

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**SİKLOSPORİN A'NIN RAT TESTİS DOKUSUNDA OKSİDATİF –
ANTIOKSİDATİF DURUMA ETKİSİ VE ERDOSTEİNİN
KORUYUCU ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zafer SAK

Danışman

Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

HATAY – 2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**SİKLOSPORİN A’NIN RAT TESTİS DOKUSUNDA OKSİDATİF –
ANTIOKSİDATİF DURUMA ETKİSİ VE ERDOSTEİNİN
KORUYUCU ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zafer SAK

Danışman

Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

HATAY – 2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**SİKLOSPORİN A’NIN RAT TESTİS DOKUSUNDA OKSİDATİF –
ANTIOKSİDATİF DURUMA ETKİSİ VE ERDOSTEİNİN
KORUYUCU ROLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

Zafer SAK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 26/08/2013 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sedat MOTOR

Üye: Yrd. Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Bu tez, Enstitümüz Tıp Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen, akademik bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, en önemlisi de umudumun tükendiği noktada bana yeniden umut ve heyecan aşılayan değerli danışmanım Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı ve Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Desteklerini hissettiğim hocalarım Doç. Dr. Zafer YÖNDEN, Doç. Dr. Ahmet NACAR'a teşekkür ederim.

Deney aşamalarında, laboratuvar çalışmalarında ve tezin yazımında bana yardımcı olan Dr. A.Burak GÜRPINAR ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki Araştırma Görevlisi doktor arkadaşlara ve çalışanlara teşekkür ederim.

Kendisi de bir akademisyen olan ve yüksek lisans eğitimim boyunca beni sürekli teşvik eden, destekleyen ve maddi-manevi yardımını esirgemeyen biricik eşim Fatma Selin SAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Testis	3
2.1.1.Testis Embriyolojisi	4
2.1.2.Testisin İnmesi.....	8
2.1.3.Transabdominal Migrasyon.....	8
2.1.4.Proessus Vajinalis.....	9
2.1.5.Transinguinal İniş	9
2.2.Testis Anatomisi	11
2.2.1.Testisin Tabakaları.....	12
2.2.2.Funiculus Spermaticus	15
2.3.Testis Histolojisi	17
2.3.1.Tubulus Seminiferus Kontortus	17
2.3.2.Spermatogenez ve Spermatojenik Hücreler	20
2.3.3.Sertoli Hücreleri.....	21
2.3.4.İnterstisyel Doku.....	23
2.3.5.Leydig Hücreleri.....	23
2.4.Oksidatif Stres	26
2.4.1.Serbest Radikaller ve Oluşumları	27

2.4.2.Serbest Radikal Kaynakları	33
2.4.3.Serbest Radikallerin Etkileri.....	38
2.4.4.Lipidlere Etkileri.....	39
2.4.5.Proteinlere Olan Etkileri.....	40
2.4.6.Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	41
2.4.7.Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri	41
2.5.Antioksidan Savunma ve Mekanizmaları	41
2.5.1.Enzimatik Antioksidanlar	42
2.5.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	45
2.6.Siklosporin A(CsA)	47
2.7.Erdostein	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar.....	53
3.2. İlaçlar ve Uygulama Yolları.....	54
3.3. Cerrahi Uygulama.....	55
3.4. Histolojik Tekniklerin Uygulanması.....	55
3.5. Biyokimyasal Testlerin Uygulanması.....	58
3.5.1. Kullanılan Cihazlar.....	58
3.5.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	59
3.6. Analiz Yöntemleri.....	60
3.6.1. Süperoksit Dismutaz Ölçümü.....	60
3.6.2. Katalaz Ölçümü.....	61
3.6.3. Glutatyon Peroksidaz Ölçümü.....	63
3.6.4. Malondialdehid Ölçümü.....	64
3.6.5. Nitrik Oksit.....	65
3.7. İstatistiksel Analiz.....	68
4. BULGULAR.....	69
4.1. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle MDA Tayini İstatistik Verileri.....	71
4.2. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle CAT Tayini İstatistik Verileri.....	72
4.3. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle SOD Tayini İstatistik Verileri.....	73
4.4. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle GSH-Px Tayini İstatistik Verileri.....	74
4.5. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle NO Tayini İstatistik Verileri.....	75

4.6. Histopatolojik Testlerin Verileri.....	76
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ.....	87
7. KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	95

Şekiller Dizini

	Sayfa No
Şekil 2.1. Testis.....	3
Şekil 2.2. Beş Haftalık Bir Embriyoda Genital Sistem.....	4
Şekil 2.3. Intrauterin İkinci Ayda Testis ve Canalis Inguinalis.....	6
Şekil 2.4. Intrauterin Üçüncü Ayda Testis ve Canalis Inguinalis.....	7
Şekil 2.5. Intrauterin Yedinci Ayda Testis ve Canalis Inguinalis.....	7
Şekil 2.6. Intrauterin Dokuzuncu Ayda Testis ve Canalis Inguinalis.....	8
Şekil 2.7. Testisin Gelişimi.....	10
Şekil 2.8. Testis İçindeki Yapılar.....	11
Şekil 2.9. Testisi Saran Yapılar.....	12
Şekil 2.10. Tunica Vaginalis.....	14
Şekil 2.11. Tunica Albuginea.....	15
Şekil 2.12. Funiculus Spermaticus.....	16
Şekil 2.13. Erişkin Sıçan Testisi.....	18
Şekil 2.14. İnsan Testisi.....	19
Şekil 2.15. Sertoli Hücresi.....	22
Şekil 2.16. Leydig Hücreleri.....	24
Şekil 2.17. Oksidatif Stres.....	26
Şekil 2.18. Nitrik Oksit Sentezi.....	32
Şekil 2.19. Endojen Serbest Radikal Kaynakları.....	34
Şekil 2.20. Araşidonik Asit Metabolizması Sonucu Oluşan Serbest Radikaller.....	35
Şekil 2.21. Lipid Peroksidasyonu.....	40
Şekil 2.22. Siklosporin A'nın Kimyasal Yapısı.....	47
Şekil 2.23. Erdoste'in Açık Formülü.....	51
Şekil 4.1. MDA Seviyelerinin Gruplara Göre Dağılımı ($p < 0,05$).....	71
Şekil 4.2. CAT Aktivitelerinin Gruplara Göre Dağılımı ($p < 0,05$).....	72
Şekil 4.3. SOD Aktivitelerinin Tüm Gruplara Göre Dağılımı ($p > 0,05$).....	73
Şekil 4.4. GSH-Px Aktivitelerinin Tüm Gruplara Göre Dağılımı ($p > 0,05$).....	74
Şekil 4.5. NO Seviyelerinin Kontrol ve Diğer Gruplara Göre Dağılımı ($p < 0,05$).....	75
Şekil 4.6. Testis dokusunda normal tübül morfolojisi.....	77

Şekil 4.7. Siklosporin uygulanmış testis dokuda tübüler büzülme,hemoraji ve dejenerasyon.....	78
Şekil 4.8. Epitel bir Dekolman (→), Siklosporin Grubunda Azaltılmış Hücreliler (*) ve Dejenere Hücreler (kalın ok).....	79
Şekil 4.9. Siklosporin+Erdosteine Grubunda Minimal Dökülme (*) ve Dejenere Hücreler (kalın ok).....	80
Şekil 4.10. Erdosteine Grubunda Normal Tubul Morfolojisi.....	81

