitesini baskılayabilmek için %3’lük H₂O₂ de 15 dakika inkübe edildikten sonra non-immun serum bloking solusyonda (İnvitrogen, CA, USA) 10 dakika bekletildi. Ardından kesitler humid chamberda bir saat primer antikör karşıtlarında: Kaspaz-3 (rabbit polyclonal, Labvision, USA), kaspaz-9 (rabbit poliklonal antibody, Labvision, USA), p53 (Mouse monoklonal antibody, Labvision), Bax (Mouse monoklonal antibody, Labvision) ile inkübe edildi. Bütün antikörler 1:100 dilüe edildi. Ardından kesitlere biotinlated sekonder antikoru ve streptavidin konjuge horse radish peroksidaz 20 dk uygulandı (85-9043, Invitrogen, CA, USA). Son olarak 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC, ASS-060, Spring, CA, USA) 3-5 dk uygulandı, nükleuslar artalan boyaması için Mayer’s hematoksilen ile boyandı ve Mounting medium (DMM-060, Spring, CA, USA) ile kapatıldı. Boyamanın bütün aşamaları Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4 ile gerçekleştirildi. İmmun işaret skorları birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından değerlendirildi ve fotoğraflar CX31 ışık mikroskobunda çekildi.

Boyamalarda her bir preparatta X400 büyültmede rastgele beş alan seçilerek tutulumların yoğunluğuna ve tutulum miktar yüzdesine göre H skoru hesaplandı. Tutulum yoğunluğu semi kantitatif olarak 0 (0, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (+ +, orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+ + +, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) olarak skorlandırıldı. Tutulum miktar yüzdesi immünreaktivitenin bulunduğu hücre/yapıların toplam hücre/yapılara oranlanması ile; 1 (%0 – 10 arası, fokal), 2 (%11 – 50 arası, bölgesel) ve 3 (%51-100 arası, diffüz) olarak skorlandı. Her bir alan için bulunan yoğunluk ve miktar skorları $\sum Pi.(i+1)$ (Pi= tutulum miktar yüzdesi, i= tutulum yoğunluğu) formülü ile hesaplandı (61). Sonuçlar toplanarak o lam için tek bir değere ulaşıldı.

TUNEL Yöntemi

TUNEL boyama sıçan ve insan dokularında apoptotik hücreleri saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Histokimyasal olarak DNA fragmentasyonlarını göstermek için kullanılır. DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için in situ apoptozis saptama kiti kullanıldı. Deparafinizasyonu kolaylaştırmak için 60 °C’de bir saat bekletilen preparatlar deparafinizasyonu tamamlamak amacıyla iki kez 15’er dakika ksilolde bekletildi. Daha sonra sırasıyla etanol serilerinden geçirilen kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez beşer dakika distile sudan geçirildikten sonra 10 dakika 20 µg/ml proteinaz K ile inkübe edildi. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3’lük hidrojen peroksit (Lab Vision, USA) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 10-15 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37° C nemli ortamda TdT enziminde (77 µL Reaksiyon Buffer + 33 µL TdT Enzim,1:1 TdT enzim) inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tamponunda 10 dakika bekletildi ve Anti-Digoxigenin’de 45 dakika inkübe edildi. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için beş dk süreyle metil yeşili uygulandı. Boyanan lamalar, artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra 20 dakika şeffaflaştırma amacı ile ksilolde bekletildiler. Ardından entellan ve lamelle kapatılıp, BX40 ışık mikroskopunda fotoğrafları çekildi (Olympus, Tokyo, Japan). TUNEL boyamalarda her kesitten gelişigüzel seçilen beş ayrı alanda yaklaşık olarak 100 hücre sayıldı. Kahverengi boyanan apoptotik hücreler ‘TUNEL Pozitif Hücre’ olarak tanımlandı ve her 100 hücreden boyanan hücreler oranlanarak yüzdesi alındı.

İstatistiksel Analizler

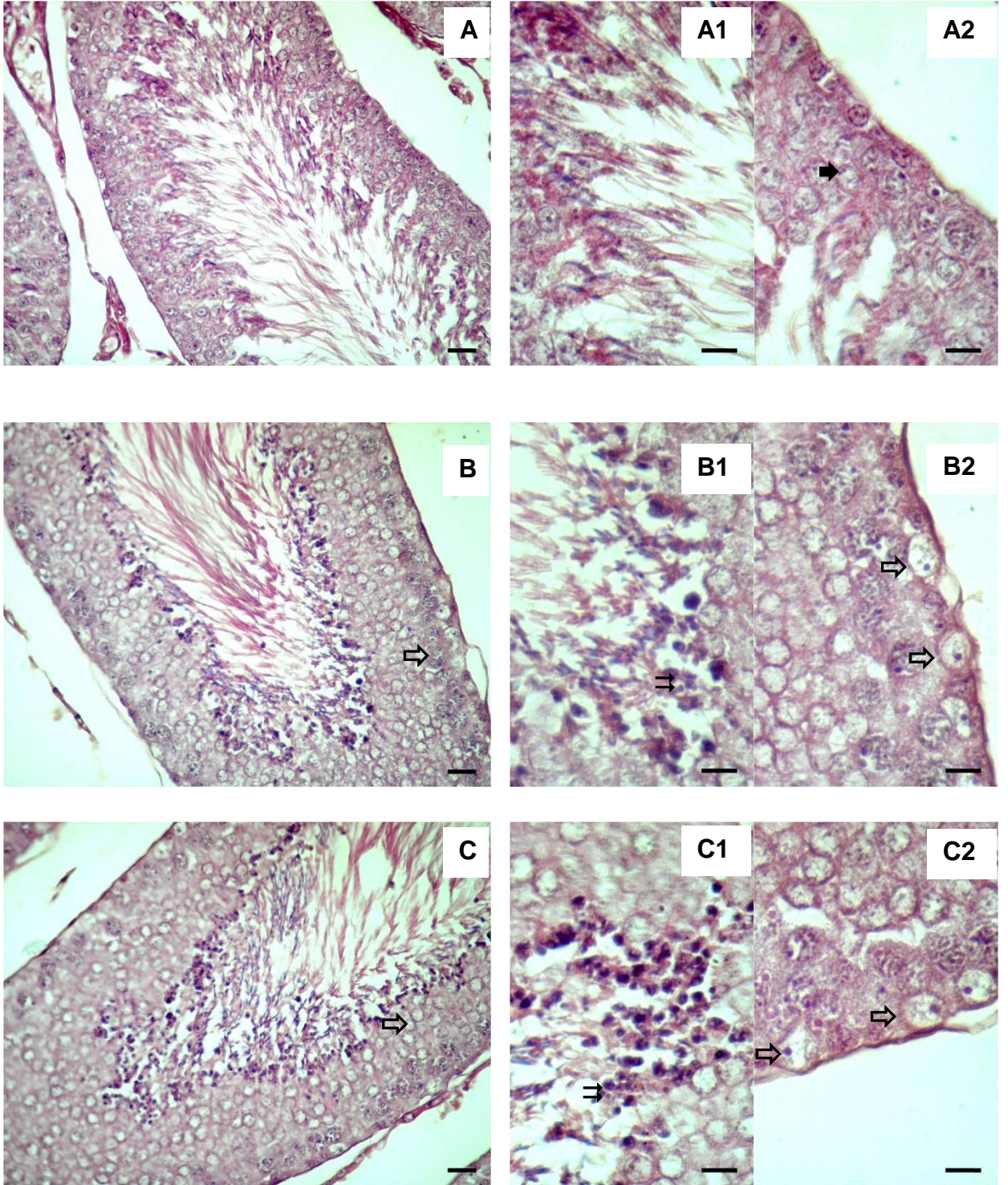
Çalışmanın analizlerinde SPSS 13.0 paket programı kullanılmıştır. Ölçüm değişkenleri ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleriyle verilmiştir. Ölçüm değişkenlerinin 3 ve daha fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Anlamli çıkan değişkenlerin 2 grup karşılaştırmaları için Bonferonni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmanın tüm istatistiksel