Çizelgeler Dizini

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Serbest Radikaller ve Tepkimeleri	28
Çizelge 2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücre İçi-Hücre Dışı Kaynakları	37
Çizelge 2.3. Serbest Radikallerin Hücredeki Başlıca Zararlı Etkileri.....	39
Çizelge 2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	42
Çizelge 3.1. Deney Grupları ve İlaç Uygulamaları..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	4
Çizelge 3.2. Kullanılan Cihazlar Listesi.....	58
Çizelge 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler Listesi.....	59
Çizelge 3.4. Grupların Histolojik Olarak Skorlanması.....	68
Çizelge 4.1. MDA, NO seviyeleri ile SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	70
Çizelge 4.2. Testis Dokuların Histopatolojik Değerleri.....	76

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

α	: Alfa
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ALC	: Erişkin leydig hücreleri
AOS	: Aktif oksijen türleri
ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin trifosfat
β	: Beta
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
BSA	: Bovin serum albümin
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CD4 ⁺	: Yardımcı T hücreleri
CD8 ⁺	: Sitotoksik T hücreleri
ClO ⁻	: Hipoklorit
cm	: Santimetre
CoA	: Koenzim A
CsA	: Siklosporin A
Cu	: Bakır
δ	: Delta
DM	: Diabetes Mellitus
Erdo	: Erdosteine
FADH ₂	: Flavin adenin nükleotid
Fe	: Demir
FMNH ₂	: Flavin mononükleotid
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
γ	: Gama
GER	: Granüler endoplazmik retikulum

GS	: Glutasyon radikali
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Hb	: Hemoglobin
H-E	: Hematoksilen-Eosin
IALC	: Genç erişkin leydig hücreleri
IL-2	: İnterlökin-2
IL-3	: İnterlökin-3
IL-4	: İnterlökin-4
ILC	: Genç leydig hücreleri
INSL3	: Faktör3 ya da relaksin
kg	: Kilogram
LH	: Lüteinizasyon hormon
m	: Metre
MALC	: Olgun erişkin leydig hücreleri
MDA	: Malonildialdehid
Mg	: Magnezyum
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Mangan
MPC	: Mezenşimal prekürsör hücreleri
NADH	: Redükte nikotin amid adenin dinükleotid
NBT	: Nitro Blue Tetrozolum
NFALC	: Yeni şekillenmiş erişkin leydig hücreleri
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O ₂	: Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali

O ₃	: Ozon
OH [·]	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
PAS	: Periodic asit-schiff
PLC	: Progenitör leydig hücreleri
PLGSH-Px	: Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz
ROO [·]	: Peroksil radikali
ROOH	: Hidroperoksit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SER	: Agranüler endoplazmik retikulum
-SH	: Tiyol
¹ O ₂	: Singlet oksijen
SOD	: Süperoksit dismutaz
±	: Standart sapma
T	: Timüs
TGF-β	: Transforming growth factor-beta
TNF-α	: Tümör nekrotizan faktör-alfa
UV	: Ultraviolet
XO	: Ksantin oksidaz
Zn	: Çinko

ÖZET

Siklosporin A'nın Rat Testis Dokusunda Oksidatif-Antioksidatif Duruma Etkisi ve Erdosteinin Koruyucu Rolü

Bu çalışmada, Siklosporin A (CsA)'nın rat testis dokusunda oksidatif-antioksidatif duruma etkisi ve erdosteinin muhtemel koruyucu etkisi biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle incelenmiştir.

Deneyde 32 adet Wistar albino erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı; Kontrol grubu (n=8), Siklosporin grubu (n=8, 20 mg/kg/gün i.p.), Siklosporin + Erdostein (n=8, Erdostein 12 mg/kg/gün oral), ve sadece Erdostein (n=8). 10. günün sonunda hayvanlar ketamin/ksilazin anestezisi (60/5 mg her 1 kg için) ile uyutuldu. Kanatma yöntemi ile öldürülen hayvanların testisleri çıkarıldı ve ikiye bölünerek bir parçası biyokimyasal incelemeler için -80 santigrat derecede saklandı, diğer parçası ise histopatolojik incelemeler için formaldehit solüsyonunda muhafaza edildi.

Testis dokusunda biyokimyasal incelemelerde; malonildialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) doku homojenatından; antioksidan enzimler olan katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaza (GSH-Px) homojenat süpernatandan; total superoksit dismutaza (SOD) etanol/kloroform ekstraktından manuel spektrofotometrik olarak çalışıldı. Histolojik incelemeler Hematoksilin-Eosin H-E boyama ile yapıldı ve ışık mikroskobu kullanıldı.

Biyokimyasal sonuçlarımıza göre lipid hasarı göstergesi olan MDA, Siklo grubunda kontrol ve Erdo gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde artış gösterdi. Bununla beraber Erdo ve Siklo+erdo gruplarındaki MDA düzeyleri, Siklo grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0,05$). Diğer bir oksidatif stres parametresi olan NO (nitrit/nitrat) düzeylerinde ise Siklo ve Siklo+erdo gruplarında, kontrol ve Erdo gruplarına göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Ayrıca Siklo+erdo grubuna ait NO düzeyleri, Siklo verilen gruba göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0,05$). Antioksidan bir enzim olan CAT, Siklo ve Siklo+Erdo gruplarında, Erdostein ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük aktivite gösterdi. Ayrıca Erdo grubunda Siklo ve Siklo+Erdo gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bir aktivite gözlemlendi ($p<0,05$). Diğer antioksidan enzimler olan SOD, GSH-Px aktivitelerinde ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi.

Histopatolojik sonuçlarımıza göre Siklosporin A'nın testis dokusunda; tübüler büzülme, hemoraji, dejenerasyon, tübüler epitelyumda; dökülme, ağır hücresel dejenerasyon ve hücre kaybı gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğu, Erdostein uygulanması ile Siklosporin A'nın neden olduğu histopatolojik değişiklikleri azaltabileceği histolojik boyama yöntemi ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak biyokimyasal ve histopatolojik bulgular, bir antioksidan olan erdosteinin siklosporin uygulanarak oluşturulan testis hasarına karşı koruyucu etkisini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Testis, Oksidatif Stres, Serbest Radikaller, Siklosporin, Erdostein

ABSTRACT

The Effects of Cyclosporine-A on Oxidative and Anti-oxidative Status and the Protective Role of Erdosteine in Rat Testis.

In the present study, the effect of CsA on oxidative-antioxidative status and the protective effect of erdosteine against cyclosporine-induced injury in rat testis was investigated with histological and biochemical methods.

In our experiment 32 Wistar albino male rats were used. The rats were randomly divided into four groups; Control group (n=8), Cyclosporine (n=8, 20 mg/kg/day i.p.), Cyclosporine + Erdosteine (n=8, Erdosteine 12 mg/kg/day orally) and only Erdosteine (n=8). At the end of 10th day, the animals were anesthetized with ketamin/ksilazin (60/5 mg per kg) and testis tissues were removed and divided two parts for histological and biochemical analysis.

The oxidative stress parameters such as malonildialdehit (MDA) and nitric oxid (NO) in tissue homogeneous; antioxidant enzymes such as catalaz (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in supernatan of homogeneous; and the other antioxidant enzyme total superoksit dismutase (SOD) in ethanol/cloroform extract of homogeneous were studied.

According to our biochemical results MDA, product of lipid damage, significantly increased in Cyclo group compared to Control and Erdo groups. However, MDA levels significantly decreased in Erdo and Cyclo+Erdo groups compared to Cyclo group ($p < 0,05$). NO (nitrite/nitrate) levels were significantly higher in Cyclo and Cyclo+Erdo groups than Control and Erdo groups. However, NO levels significantly decreased in Cyclo+Erdo group compared to Cyclo group ($p < 0,05$). CAT activities in Erdo group were significantly higher than Cyclo and the Cyclo + Erdo groups, while these activities in Cyclo and Cyclo + Erdo groups were significantly lower than Erdo and control groups ($p < 0,05$). There were no statistically significant difference among all groups in SOD and GSH-Px activities.

According to our histopathological results; the tissue of cyclosporine group showed some histopatological changes such as sinuzoidal dilatation, vacuolization in the hepatocytes, inflammatuar cell infiltration and hemorrhage. In the Cyclosporine plus Erdosteine group, histopatological changes of hepatic damage markedly reduced. Histological investigations were consistent with statistical results.

In conclusion these findings support that Erdosteine decreased cyclosporine induced testis injury.

Key words: Testis, Oxidative stres, Free Radicals, Cyclosporine, Erdosteine

1.GİRİŞ

Testisler bir çift organ olup, skrotum içinde spermatik kordon ile asılı dururlar ve birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar. Peritondan köken almış tunika vaginalis denilen seröz bir kese taşır. (Kaloğlu ve Gürsoy 1997). Testis, içi ve dışındaki boşaltma yolları, penis ve yardımcı bezler ile beraber erkek üreme sistemini oluştururlar. Testis üreme hücresi olan spermatozoonun üretildiği organdır (Abadir ve ark. 1979).

Testisler, iç ve dış salgı yapan birleşik tübüler karma bezlerdir. Hücre dışı salgısı, testis sıvısı ve spermiumdur. Hücre içi salgısı ise steroid yapıda testosteron hormonudur. Testislerin üreme ve hormon salgılama gibi iki önemli işlevi vardır.

Siklosporin A (CsA), 11 aminoasitten oluşan Tolypocladium inflatum mantarlarından elde edilen hidrofobik bir halkalı peptittir (Goodman ve ark. 1990). 1980 yılından sonra organ ve doku naklinde fazlaca kullanılmaya başlanan CsA, T hücrelerinin etkinliğini engelleyerek seçici bir immünsüpresif etki göstermektedir. Terminal yarılanma ömrü sağlıklı bireylerde 6.3 saatten ağır karaciğer hastalarında 20.4 saate kadar değişen CsA'nın dokulara geçen bölümü çok fazladır (Neoral® ve Sandimmune® 2007). Çok az miktarı ve metabolitleri idrarda çıkar, karaciğerde metabolize olur ve safrayla atılır.

CsA, esas toksik etkisini böbreklerde göstermekte ve bu oran %25-75'e kadar çıkmaktadır. Doza bağlı olarak artan bu etki, proksimal tübülüslerde kapiller ve endotellial düzeyde hasara neden olmaktadır. Glomerüler filtrasyonu azaltmakta, kreatinin ve BUN değerleri yükselmektedir. Karaciğer nakillerinde de nörotoksisite gözlemlenmektedir.

CsA'nın testis üzerine toksik etkileri anlaşılmış ve bu konuda birçok klinik ve deneysel araştırma yapılmıştır. Seethalaksmi ve ark. (Seethalaksmi ve ark. 1987), Rajfer ve ark. (Rajfer ve ark. 1987) CsA'nın testis, hipofizo testiküler aksa etkilerini araştırmışlardır. CsA testosteronda azalma, spermatogenetik arrest, Leydig hücre atroisi, dejeneratif farklılaşmalar ve anormal formlarda artmaya sebep olduğu bulunmuştur. Bu durumlar fertilitiyi negatif yönde etkimektedir.

CsA'nın dokularda oluşturduğu hasarın mekanizması tam anlaşılamamakla birlikte, elde edilen veriler serbest oksijen radikallerinin ve oksidatif stresin CsA bağlı patogeneizde rolü olduğunu düşündürmüştür (Rezzani ve ark. 2001, Rezzani 2006).

Olağan metabolizma sonucunda sağlıklı bireylerde meydana gelen reaktif oksijen radikalleri vücudun savunma mekanizması olan antioksidan sistem ile uzaklaştırılır. Sağlıklı organizmada oksijen radikalleri ile antioksidan savunma işleyişi tam bir denge durumunda çalışır. Bu dengenin radikaller lehine bozulması ile ortaya çıkan duruma “oksidatif stres” denir (Sorg 2004). Oksidatif stres doğal bir süreç olup bu stresi kontrol altında tutan antioksidan enzimler vardır. Bu koruyucu mekanizmaların yetersizliği halinde oksidatif hasar meydana gelir.

CsA'nın yan etkilerinin mekanizması tam anlaşılamamış olsa bile, beraberinde antioksidan ilaçların kullanılmasıyla birlikte toksisitesinin azalabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Rezzani 2006, Kuruş ve ark. 2008).

Erdosteinkronik pulmoner hastalıkların tedavisi için geliştirilen mukolitik bir ajandır. Bu ajan, ancak karaciğer metabolizması ile serbestleştirilebilen iki adet sülfhidril grubu içerir. Erdosteinin temizleyici ve antioksidan mekanizmasında bu iki sülfhidril grubu rol oynar (Dechant ve Noble 1996, Braga ve ark. 2000). Deneysel ve klinik çalışmalar, erdosteinin; antioksidan olarak serbest radikal oluşumunu önleyici fonksiyonları olduğunu göstermiştir (Biagi ve ark. 1989, İnglesi ve ark. 1994).

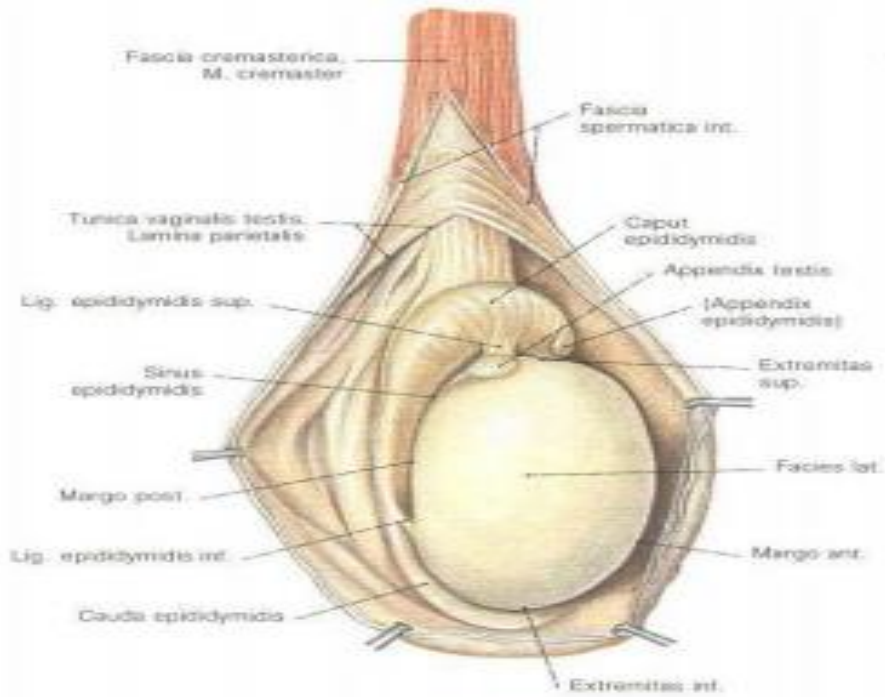
Oksidatif stres indirekt olarak lipid peroksidasyonu ürünü malonildialdehitin ölçümü ile belirlenebilir. Ayrıca nitrik oksit (NO), bir radikal olan peroksinitrit üzerinden nitrit ve nitrata yıkılabildiği için NO ve peroksinitritin oksidatif stresi artırma potansiyeli vardır (Rezzani 2004). Süperoksid dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz oksidatif hasarı önlemede rol almaktadır (Rezzani 2006). Çalışmalar erdosteinin aynı zamanda antioksidan etkinliği olduğunu düşündürmektedir (Oktar S ve ark. 2010, Dechant ve Noble 1996). Antioksidan maddelerin kullanımının siklosporinin bu yan etkilerini azalttığını gösteren çalışmalar vardır (Dechant ve Noble 1996, Braga ve ark. 1999).