analizlerinde p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hematoksilen eozin boyaması ile yapılan histolojik incelemelerde, kontrol grubu seminifer tubullerindeki çeşitli gelişim evrelerindeki tüm üreme hücrelerinin normal yapı gösterdiği izlendi (Resim 1 A, A1, A2). Düşük doz grubunda bazı seminifer tubullerin lümenlerinde inflamatuvar hücrelerinin bulunması dikkat çekici idi (Resim 1 B, B1). Ayrıca bazı spermatogonyum hücrelerinde şişme ve hücre sitoplazmasında vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 1 B2). Yüksek doz grubunda da çoğu seminifer tubullerin lümenlerinde daha yoğun inflamatuvar hücreler ve aynı tubullerde, çoğu spermatogonyum hücrelerinde şişme ve hücre sitoplazmasında vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 1 C, C1, C2).

Çalışma gruplarındaki sıçanlarda vücut ağırlığı, testis ağırlığı ve gonadosomatik indeks arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.



Resim 1. Testis Dokusunda Hematoksilen-Eozin Boyaması: Kontrol grubunda (Resim 1 A, A1, A2) seminifer tubullerde normal yapı izlenmektedir. Düşük doz grubunda (Resim 1 B, B1) bazı seminifer tubullerin lümenlerinde inflamatuvar hücreler, Resim 1 B2’de bazı spermatogonyum hücrelerinde şişme ve vakuolizasyon, yüksek doz gruplarında (Resim 1 C, C1, C2) tubul lümenlerinde daha yoğun inflamatuvar hücreler ve çoğu spermatogonyum hücrelerinde şişme ve vakuolizasyon görülmektedir.

◆: Spermatogonyum, ⇨: Şişme ve vakuolizasyon gösteren spermatogonyumlar, ⇨: İnflamatuvar hücreler. X400, Bar = 50µm. (1), (2) X1000, Bar = 5µm.

Her üç grupta TUNEL boyanan hücre düzeyi ve kaspaz-3, kaspaz-9, p53, Bax sayısı düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (bütün düzeyler için $p= 0.001$). Sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

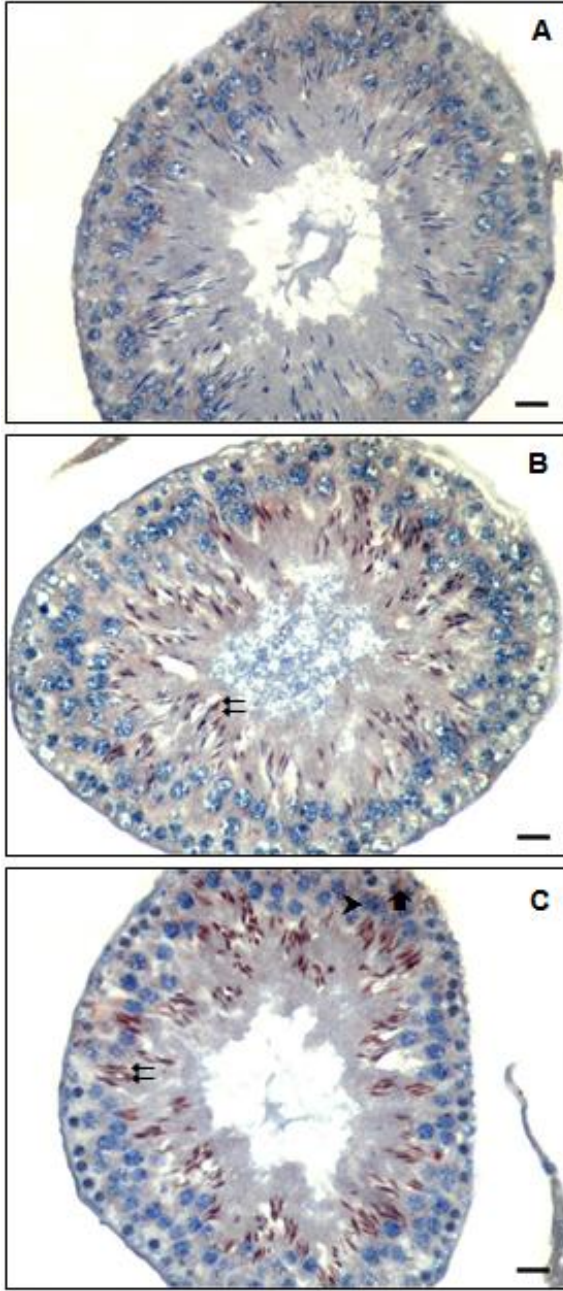
Tablo 1. Gruplarda İmmunohistokimyasal Boyanma Bulguları

	Kontrol Grubu	Düşük Doz Grubu	Yüksek Doz Grubu	p
Kaspaz-3	39,43 ± 2,57	90,57 ± 5,22	120,00 ± 12,44	0,001
Kaspaz-9	36,00 ± 5,89	38,29 ± 4,82	94,57 ± 7,50	0,001
p53	46,29 ± 7,95	94,86 ± 11,48	162,29 ± 7,95	0,001
Bax	48,00 ± 4,32	96,00 ± 6,48	119,71 ± 6,87	0,001
TUNEL	2,00 ± 0,82	3,86 ± 1,21	6,71 ± 1,38	0,001

Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu, kontrol grubuna göre TUNEL boyanan hücre düzeyi ve kaspaz-3, kaspaz-9, p53, Bax sayısı düzeyleri, diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ($p= 0,001$). Yüksek doz grubu ile düşük doz grubu karşılaştırıldığında da yüksek doz grubunda bütün immunohistokimyasal boyama düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p= 0,001$).

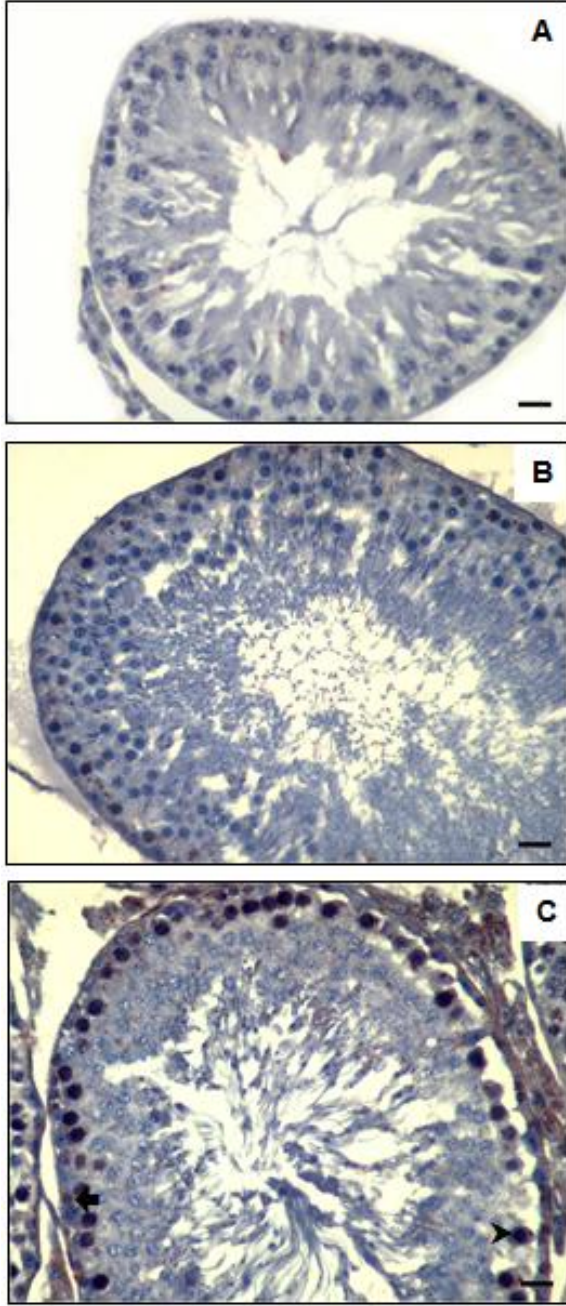
Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyamasında kontrol grubunun testis dokusunda zayıf reaksiyon gözlemlendi (Resim 2 A). Düşük doz grubunda özellikle spermatidlerde ortadan kuvvetliye değişen kaspaz-3 ekspresyonu izlenirken (Resim 2 B), yüksek doz grubunda spermatidlerde kuvvetli, bazı spermatogonyumlarda ise orta şiddette immunoreaksiyon tespit edildi (Resim 2 C).