CsA ile oluşturulan deneysel testis toksisitesine erdostein'in etkinliği ve bu etkinin oksidan-antioksidan parametrelerle gösterilmesi yapılmamış ve orijinal bir çalışmadır. Sonuç olarak bu çalışmada amacımız, CsA'nın testiste oluşturduğu toksik etkiye karşı, antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilen erdosteinin koruyucu etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelemektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

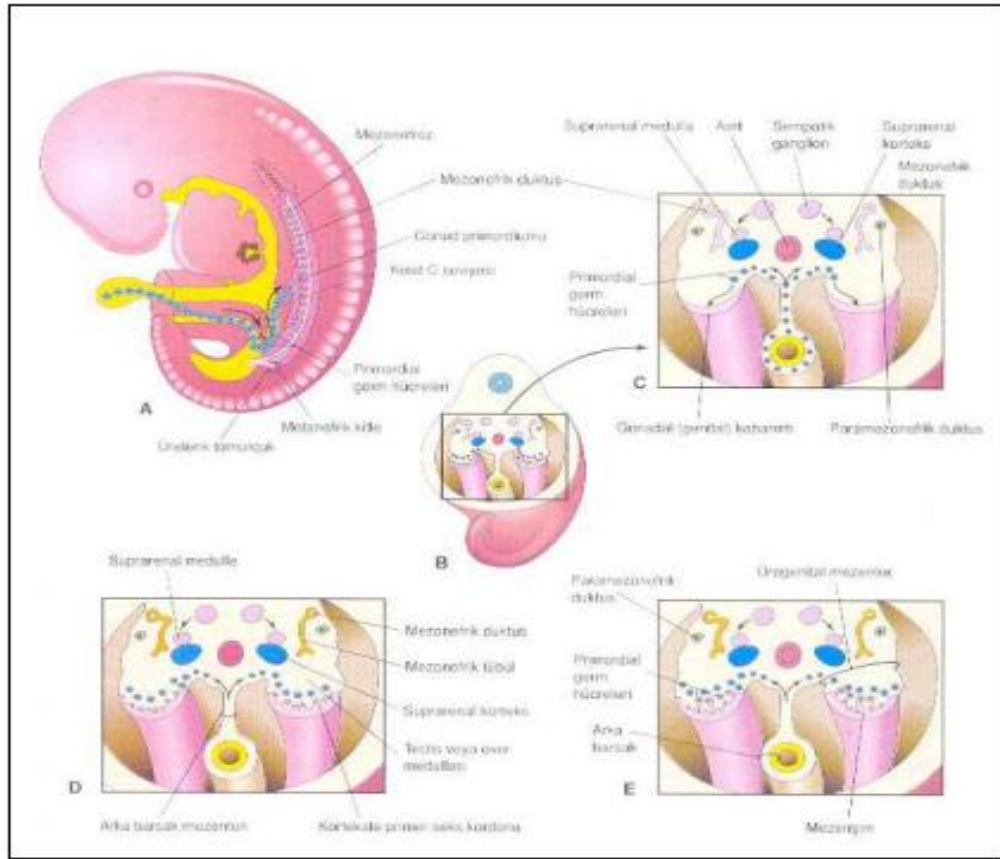
Testis, skrotum denilen deri bir torba içindeki bir çift organ olup; testis içi ve dışındaki boşaltma yolları, penis ve yardımcı bezler ile beraber erkek üreme sistemini oluştururlar. Testis üreme hücresi olan spermatozoonun üretildiği organdır. Testisin boşaltma yolları duktuli efferentes, duktus epididymis, duktus deferens, duktus ejakulatoryusla devam ederek prostatik üretraya açılır (Dellmann ve Brown 1987, Tanyolaç 1999). Epididimden gelen spermatozomlar veziküla seminalis, prostat ve bulboüretral bezlerden gelen salgılarla beraber ejakulat sıvısını oluşturarak penisten dışarı atılır. Testisin endokrin fonksiyonu da mevcut olup kan testosteron düzeyinin % 95-97'si testiste üretilir (Atabenli ve Erdemli 2002).



Şekil 2.1. Testis

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Testisler, doğum gerçekleşmeden önce yaşamın ilk iki ayında (embriyonal dönemde) karın içersinde 3-5. bel omurlarının iki yanında, böbreklerin altında ve karın arka duvarına asılı durumdadırlar (Dere 1994). Testis hücrelerini meydana getiren bezler olarak bilinen gonadlar, kölomik epitelin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan bir çift gonadal kabarıklık halinde belirirler. Gelişimim 6. haftasına kadar gonad içerisinde germ hücresi bulunmaz. Başlangıca ait (primordiyal) germ hücreleri, 4 haftalık embriyonun yolk kesesinin plasentayı oluşturan rahim zari allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Ameboid hareketlerle, son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve burada 6. haftada genital kabarıklıkları doldururlar.

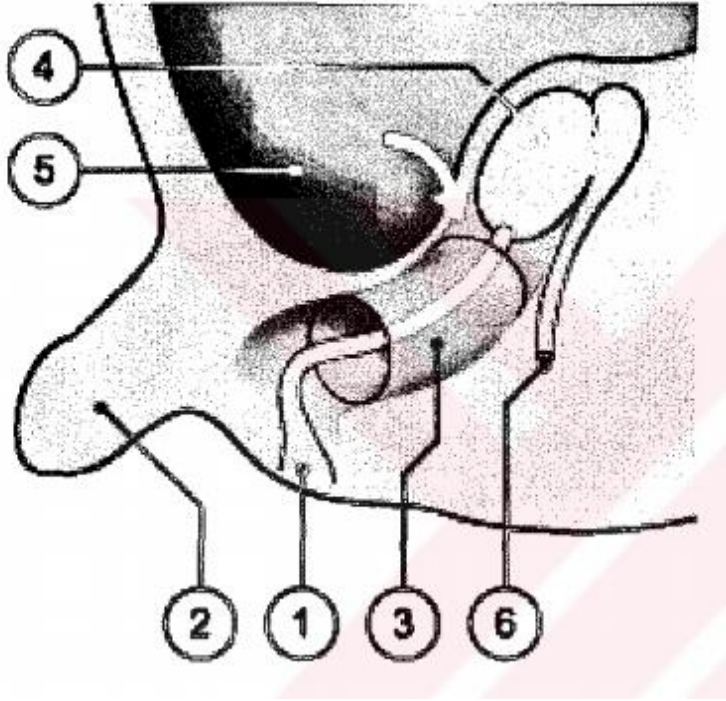


Şekil 2.2. Beş haftalık bir embriyoda genital sistem

Bu anda genital kabarıklığın kölomik epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altındaki mezenşim içine girerler. Burada primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Düzgün bir şekle sahip olmayan bu kordonlar yüzey epiteline bağlı durumdadır. XY cinsiyet kromozomu taşıyan primordiyal germ hücrelerinin Y kromozomundaki testis belirleyici etken etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederler ve medullar kordonları oluşturmak için iç kesimlere doğru ilerlerler. Bu kordonlar, bezin hilusuna doğru rete testis tübüllerini oluşturacak bir ağ şekline dönüşürler. Gelişim devam ederken daha ileri dönemde testis kordonları, tunika albuginea denilen yoğun fibröz bağ dokusu ile yüzey epitelinden ayrılırlar. Testis kordonları 4. ay'da at nalı benzer bir şekil alır ve bunların uçları rete testis ile devam eder.