Kaspaz-9 immunohistokimyasal boyamasında kontrol ve düşük doz gruplarında doku genelinde zayıf ekspresyon gözlemlendi (Resim 3 A, 3 B). Yüksek doz grubunda ise diğer iki gruba göre reaksiyon, seminifer tubullerin primer spermatositlerinde bir miktar artmıştı (Resim 3 C).



Resim 2. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda Kaspaz-3 İmmunohistokimya Boyaması: Kontrol grubunun (Resim 2 A) testis dokusunda zayıf reaksiyon, düşük doz grubunda (Resim 2 B) spermatidlerde ortadan kuvvetliye değişen kaspaz-3 ekspresyonu, yüksek doz grubunda (Resim 2 C) spermatidlerde kuvvetli, bazı spermatogonyumlarda ise orta şiddette immunoreaksiyon izlenmektedir.

►: Spermatogonyum, ►: Primer spermatozoid, ⇌: Spermatidler. X400,
Bar = 50µm.



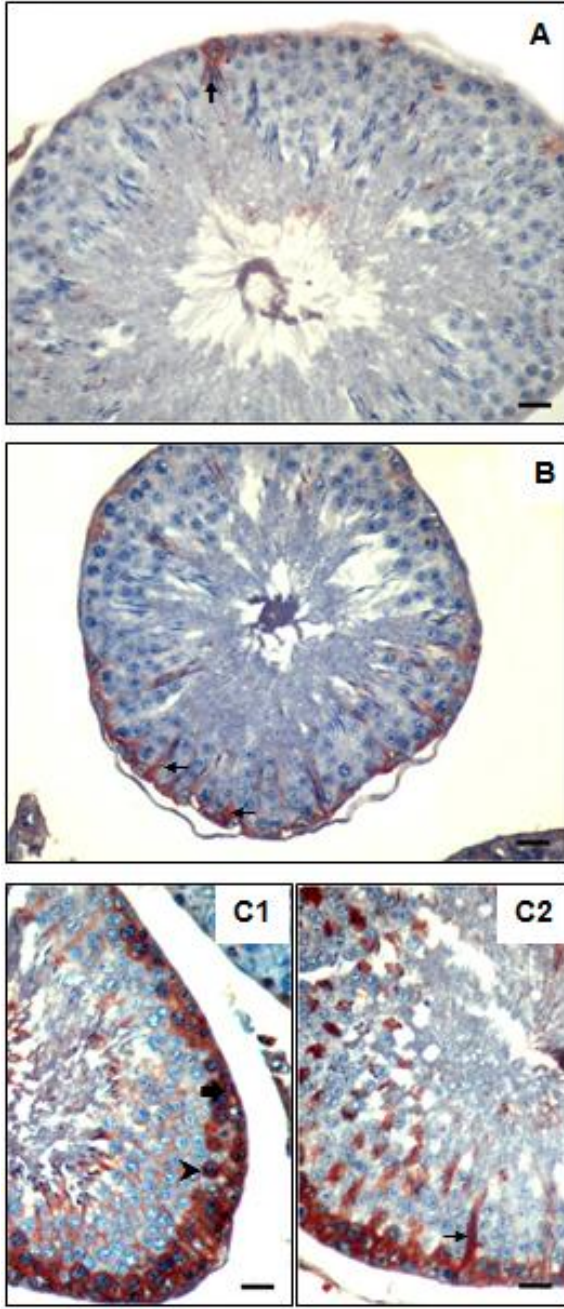
Resim 3. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda Kaspaz-9 İmmunohistokimya Boyaması: Kontrol (Resim 3A) ve düşük doz (Resim 3B) gruplarında doku genelinde zayıf ekspresyon, yüksek doz grubunda (Resim 3C) seminifer tubullerin primer spermatositlerinde immunreaksiyonda bir miktar artış izlendi.

◆: Spermatogonyum, ▶: Primer spermatosit. X400, Bar = 50µm.

p53 immunohistokimyasal boyamasında, kontrol grubunda birkaç sertoli hücresinde kuvvetli reaksiyon belirlendi (Resim 4 A). Düşük doz grubunda, p53 pozitif sertoli hücrelerinin sayısının arttığı ve bazı spermatidlerde de reaksiyonun olduğu izlendi (Resim 4 B). Yüksek doz grubunda seminifer tubullerde spermatogonyum ve primer spermatosit hücrelerinde ve spermatidlerde oldukça kuvvetli immunoreaksiyon vardı (Resim 4 C1). Yine sertoli hücrelerinde de p53 reaksiyonu çok kuvvetli idi (Resim 4 C2).

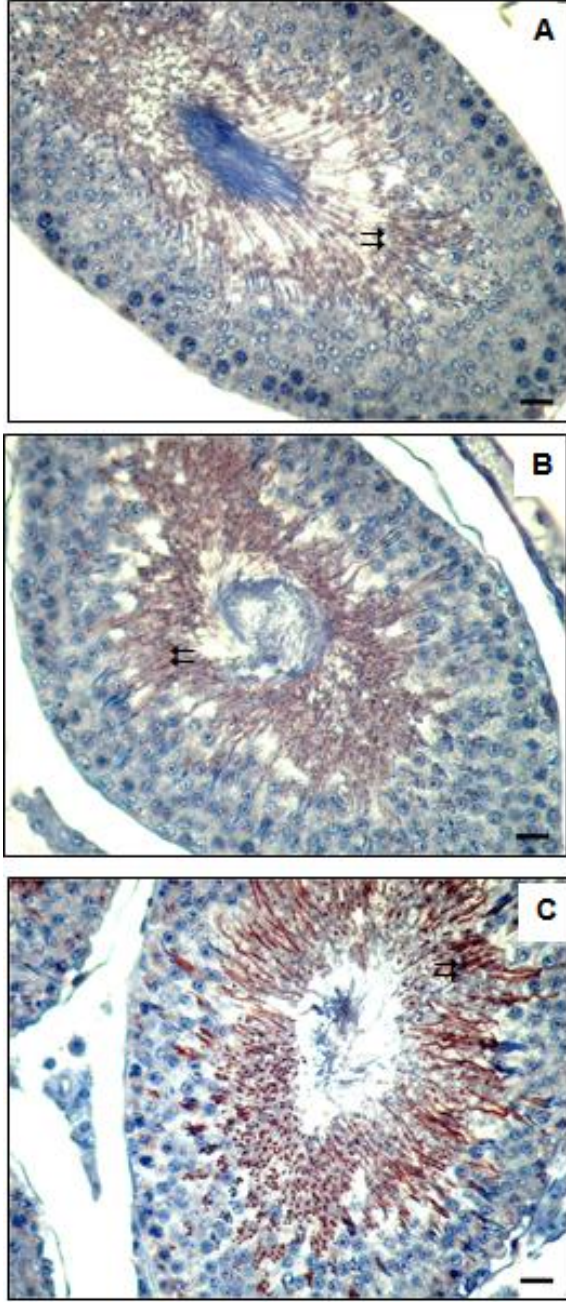
Bax immunohistokimyasal boyamasında kontrol grubunda spermatogonyumlar, primer spermatositler ve olgun spermatidlerde zayıf reaksiyon belirlendi (Resim 5 A). Düşük doz grubunda spermatogonyumlarda ve primer spermatositlerde zayıf immunoreaksiyon gözlenirken olgun spermatidlerde ise orta şiddette ekspresyon izlendi (Resim 5 B). Yüksek doz grubunda ise yine sadece olgun spermatidlerde kuvvetli Bax reaksiyonu dikkat çekiciydi (Resim 5 C).