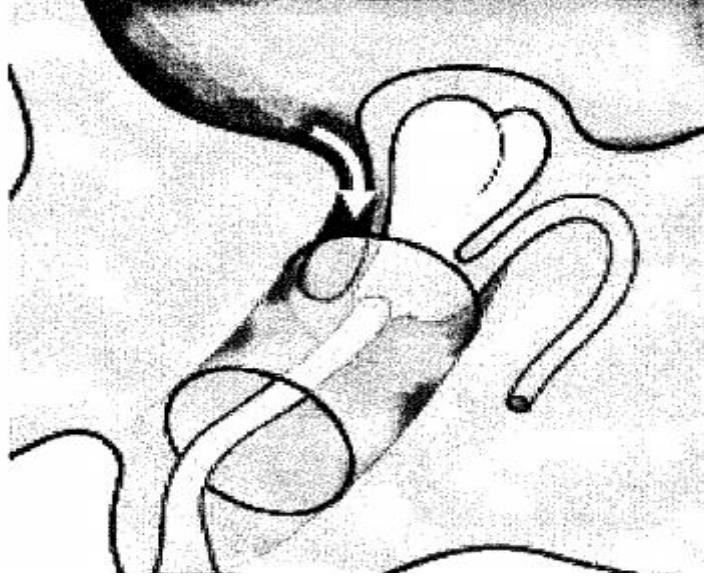
Testis kordonları, primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken alan Sertoli hücrelerinden meydana gelmiştir. Leydig hücreleri, genital kabarıklığın mezenşiminden köken alır, testis kordonları arasında bulunurlar ve kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Gebeliğin 8. haftasında Leydig hücreleri testosteron üretimine başlar. Puberteye kadar solid durumda kalan kordonlar, pubertede lümenleri açılarak seminiferöz tübüllerini oluştururlar. Seminiferöz tübüller kanalize olduktan sonra rete testis tübüllerine dahil olurlar ve daha sonra ductus deferenslere girerler (Sadler 2005).

Testisler (dördüncü aydan itibaren) aşağıya doğru inerler. Yedinci ayda kasık kanalı hizasında bulunurlar. Doğum dönemine gelindiğinde ise (sekiz ve dokuzuncu aylarda) yer değiştirmeleri hızlanır, canalis inguinalis'ten geçerek scrotum' inerler (descensus testis). Karın boşluğundan scrotuma geçme işlemi gubernaculum testis adı verilen fetal döneme ait fibröz bir yapının öncülüğünde başlatılır. Peritonda parmak küçük bir çukuru oluşturan processus vaginalis, gubernaculum testis'i izleyerek karın ön duvarından kese içine kadar ulaşır.

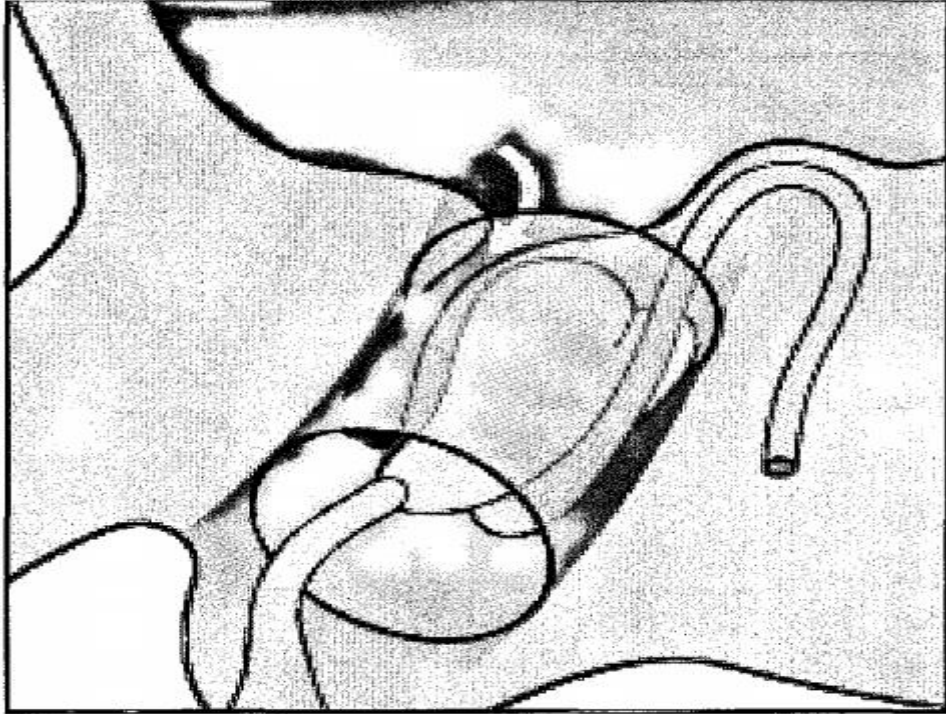


1. Gubernaculum
2. Penis
3. Canalis Inguinalis
4. Testis
5. Periton boşluğu
6. Ductus Deferens

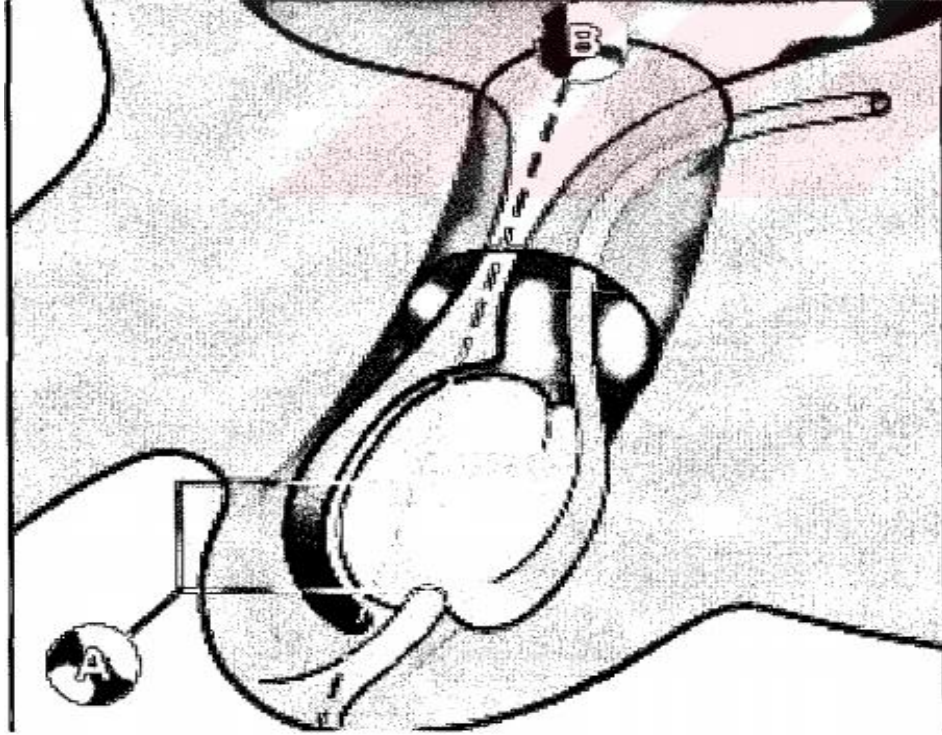
Şekil 2.3.Intrauterin ikinci ay'da Testis ve Canalis Inguinalis. Testis Canalis Inguinalis'in dışındadır, Periton henüz Canalis Inguinalis'e yönelmemiştir. Gubernaculum uzundur. <http://www.embryology.ch/anglals/ugenital/diffmorpho04.html> adresinden alınmıştır.



Şekil 2.4. Intrauterin 3.ay'da Testis ve Canalis Inguinalis. Testis ve Periton, Canalis Inguinalis'e yönelmiştir. Ductus Deferens ilk kıvrımını yapmıştır ve Gubernaculum kısalmaya başlamıştır. <http://www.embryology.ch/anglals/ugenital/diffmorpho04.html> adresinden alınmıştır.