TUNEL boyama bulgularında, kontrol grubunda TUNEL pozitif hücrelerin sayısının oldukça az olduğu (Resim 6 A), düşük doz grubunda ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının kontrole göre bir miktar arttığı belirlendi (Resim 6 B). Yüksek doz grubunda ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının diğer iki gruba göre daha da arttığı gözlemlendi (Resim 6 C).



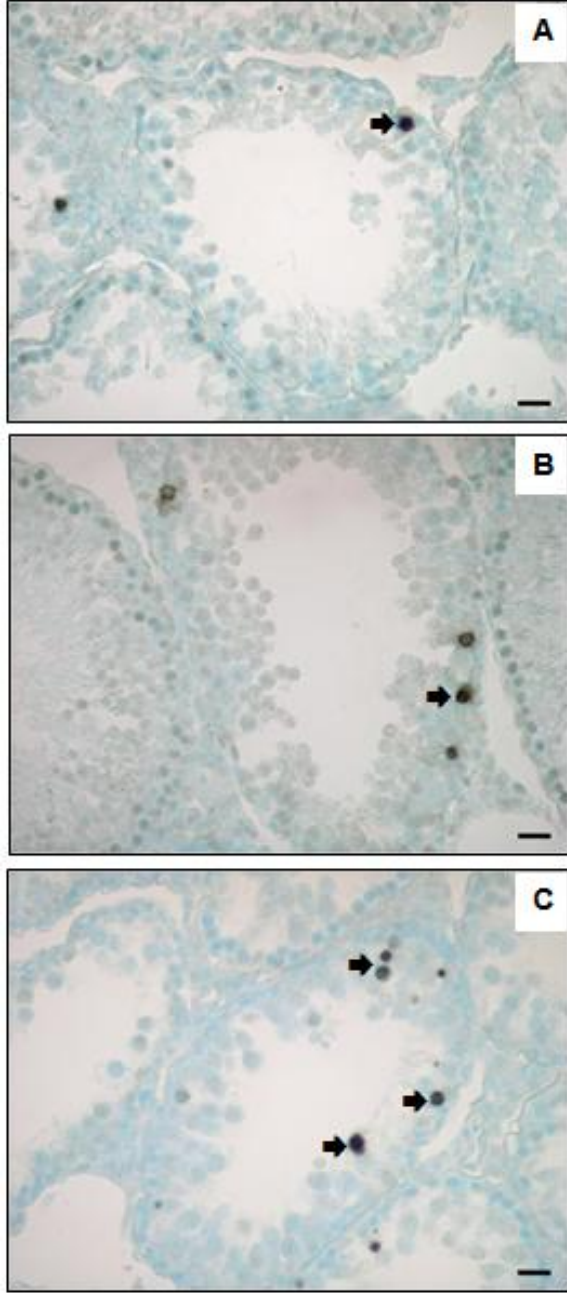
Resim 4. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda p53 İmmunohistokimya Boyaması: Kontrol grubunda (Resim 4 A) birkaç Sertoli hücrelerinde kuvvetli reaksiyon belirlendi. Düşük doz grubunda, p53 pozitif sertoli hücrelerinin sayısının arttığı ve bazı spermatidlerde de reaksiyon (Resim 4 B), yüksek doz grubunda seminifer tubullerde spermatogonyum ve primer spermatozoid hücrelerinde ve spermatidlerde oldukça kuvvetli immunoreaksiyon izlendi (Resim 4 C1). Yine Sertoli hücrelerinde de p53 reaksiyonu çok kuvvetli saptandı (Resim 4 C2).

▀: Spermatogonyum, ▶: Primer spermatozoid, ⇨: Spermatidler, →: Sertoli hücresi, X400, Bar = 50µm.



Resim 5. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda Bax İmmunohistokimya Boyaması: Kontrol grubunda (Resim 5 A) zayıf reaksiyon, düşük doz grubunda (Resim 5 B) spermatogonyumlarda ve primer spermatositlerde zayıf immunoreaksiyon, olgun spermatidlerde ise orta şiddette ekspresyon, yüksek doz grubunda (Resim 5 C) ise yine sadece olgun spermatidlerde kuvvetli Bax reaksiyonu izlendi.

⇒: Olgun spermatidler. X400, Bar = 50µm.



Resim 6. Kontrol (A), Düşük Doz (B), Yüksek Doz (C) Gruplarında Testis Dokusunda TUNEL Yöntemi ile İnceleme: Kontrol grubu (Resim 6 A) TUNEL pozitif hücrelerin sayısının az olduğu, düşük doz grubunda (Resim 6 B) ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının kontrole göre bir miktar arttığı, yüksek doz grubunda (Resim 6 C) ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının diğer iki gruba göre daha da arttığı izlendi.

➡: TUNEL pozitif hücreler. X400, Bar = 50 μ m.

5. TARTIŞMA

Amiodaron, etkin bir antiaritmik ilaç olması nedeniyle supraventriküler ve ventriküler taşikardilerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu nedenle amiodarona bağlı oluşan yan etkiler, başta yetişkinlerde hayatı tehdit eden akciğer toksitesi olmak üzere daha çok ilgi çekmektedir. Çocukluk çağı aritmilerinde başlıca tedavi seçeneği antiaritmik ilaçlardır. Çocuk hastalar erken yaşta ve bazen uzun süreli ilaç kullanmaya maruz kalmakta ve bunun sonucunda çeşitli sistemlerde yan etkilerin ortaya çıkması kaçınılmaz olmaktadır.

Amiodaronun başlıca bilinen yan etkileri kornea, cilt, tiroit bezi, karaciğer, akciğer, nöromuskuler sistem ve kalp üzerindedir. Birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmış olmasına karşın yan etkilere ilişkin altta yatan patojenik mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle çocukluk çağı dönemine ilişkin çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Amiodaron kullanımına ikincil gelişen histopatolojik değişiklikler inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hücrelerde şişme, vakuolizasyon, doku iskeletinde bozulma şeklindedir. Çalışmamızda histolojik değerlendirmede saptanan en belirgin bulgu, amiodaron verilen sıçanlarda seminifer tubul lümenlerinde doz ile artan yoğunlukta inflamatuvar hücrelerin bulunmasıydı. Yine yüksek doz grubunda daha belirgin olmak üzere, amiodaron verilen sıçanlarda spermatogonyum hücrelerinde şişme ve hücre sitoplazmasında vakuolizasyon gözlemlendi. Amiodaron kullanımına ikincil gelişen, çalışmamızdakine benzer histopatolojik bulgular birçok deneysel çalışmada ve amiodaron kullanan hastalara ait farklı dokularda gösterilmiştir. Jacobs ve arkadaşları (44) amiodaron kullanımına ikincil periferik sinir toksisitesi gelişen hastalardan aldıkları sinir dokularını incelediklerinde, çalışmamızdaki bulgulara benzer olarak Schwann hücre sitoplazmalarında vakuol formasyonu, perinöral inflamatuvar hücre infiltrasyonu, demiyelinizasyon, hücrelerde dejenerasyon ve hücre içi dens granüller rapor etmişlerdir. Elektron mikroskopi ile de inceledikleri periferik sinir hücrelerinde elektrodens birikimlere