Şekil 2.5. Intrauterin 7.ay'da Testis ve Canalis Inguinalis. Testis, Periton ve Ductus Deferens inguinal kanaldadır. Gubernaculum kısalmıştır. <http://www.embryology.ch/anglals/ugenital/diffmorpho04.html> adresinden alınmıştır.



Şekil 2.6. Intrauterin 9.ay'da Testis ve Canalis Inguinalis. Testis, Ductus Deferens Scrotum'a inmiştir. Periton yaprakları Scrotum'da Processus Vaginalis'i oluşturmuştur. Gubernaculum en kısa halini almıştır. <http://www.embryology.ch/anglals/ugenital/diffmorpho04.html> adresinden alınmıştır.

2.1.2. Testisin İnmesi

Olağan spermatogenezin gerçekleşmesi için testislerin 2-3 derece serin scrotuma inmesi gereklidir. Testisin embriyolojik inişi 3 aşamada gerçekleşir.

2.1.3. Transabdominal Migrasyon

Gebeliğin 6. haftasında; testisler, inguinal bölgeye yakın olan mezonefrozun medialinde yer almaktadır. Abdominal kavite ve fetüsün genişlemesiyle overler yukarı çıkarken, testisler göreceli olarak yerinde sabit kalır. Bu iki yapı arasındaki hareket farklılığının ana nedeni gubernaculumdur. Gonadal diferansiyasyondan önce, erkek ve dişi gubernaculumu; farklılaşmamış gonadın alt polünden genital kabartılara (erkek scrotumu ve dişide labia majorayı oluşturan yapılar) uzanım gösteren ince kısa bir bant yapıdan oluşmaktadır. Gubernaculum gelişimi erkeklerde mezenkimal proliferasyon ve hyalürik asit artışı ile gerçekleşir ve testisi sabitler. Diğer yandan dişilerde gubernaculum ince yapısını korur, fetal büyüme ile uzar ve overlerin yukarı çıkmasına neden olur. Erkeklerde,

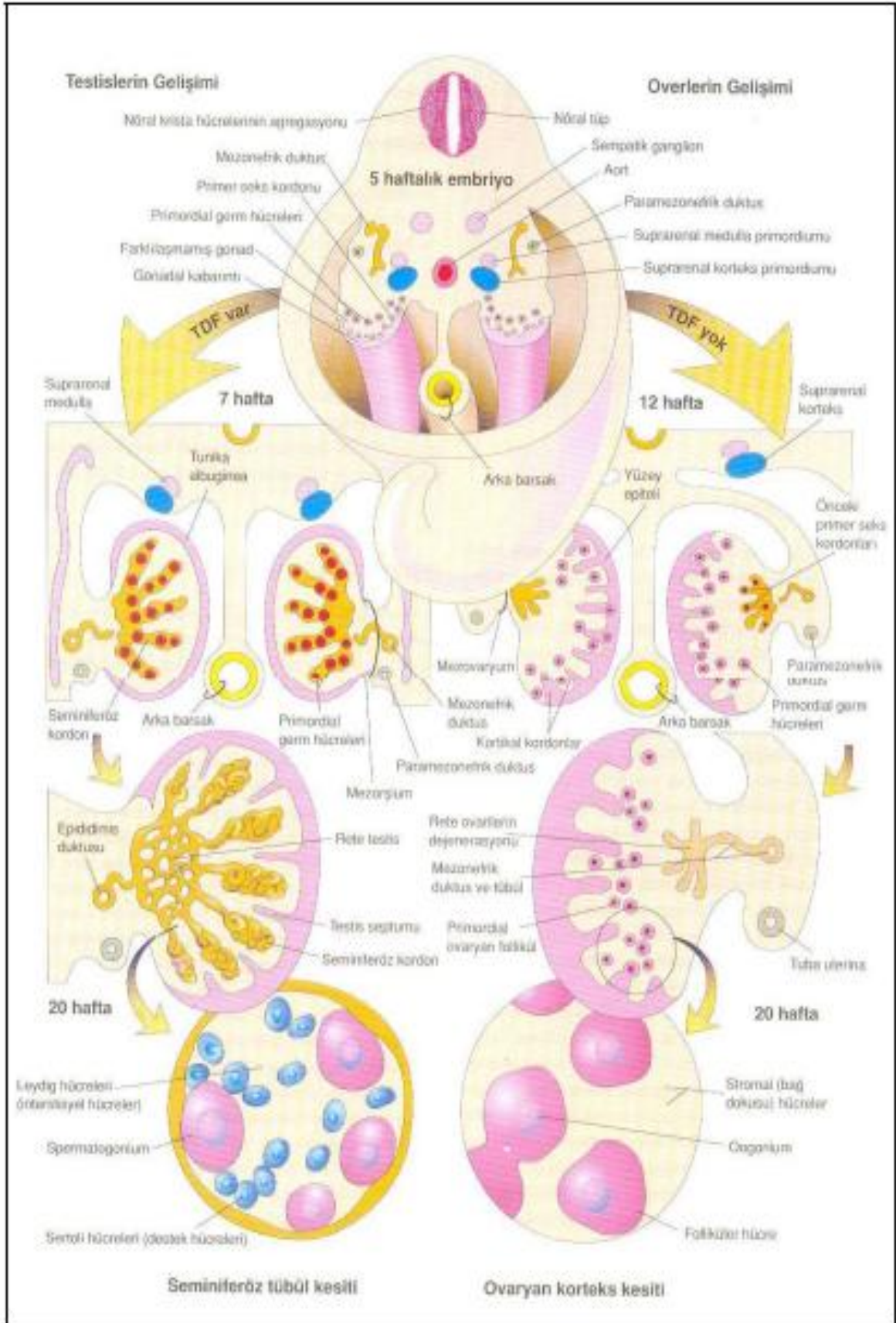
testisin transabdominal inişi sırasındaki gubernaculum gelişimi testiküler hormon olan insülin benzeri faktör 3 (INSL3) ya da diğer adıyla relaksin ile stimüle edilmektedir. Hayvan modellerinde (rat, fare, tavşan) yapılan çalışmalar göre, testis ve overlerin karın duvarında asılı kalmasını sağlayan ikinci bir ligaman (kraniyal gonadal süspansör ligaman) olduğu bilinmektedir. Erkek deney hayvanlarında testosteron kraniyal gonadal süspansör ligamanın regree olmasına bununla testisin kaudal yönde mobilizasyonuna olanak sağlamaktadır. Dişilerde ise bu ligaman testosteronun olmaması ile beraber varlığını sürdürmekte ve overin kaudal hareketini kısıtlamaktadır. İnsanlarda kraniyal süspansör ligaman, varlığını sürdürmekle beraber işlevsiz kalmış ve atıl duruma düşmüştür. Kısaca INSL3 gubernaculumun gelişimine; androjenler ise kraniyal süspansör gonodal ligamanın regrese olmasına ve böylece 12. haftada testisin internal inguinal halka seviyesinde sabit kalmasına sebep olmaktadır.

2.1.4. Proessus Vajinalis

Gebeliğin 3. ayında peritondan bir cep olarak uzanan proessus vajinalis, gubernaculum boyunca gelişip kısmen çevresini de sararak inguinal kanal ve scrotumda potansiyel bir boşluk oluşturur. Testisler fetal yaşamın 3. ve 7. ayları arasında sabit durur. Bu sürede gubernaculum ve proessus vajinalis ise inguinal kanal yolu ile scrotuma doğru hareket ederek testiküler iniş için bir yol hazırlar.