ek olarak hücre içi organellerde azalma saptamışlardır. Hücrelerde gelişen şişme ve vakuolizasyonun nedeninin amiodaron kullanımı sonucu oluşan ilaç-fosfolipid birleşiminin hücre içi birikimi ile lizozomal aktivitenin bozulmasına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Aksonal dejenerasyonlarda, sitoplazmada hacimsel artış ve hücre şişmesinin de etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda da, özellikle yüksek doz amiodaron alan sıçanlarda spermatogonyumlarda şişme ve vakuolizasyon daha yoğun görülmüştür. Bu çalışmadan farklı olarak Pellissier ve arkadaşları (66) amiodaron kullanıp periferik nöropati gelişen hastaların sinir dokularının histopatolojik incelemelerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptamayıp perinöral ve epinöral damarları normal olarak rapor etmişlerdir. Işık mikroskopi incelemelerinde esas bulgu olarak miyelinazasyonda azalma, çeşitli oranlarda miyelin artıklarının bulunması gösterilmiştir. Fernando ve arkadaşları (67) amiodaron kullanımı sırasında myopati gelişen bir hastadan alınan deltoid kas biyopsilerinde çalışmamızdakine benzer şekilde, birçok kas lifi hücresinde küçük vakuollerin ve hücrelerde şişmenin eşlik ettiği ciddi vakuoler miyopati rapor etmişlerdir. Büyük vakuollerin, dejenerasyona uğramış mitokondrileri ve veziküler debrisi içerdiğini göstermişlerdir.

Amiodaron kullanan hastalardan alınan farklı dokularda inflamatuvar hücre artışı sıklıkla gözlenen bir bulgudur. Bedrossian ve arkadaşları (68) amiodaronun akciğerde inflamatuvar alveolitis, fibrozis, tip II alveoler hücrelerde hiperplazi oluşturduğu, bronkoalveoler sıvı ve transbronşial biyopsi örneklerinde lenfositik infiltrasyon yaptığını, köpük hücrelerinin yer aldığını göstermişlerdir. Köpük hücreleri, histiyosit hücre grubundan, hücre içinde fosfolipid birikimi sonucu oluşan inflamatuvar bir hücredir. Amiodaron, tipik olarak akciğer, karaciğer, kan ve lenf nodlarında köpük hücrelerine neden olmaktadır. Fosfolipid birikimi, elektron mikroskopi incelemelerinde lameller inklüzyon cisimciği şeklinde gözükmetedir (68-70).

İnsan tiroit hücre kültür serilerinde, amiodarona bağlı hücrelerde şişme, düzensizlik, ölü hücrelerde DNA'da azalma gibi dramatik morfolojik değişiklikler gözlenmiştir ve bu durum doz ile ilişkili bulunmuştur (71). Benzer hücresel değişiklikler, amiodaron tedavisi sırasında karaciğer, kalp, deri, kornea ve lökositler gibi diğer dokularda da görülmektedir (3). Pitsiavas ve arkadaşlarının (72) yaptığı çalışmada, sıçan tiroit dokusunda hücresel dizilimde değişiklikler, apoptozis, nekroz, inklüzyon cisimcikleri, lipofuksinogenezis, makrofaj infiltrasyonu ve endoplazmik retikulumda şişme şeklinde,

amiodaron alımıyla ilgili tiroit sitotoksitesine işaret eden değişiklikler ve ayrıca lenfositik infiltrasyon rapor edilmiştir. İnsan postmortem tiroit dokusunda amiodaron kullanımına bağlı foliküllerde düzleşme, büyüme ve şişme, foliküllerin makrofajlar tarafından infiltrasyonu gösterilmiştir (73). Tüm bu destrüktif ve dejeneratif değişikliklerin ışık mikroskopi incelemelerine yansımaları, tiroit hormon sentezinde azalmaya bağlı foliküler hücreler ve lümen arasında kolloid sıvısının geçişinde bozulma sonucu olduğu düşünülmektedir (73). Bizim çalışmamızda da düşük doz grubunda bazı seminifer tubullerin lümenlerinde inflamatuvar hücrelerinin bulunması ayrıca bazı spermatogonyum hücrelerinde şişme ve hücre sitoplazmasında vakuolizasyon; yüksek doz grubunda da çoğu seminifer tubullerin lümenlerinde daha yoğun inflamatuvar hücreler ve aynı tubullerde çoğu spermatogonyum hücrelerinde şişme ve hücre sitoplazmasında vakuolizasyon gözlenmesi hücre dejenerasyonunu düşündürmektedir.

Amiodaron kullanımına bağlı olarak üreme sistemi etkilenmesi olan vakalar da rapor edilmiştir. Gasparich ve arkadaşları (50), amiodaron kullanımı sırasında epididimit gelişen hastalardan aldıkları epididim dokusunun histopatolojik incelenmesinde fibrozis ve lenfositik infiltrasyon rapor etmiştir.

Sıçan akciğer epitelyal hücre A549 kültürlerinde yapılan çalışmalarda amiodaronun, mitokondriyal membran depolarizasyonu, ATP deplesyonu, propidium iodid alımında artış, Annexin-V pozitif hücrelerde artış ile karakterize hücre hasarına neden olduğu gösterilmiştir (74). Bargout ve arkadaşları (75) sıçan tip II pnömosit hücre ve insan A549 alveoler hücre kültürlerinde, amiodaron ve desetilamiodaronun apoptotik ve nekrotik etkilerini araştırmıştır. Sıçan tip II pnömosit hücrelerin amiodarona bağlı toksisiteye insan A549 alveoler hücrelerine göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu durumun sitokrom P-450 monooksijenaz sisteminin tip II pnömosit hücrelerinde olup, insan A549 alveoler hücrelerinde bulunmaması ve buna bağlı olarak amiodaronun ve toksik metabolitlerinin metabolize olamadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada doz ile artan düzeylerde apoptozis gözlenmiş ve ortama kaptopril, anjiotensin reseptör antagonisti ve geniş etkili kaspaz inhibitörü konulduğunda amiodarona bağlı net hücre kaybında azalma olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda, özellikle yüksek doz grubundaki sıçanların testis dokularında düşük doz grubuna göre kaspaz-3, kaspaz-9, p53, Bax sayı ve TUNEL pozitif hücrelerin düzeylerinin fazla olması, oluşan apoptozisin dolayısıyla toksisitenin, doz ile arttığını göstermektedir. Choi ve arkadaşlarının (69) çalışmasında, L-132 insan akciğer

epitelyal hücre serilerinde, immunohistokimyasal ölçüm ve enzim aktivitesi tespit yöntemleri kullanılarak, amiodaronun apopitotik etkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada TUNEL yöntemi ve kaspaz-3 enzim aktivitesi, hücre içi DNA fragmanlarının tayini değerlendirmede yer alan parametrelerdi. Bu sonuçlara göre amiodaron, apopitozisi, muhtemelen Bax bağımlı olarak intrensek yolağın etkinleşmesi ve bu yolak üzerinden kaspaz-3 aktivasyonunu gerçekleştirerek uyarmaktadır (69). Çalışmamızda literatürde yer alan deneysel çalışmalara benzer olarak, hem düşük dozda hem de yüksek dozda amiodaron alan sıçanların testis dokularının, TUNEL yöntemi ve Bax, p53, kaspaz-3, kaspaz-9 ile immunohistokimyasal olarak incelendiğinde yüksek oranlarda yoğun apopitotik hücre düzeyine sahip olduğunu saptadık. Çalışmanın aritmi problemi ve kronik hastalık modeli oluşturulmadan sağlıklı sıçanlar üzerinde yapılmış olması, doğrudan amiodaronun testis üzerine etkilerini ortaya koyduğunu düşünüyoruz. Deneysel ve klinik çalışma sonuçlarının birlikte yorumlanması, mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayacak, muhtemel yan etkilerin yakın takip edilmesi ve mümkün olanların önlenmesi için imkan sağlayacaktır.

Yetişkinlerde uzun süreli amiodaron kullanımına bağlı olarak serum folikül uyarıcı hormon, serum luteinizan hormon düzeylerinde artış, hastalarda serum serbest testosteron düzeylerinde, libidoda ve seksüel fonksiyonlarda azalma gibi etkilerin olduğu görülmüştür (51). Serum serbest testosteron düzeylerinde azalma ve folikül uyarıcı hormon artışı, testiküler disfonksiyona, dolayısıyla bozulmuş spermatogenezise işaret etmektedir. Testiküler germ hücre apopitozisi fizyolojik ve devamlı olarak hayat boyu meydana gelir (76). Spermatozoaların düzenli, programlı olarak ölmelerinin iki ana nedeni vardır. Bunlardan ilki, dölleme sonrası dişi genital yolda fertilizasyonda yer almayacak olan spermatozoaların bertaraf edilmesidir. İkincisi ise germ hücre serisindeki DNA hasarı olan hücrelerin fertilizasyonda yer almamasını sağlamaktır. Testiküler torsiyon, yaşam şekli faktörleri, antioksidanların azalması, elektromagnetik radyasyon, enfeksiyonlar, diyabet, doymamış yağlar, ilaçlar ve diğer toksik maddeler gibi nedenlerle testiste oksidatif stres artmakta, buna bağlı olarak DNA hasarı oluşmaktadır ve sonrasında apopitozisi gerçekleşmektedir (77).

Çocukluk çağında birçok hormonun etkisi altında hızlı büyümenin, kilo alımının, iskelet sistemi, genital sistemin ve seksüel fonksiyonların gelişimi göz önüne alındığında ilaçlara bağlı oluşan istenmeyen etkiler daha da önem taşımaktadır. Amiodaron yenidoğan

hastalarda dahil çocukluk çağı ve erişkin dönemde uzun süre kullanılabilen bir ilaçtır (2, 14, 77). Bu hastalarda testis, dolayısıyla üreme fonksiyonları üzerine amiodaronun etkileri bilinmemektedir. Çocuklarda ve yetişkinlerde, üreme ve bir takım endokrin mekanizmada görev alan testis dokusunun amiodaronun etkileri açısından araştırılması, ilacın yan etki profilinin üreme ve endokrin sistemdeki etkilerinin bilinmesine olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada amiodaron kullanımı ile sıçan testis dokusunda histopatolojik değişiklikler ve apoptotik etkiler saptanmıştır. Amiodaron kullanan hastalarda ilacın testis dokusu ve erkek fertilitesi üzerine olan etkilerinin hormonal tetkikler, spermiyogram ve sperm kalitesi belirteçleri ile araştırılması konuya katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada amiodaronun dozla ilişkili olarak, testislerde germ hücre serisinde dejenerasyona, apoptozise ve testiste inflamatuvar cevaba neden olduğu gösterilmiştir. Büyüme, gelişme ve üreme üzerine oluşabilecek kalıcı yan etkilerin, sonraki dönemde yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyecek sonuçlar doğurabileceği göz önüne alınarak tedavilerin dikkatli planlanması gerekmektedir. Bu nedenlerle amiodaron kullanan hastalar kısa ve uzun dönemde hem klinik açıdan hem de laboratuvar testleri ile yakından izlenmeli ve klinisyenler muhtemel riskler açısından dikkatli olmalıdır. Aritmisi olan hastalarda hastalığın kendisinin ve kullanılan antiaritmik ilaçların testis, dolayısıyla üreme sistemi üzerine etkilerine ilişkin mekanizmaların tam olarak anlaşılması için daha fazla sayıda araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Ayrıca, amiodaron kullanan hastalarda ilacın testis dokusu ve erkek fertilitesi üzerine olan etkilerinin hormonal tetkikler, spermiyogram ve sperm kalitesi belirteçleri ile araştırılması konuya katkı sağlayacaktır.

7. ÖZET

AMİODARONUN SIÇAN TESTİSİ ÜZERİNE MORFOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Amiodaron, diğer antiaritmik ajanlara dirençli çeşitli taşiaritmilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan güçlü antiaritmik bir ilaçtır. Yan etkilerinin sık görülmesi tedavide kullanımını sınırlayan en önemli nedenlerden biridir. Bu çalışmada, amiodaronun sıçan testisleri üzerine morfolojik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 21 erkek Spraque Dawney cinsi pubertal sıçan kullanıldı. Sıçanlar, her grupta yedi sıçan olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara içme suyu, düşük doz grubundakilere 20 mg/kg/g ve yüksek doz grubundaki sıçanlara ise 200 mg/kg/g amiodaron oral yolla iki dozda verildi. Sıçanlar 14 gün sonra sakrifiye edildi ve testis dokuları alındı. Testis dokusu immunohistokimyasal ve histolojik olarak incelendi. Hemotoksilen-eosin boyama doku iskeletini, dejenerasyonunu, TUNEL ölçümü ve primer antikorları ile indirekt immunohistokimyasal boyama apoptozisi belirlemek için kullanıldı.

Testis dokusunun histopatolojik incelenmesinde, seminifer tubul hücre lümenlerinde, amiodaron alan sıçanlarda kontrol grubuna göre amiodaron dozu ile uyumlu olarak artan miktarlarda inflamatuvar hücreler, bazı spermatogonyumların sitoplazmasında şişme ve vakoulizasyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyama ile kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, p53 ekspresyonunu içeren apoptotik bulgular gösterildi. TUNEL yöntemi ile doza bağımlı olarak DNA kırıklarında artış saptandı.

Bu çalışmada, amiodaron kullanımı ile sıçan testis dokusunda histopatolojik değişiklikler ve apoptotik etkiler saptanmıştır. Amiodaron kullanan hastalarda ilacın testis dokusu ve erkek fertilitesi üzerine olan etkilerinin hormonal tetkikler, spermiyogram ve sperm kalitesi belirteçleri ile araştırılması konuya katkı sağlayacaktır.

8. SUMMARY

THE ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL EFFECTS OF AMIODARONE ON RAT TESTIS

Amiodarone is a potent antiarrhythmic drug widely used for the management of various tachyarrhythmias including refractory to other antiarrhythmic agents. Frequent occurrence of side effects is the most important factors limiting the drug treatment. The aim of this study was to evaluate the morphological effects of amiodarone on rat testis.

In the present study, twenty-one male pubertal Sprague Dawney rats were used. The rats were randomly divided into three groups with seven animals in each group. While the control group received tap water, low-dose group 20 mg/kg/d and high-dose group received 200 mg/kg/d amiodarone orally in twice daily. Rats sacrificed after 14 days and the testes were removed. Testicular tissues was examined with immunohistochemical and histopathological stains. TUNEL assay and indirect immunohistochemical staining were performed with primary antibodies for determining apoptosis.