2.1.5. Transinguinal İniş

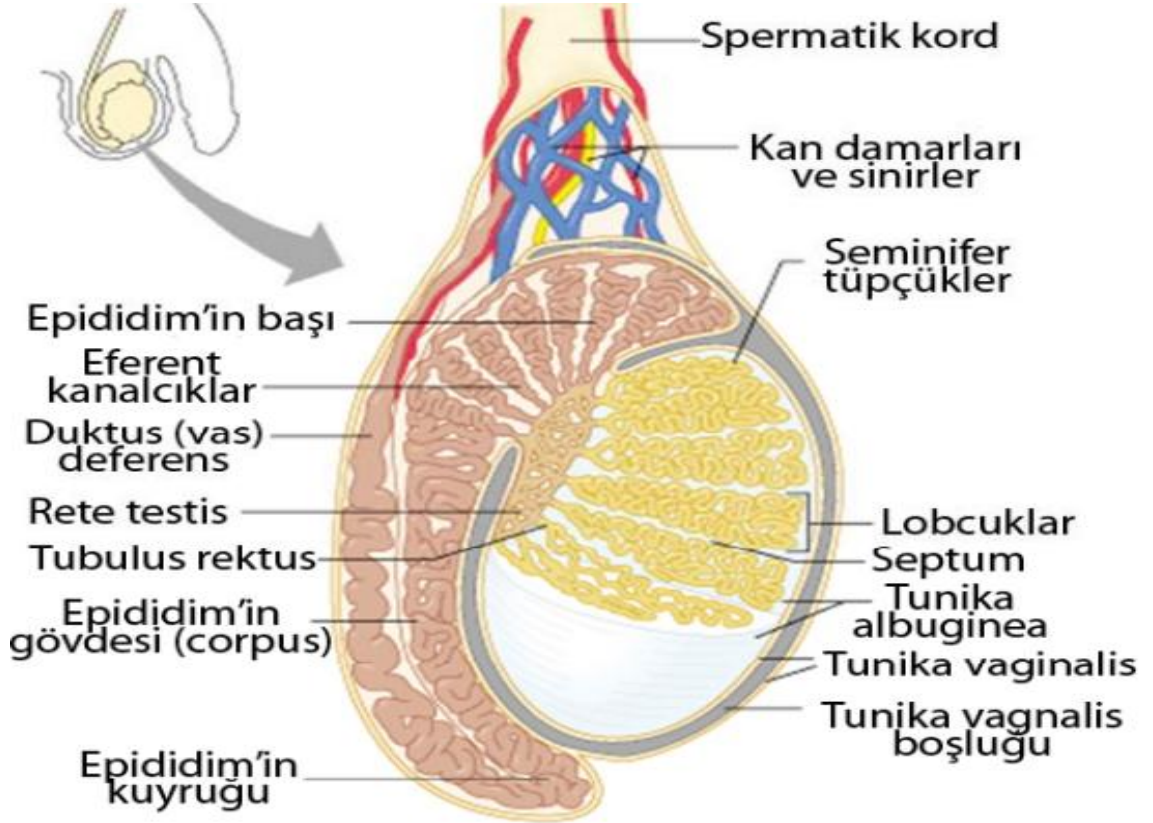
Gebeliğin 24-35 haftaları arasında testiküler inişin son fazı çok hızlı bir şekilde gelişir. Bu esnada testosteron, uzamış ve maskulinize olmuş gubernaculumun viskoelastik özelliklerini azaltarak kısaltır. Aslında proessus vajinalis doğumdan önce bütünüyle kapanır fakat testis inmediğinde, proessus vajinalis açık kalır ve bu durum inguinal kanalın iç halkasının açık olması ile sonuçlanır.



Şekil 2.7. Testisin Gelişimi

2.2. Testis Anatomisi

Testis;4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm kalınlığında, 30 ml hacminde funiculus spermaticus'u oluşturan yapılarla birlikte scrotum içinde asılı duran oval şekilli, eşey hücresi (spermium) ve erkeklik hormonu (testosteron) üreten bir çift bezdir. Yaklaşık olarak ağırlığı 10-14 gr.dır. İç ve dış yüzleri (facies medialis, facies lateralis); ön ve arka kenarları (margo anterior, margo posterior); üst ve alt uçları vardır (extremitas superior, extremitas inferior). Scrotum içinde hareketli ve sarkık olarak dururlar. Büyüklüğü değişiklik gösterebilir. Arka kenarına funiculus tutunmuştur. Arka kenarların yan kısımlarına bağlanmış olarak epididimis bulunur. Genellikle sol testis 1 cm kadar daha aşağıda bulunur. Testisler basınca karşı çok hassastırve bazı ile işlevlerini yitirirler. Olağan karın içi sıcaklıkta işlev göstermezler. Aşırı düzeydeki ısı değişimlerinden de etkilenirler (Williams ve ark. 1989).

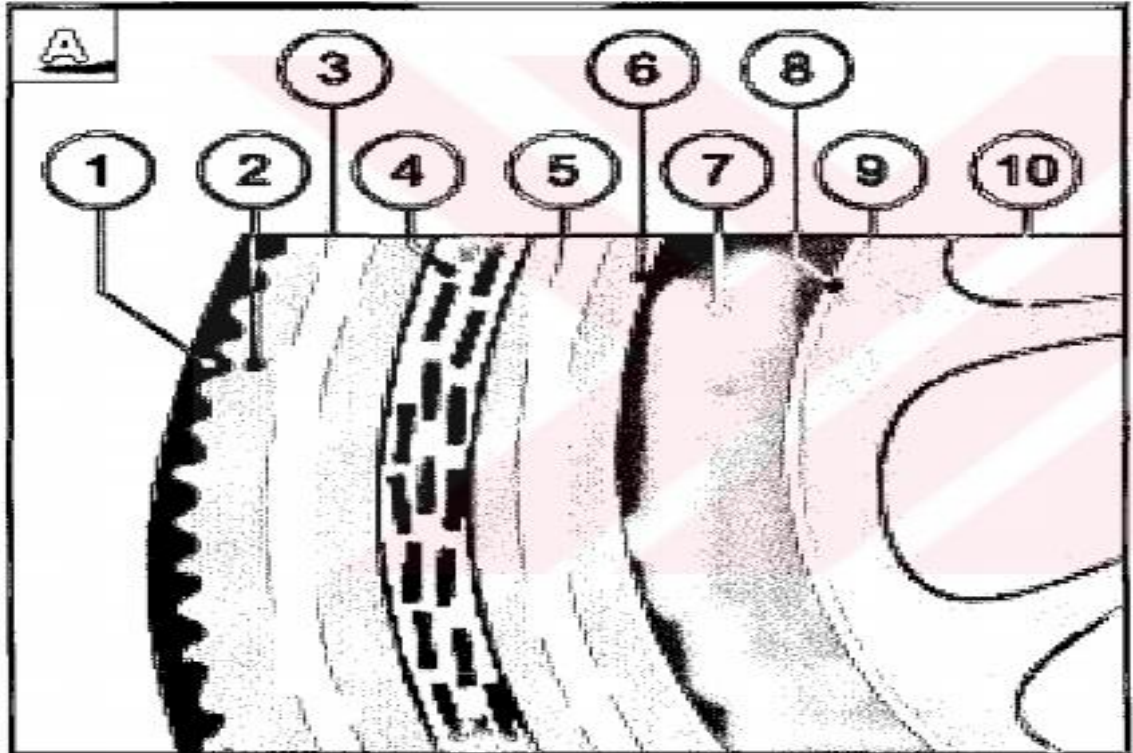


Şekil 2.8. Testis içindeki yapılar

2.2.1 Testis'in Tabakaları

Testis, scrotum'a iniş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürükler. Bundan dolayı aşağıda gösterilen tabakalarla kaplıdır.