In histopathological examination of testicular tissue inflammatory cells in seminiferous tubul lumens, swelling and vacuolization in the cytoplasm of some spermatogonium was determined for increasing concentrations of amiodarone. Immunohistochemical staining showed apoptotic findings that expression of caspase-3, caspase-9, Bax, p53 and increased DNA fragmentation was detected via TUNEL assay in a dose dependent fashion.

In this study, amiodarone dependent histopathological changes and apoptotic effects was observed in rat testis tissue. The investigation of hormonal tests, semen analysis and sperm quality markers with effects of the drug on testicular tissue and male fertility in patients taking amiodarone will contribute to the research topic.

9. KAYNAKLAR

1. Connolly SJ: Evidence-Based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation*,100: 2025-2034, 1999.
2. Evren L and Schaliş MJ: Amiodarone: an effective antiarrhythmic drug with unusual side effects. *Heart*, 96: 1593-1600, 2010.
3. Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE: The effects of amiodarone on the thyroid. *Endocrine Reviews* 22(2): 240-254, 2001.
4. Kowey PR, Marinchak RA, Rials SJ, Filart RA: Intravenous amiodarone. *J Am Coll Cardiol*, 29: 1190-1198, 1997.
5. Adams PC, Holt DW, Storey GCA, Morley AR, Callaghan J, Campbell RWF: Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation*, 72(5): 1064-1075, 1985.
6. Vassallo P and Trohman RG: Prescribing amiodarone An evidence-based review of clinical indications. *JAMA*, 298(11): 1312-1322, 2007.
7. Leeuwenburgh BPJ, Versteegh MIM, Maas JJ, Dunning J: Should amiodarone or lidocaine be given to patients who arrest after cardiac surgery and fail to cardiovert from ventricular fibrillation ? *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 7: 1148-1151, 2008.
8. Naccarelli GV, Wolbrette DL, Patel HM, Luck JC: Amiodarone: clinical trails. *Curr Opin Cardiol*, 15: 64-72, 2000.
9. Connolly SJ, Dorian P, Roberts RS, Gent M, Bailin S, Fain ES, Thorpe K, Champagne J, Mario T, Coutu B, Gronefeld GC, Hohnloser SH, for the Optimal Pharmacological Therapy in Cardioverter Defibrillator Patients (OPTIC) Investigators: Comparison of β -Blockers, amiodarone plus β -Blockers, or sotalol for prevention of shocks from implantable cardioverter defibrillators. *JAMA*, 295: 165-171, 2006.
10. Desai AD, Chun S, Sung RJ: The role of intravenous amiodarone in the management of cardiac arrhythmias. *Ann Intern Med*, 127: 294-303, 1997.

11. Singh BN, Singh SN, Reda DJ, Tang C, Lopez B, Haris CL, Fletcher RD, Sharma SC, Atwood JE, Jacobson AK, Lewis D, Raisch DW, Ezekowitz MD, for the Sotalol Amiodarone Atrial Fibrillation Efficacy Trial (SAFE-T) Investigators: Amiodarone versus sotalol for atrial fibrillation. *N Eng J Med*, 352: 1861-1872, 2005.
12. Brendorp B, Pedersen OD, Pedersen CT, Sahebzadah N, Kober L: A benefit-risk assessment of class III antiarrhythmic agents. *Drug Safety*, 25(12): 847-865, 2002.
13. Saul JP, Scott WA, Brown S, Marantz P, Acevedo V, Etheridge SP, Perry JC, Treidman JK, Burris SW, Cargo P, Graepel J, Koskelo EK, Wang R: Intravenous amiodarone for incessant tachyarrhythmias in children A randomized, double blind, antiarrhythmic drug trial. *Circulation* 112: 3470-3477, 2005.
14. Garson A, Gillette PC, McVey P, Hesslein PS, Porter J, Angell LK, Kaldis LC, Hittner HM: Amiodarone treatment of critical arrhythmias in children and young adults. *JACC*, 4(4): 749-755, 1984.
15. Lane RD, Nguyen KT, Niemann JT, Bolte RG, Etheridge SP, Gausche-Hill M: Amiodarone for emergency care of children. *Pediatr Emer Care* 26: 382-392, 2010.
16. Yatla K, Turgut OO, Yılmaz MB, Yılmaz A, Tandoğan I: Dronedarone: A promising alternative for the management of atrial fibrillation. *Cardiovasc Drugs Ther*, 23: 385-393, 2009.
17. Zecchin M, Lenarda AD, Proclemer A, Faganello G, Facchin D, Petz E, Sinagra G: The role of implantable cardioverter defibrillator for primary vs secondary prevention of sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Europace*, 6: 400-406, 2004.
18. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, Clapp-Channing N, Davidson-Ray LD, Fraulo ES, Fishbein DP, Luceri RM, Ip JH, for the Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial (SCD-HeFT) Investigators: Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med*, 352: 225-237, 2005.
19. Cairns JA, Connolly SJ, Roberts R, Gent M, for the Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial Investigators: Randomised trial of outcome after myocardial infarction in patients with frequent or repetitive ventricular premature depolarisations: CAMIAT. *Lancet*, 349: 675-682, 1997.
20. Kovacikova L, Hakacova N, Dobos D, Skrak P, Zahorec M: Amiodarone as a first-line therapy for postoperative junctional ectopic tachycardia. *Ann Thorac Surg*. 88: 616-623, 2009.
21. Karacan M, Olgun H, Becit N: Successful use of intravenous amiodarone in a child with combined postoperative junctional and ectopic tachycardias. *Cardiol Young*, 19: 407-409, 2009.

22. Perry JC, Knilans Tk, Marlow D, Denfield SW, Fenrich AL, Friedman RA: Intravenous amiodarone for life-threatening tachyarrhythmias in children and young adults. *JACC* 22: 95-98, 1993.
23. Singh SN, Fletcher RD, Fisher SG, Singh BN, Lewis HD, Deedwania PC, Massie BM, Colling C, Lazzeri D: Amiodarone in patients with congestive heart failure and asymptomatic ventricular arrhythmia. Survival trial of antiarrhythmic therapy in congestive heart failure. *N Engl J Med*, 333: 77-82, 1995.
24. Kudenchuk PJ, Cobb LA, Copass MK, Cummins RO, Doherty AM, Fahrenbruch CE, Hallstrom AP, Murray WA, Olsufka M, Walsh T: Amiodarone for resuscitation after out-of-hospital cardiac arrest due to ventricular fibrillation. *N Engl J Med*, 341: 871-878, 1999.
25. Dorian P, Cass D, Schwartz B, Cooper R, Gelaznikas R, Barr A: Amiodarone as compared with lidocaine for shock-resistant ventricular fibrillation. *N Engl J Med*, 346: 884-890, 2002.
26. Julian A, Camm AJ, Frangin G, Janse MJ, Munoz A, Schwartz PJ, Simon P, for the European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators: Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. *Lancet*, 349: 667-674, 1997.
27. Greene HL, Graham EL, Werner JA, Sears GK, Gross BW, Gorham JP, Kudenchuk PJ, Trobaugh GB: Toxic and therapeutic effects of amiodarone in the treatment of cardiac arrhythmias. *JAAC*, 2(6): 1114-1128, 1983.
28. Papiris SA, Triantafyllidou C, Kolilegas L, Markoulaki D, Manali ED: Amiodarone review of pulmonary effects and toxicity. *Drug Saf*, 33(7): 539-558.
29. Kapatou E, Skyrlas A, Agelaki MG, Pantos C, Kolettis TM, Malamou-Mitsi V: Amiodarone attenuates apoptosis, but induces phospholipidosis in rat alveolar epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*, 61(6): 671-677, 2010.
30. Guccione P, Thomas P, Garson A: Long-term follow-up amiodarone therapy in the young: Continued efficacy, unimpaired growth, moderate side effects. *JACC* 15(5): 118-124, 1990.
31. Roy D, Talajic M, Dorian P, Connolly S, Eisenberg MJ, Green M, Kus T, Lambert J, Dubuc M, Gagné P, Nattel S, Thibault B: Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 342: 913-920, 2000.
32. Dereure O: Drug-induced skin pigmentation. Epidemiology, diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*, 2(4): 253-262, 2001.

33. Huang X, Yang Y, Zhu J, Gao X, Wang G, Tan H, Liang Y, Li J: Clinical applications and acute hepatotoxicity of intravenous amiodarone. *J Int Med Res*, 37: 1928-1936, 2009.
34. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
35. Singh NP, Muller CH, Berger RE: Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil and Steril*, 80(6): 1420-1430, 2003.
36. Renault TT and Manon S: Bax: Addressed to kill. *Biochimie*, 93(9): 1379-1391, 2011.
37. Padmanabhan H: Amiodarone and thyroid dysfunction. *South Med J*, 103(9): 922-930, 2010.
38. Basaria S and Cooper DS: Amiodarone and the thyroid. *Am J Med*, 118(7): 706-714, 2005.
39. Schwaiblmair M, Berghaus T, Haeckel T, Wagner T, von Scheidt W: Amiodarone-induced pulmonary toxicity: An under-recognized and severe adverse effect ? *Clin Res Cardiol*, 99: 693-670, 2010.
40. Arizala AM, Sobol SM, McCarty GE, Nichols BR, Rakita L: Amiodarone neuropathy. *Neurology*, 33: 643-645, 1983.
41. Roberts M: Clinical utility and adverse effects of amiodarone therapy. *Adv Crit Care*, 21(4): 333-338, 2010.
42. Mäntyjärvi M, Tuppurainen K, Ikäheimo K: Ocular side effects of amiodarone. *Surv Ophthalmol*, 42(4): 360-366, 1998.
43. Palakurthy PR, Iyer V, Meckler RJ: Unusual neurotoxicity associated with amiodarone therapy. *Arch Intern Med*, 147: 881-884, 1987.
44. Jacobs JM and Costa-Jussa FR: The pathology of amiodarone neurotoxicity. II. peripheral neuropathy in man. *Brain*, 108: 753-769, 1985.
45. Fraser AG, McQueen I, Watt AH, Stephens MR: Peripheral neuropathy during longterm high-dose amiodarone therapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 48: 576-578, 1985.
46. Charness ME, Morady F, Scheinman MM: Frequent neurologic toxicity associated with amiodarone therapy. *Neurology*, 34: 669-671, 1984.
47. Haris L, Mckenna WJ, Rowland E, Holt DW, Storey GCA, Krikler DM: Side effects of long-term amiodarone therapy. *Circulation*, 67(1): 45-51, 1983.

48. Harris L, McKenna WJ, Rowland E, Krikler DM: Side effects and possible contraindications of amiodarone use. *Am Heart J*, 106: 916-921, 1983.
49. Nikolaou M, Ikonomidis I, Lekakis I, Tsiodras S, Kremastinos D: Amiodarone-induced epididymitis: A case report and review of the literature. *Int J Cardio*, 121: 15-16, 2007.
50. Gasparich JP, Mason JT, Greene HL, Berger RE, Krieger JN: Amiodarone-associated epididymitis: drug-related epididymitis in the absence of infection. *J Urol*, 133(6): 971-972, 1985.
51. Dobs AS, Sarma PS, Guarnieri T, Griffith L: Testicular dysfunction with amiodarone use. *J Am Cardiol* 18: 1328-1332, 1991.
52. Young B and Heath JW: Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas. Fourth ed., Churchill Livingstone Pub., Edinburg, 2000, pp. 328-341.
53. Junquiera LC and Carneiro J: Temel Histoloji (Çev. Y Aytekin ve S Solakoğlu) Nobel Tıp Kitapevleri, onuncu edisyon, 2003, s. 431-445.
54. Bozdoğan S: Erişkin erkek sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi. Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 2012, s. 4-21.
55. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-57, 1972.
56. Elmore S: Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495-516, 2007.
57. Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM: Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta*, 1757 (9-10): 1301-1311, 2006.
58. Renault TT and Manon S: Bax: Addressed to kill. *Biochimie*, 93(9): 1379-1391, 2011.
59. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G: Apoptosis in human sperm: Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, 17(10): 2665-2672, 2002.
60. Seli E and Sakkas D: Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update*, 11(4): 337-349, 2005.
61. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D: Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*, 66: 1061-1067, 2002.

62. Sakkas D, Mariethoz E, John JC: Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental Cell Research*, 251: 350-355, 1999.
63. Singh NP, Muller CH, Berger RE: Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil and Steril*, 80(6): 1420-1430, 2003.
64. Weng SL, Taylor SL, Mosrhedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S: Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, 8(11): 984-991, 2002.
65. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L: Putative creatine kinase M isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton Heat Shock Protein HspA2. *Biol Reprod*, 63(3): 925-932, 2000.
66. Pellissier JF, Pouget J, Cros D, Victor BD, Serratrice G, Toga M: Peripheral neuropathy induced by amiodarone chlorhydrate. *J Neuro Sci*, 63: 251-266, 1984.
67. Fernando RR, Itabashi H, Louie J, Anderson T, Narahara KA: Amiodarone toxicity: Myopathy and neuropathy. *Am Heart J*, 119(5): 1223-1225, 1990.
68. Bedrossian CWM, Warren CJ, Ohar J, Bhan R: Amiodarone pulmonary toxicity: Cytopathology, ultrastructure, and immunocytochemistry. *Ann Diagn Pathol*, 1: 47-56, 1997.
69. Choi I, Kim B, Cho K, Park J, Jang M, Shin M, Jung S, Chung J, Kim C: Amiodarone induces apoptosis in L-132 human lung epithelial cell line. *Toxicology Letters* 132: 47-55, 2002.
70. Lu J, Jones D, Harkema JR, Roth RA, Ganey PE: Amiodarone exposure during modest inflammation induces idiosyncrasy-like liver injury in rats: Role of tumor necrosis factor-alpha. *Toxicological Sciences*, 125(1): 126-133, 2012.
71. Matola TD, D'ascoli F, Fenzi G, Rossi G, Martino E, Bogazzi F, Vitale M: Amiodarone induces cytochrome c release and apoptosis through an iodine-independent mechanism. *J Clin Endocrinol Metabol*, 85(11): 4323-4330, 2000.
72. Pitsiavas V, Smerdely P, Li M, Boyages SC: Amiodarone induces a different pattern of ultrastructural change in the thyroid to iodine excess alone in both the BB/W rat and Wistar rat. *Eur J End*, 137: 89-98, 1997.
73. Nakazawa T, Murata S, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Katoh R: Histopathology of the thyroid in amiodarone-induced hypothyroidism. *Pathol Int*, 58: 55-58, 2008.

74. Yano T, Itoh Y, Yamada M, Egashira N, Oishi R: Combined treatment with L-carnitine and pan-caspase inhibitor effectively reverses amiodarone-induced injury in cultured human lung epithelial cells. *Apoptosis*, 13: 543-552, 2008.
75. Bargout R, Jankov A, Dincer E, Wang R, Komodromos T, Ibarra-Sunga O, Filippatos G, Uhal BD: Amiodarone induces apoptosis of human and rat alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278: 1039-1044, 2000.
76. Aitken RJ and Koppers A: Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Andro*, 13: 36-42, 2011.
77. Dilber E, Mutlu M, Dilber B, Aslan Y, Gedik Y, Celiker A: Intravenous amiodarone used alone or in combination with digoxin for life-threatening supraventricular tachyarrhythmia in neonates and small infants. *Pediatr Emerg Care*, 26(2): 82-84, 2010.