1. Epidermis
2. Dermis (Tunica Dartos)
3. Fascia spermatica externa
4. Musculus Cremaster
5. Fascia spermatica interna
6. Tunica vaginalis-Lamina parietalis
7. Tunica vaginalisin Lamina parietalis ve vaginalis yaprakları arasındaki cavitas vaginalis
8. Tunica vaginalis-Lamina vaginalis
9. Tunica albuginea
10. Septum interlobularis testis



Şekil 2.9. Testis'i saran yapılar

<http://www.embryology.ch/anglais/ugenital/diffmorpho04.html> adresinden alınmıştır.

1. Epidermis

2. Dermis-Tunica Dartos

Yukarıda perine ve abdomenin fascia superficialis'leri ile devam eder. Ortada içe doğru bir septum yapar. Bu septum iki testis için iki boşluk ayırır. Tunica Dartos haricindeki deriye sıkıca yapışmıştır. İçindeki tabakalar üstünde ise kolayca kayabilir. Çok damarlı bir yapıya sahiptir ve yağ miktarı 0'dır.

3. Fascia Spermatica Externa

Karın bölgesindeki m.obliquus abdominis'in (Gallaudet) fascia'sının devamıdır. Testis'i ince bir zar şeklinde sarar. Dartos'la arasında bir fascia aralığı vardır.

4. Musculus Cremaster

Musculus Cremaster karındaki m.obliquus abdominis internus'un liflerinin aşığı doğru devamıdır. İ ve dış yüzleri aynı kasın fascia uzantıları tarafından sarılmıştır. Bu tabakanın innervasyonunu n. genitofemoralis'in r. femoralis'i sağlar. Bundan dolayı klinik açıdan önemli bir refleks yol oluşturur. Uyluk i bölümün uyarılması sonucunda musculus cremaster'in kasılmasına bağlı olarak testisler yukarıya, karın alt tarafına doğru çekilir (cremaster refleksi). Bu refleksin afferent yolunu n.genitofemoralis'in r. femoralis'i; efferent yolunu ise sinirin r. genitalis'i sağlar.

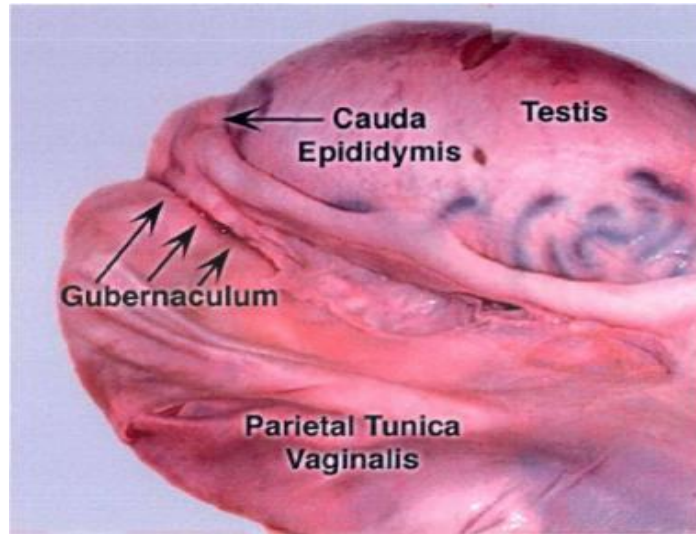
5. Fascia Spermatica Interna

Karındaki fascia tarsnversalis'in devamıdır. Cremaster tabakasından ayrılması zor, testis ve funiculus'tan ayrılması kolaydır. Fascia spermatica interna, ite testisleri kuşatan periton kökenli tabakalardan tunica vaginalis testis'in parictal yaprağına gevşek olarak tutunur. Fascia spermatica interna tabakası ayrıca funiculus spermaticus, testis ve epididimis'i de sarar.

6. *Tunica Vaginalis*

Periton'un uzantısıdır. Bir seröz zar kesesinden ibarettir. Testislerin inişi sırasında periton saccus vaginalis denilen bir uzantı şeklinde scrotuma sürüklenir. Daha sonra saccus vaginalis'in üst kısmı kapanır. Tunica vaginalis testis'i oluşturan tabakalar arasındaki boşlukta mesorchium (testisin mesenterium'u) aracılığı ile asılı durumdadırlar. Tunica vaginalis, testislerin inmesi sırasında karın içinden scrotum'a taşınan periton yapraklarını içeren 2 tabakadan oluşur.

- a. **İç tabakası (*epiorchium-lamina visseralis*):** epididimis ve testis'in büyük kısmını kaplar. Arkada scrotum'un iç yüzüne atlar.
- b. **Dış tabakası (*periorchium-lamina parietalis*):** testisi tümüyle içine aldığı gibi bir miktar funiculus'da da devam eder. İki yaprak arasındaki boşluğa *cavitas vaginalis* denir.



Şekil 2.10. Tunica Vaginalis

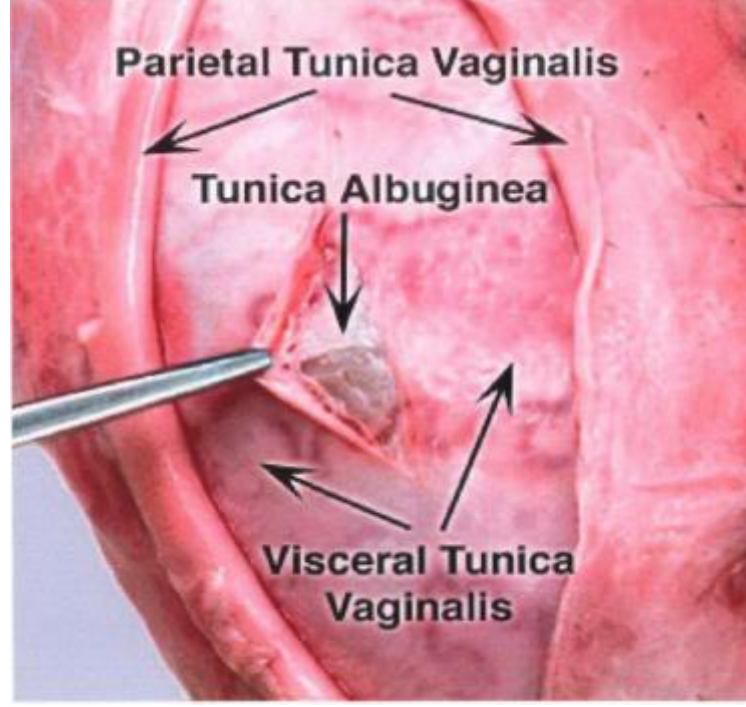
7. *Cavitas Vaginalis*

Tunica vaginalisi oluşturan periton yaprakları arasında boşluk bulunur. İki yaprak arasındaki boşluğa *cavitas vaginalis* denir.

8. *Lamina Vaginalis*

9. *Tunica Albuginea*

Tunica Albuginea esnekliği ve genişleme özelliği olmayan, Tunica Vaginalisin iç tabakasında bulunan visseral yaprağının iç tarafında yer alan sağlam yapılı bir zardır (Williams ve ark. 1989).



şekil 2.11. Tunica Albuginea

10. *Septum İnterlobularis Testis*

2.2.2. Funiculus Spermaticus

Annulus inguinalis profundus'tan testise kadar uzanan bir koridordur. Canalis inguinalis içinden eğik olarak geçer. Önce m.obliquus internus'un altında fascia transversalis'in üstündedir. Pubis yakınında lig.inguinale ve lig.lacunare'nin üstünden geçer. Burada m.obliquus eksternus aponevnoz kord'un önünde, falks inguinalis arkasında kalır. Annulus inguinalis superficialis'ten çıkıp, dikey olarak testise iner. Sol funiculus sağdan daha uzuncadır (Dere 1994).

Funiculus içinde şu oluşumlar bulunur.

a. Fascia spermatica eksterna

b. Cremaster tabakası

c. Plexus Pampiniformis

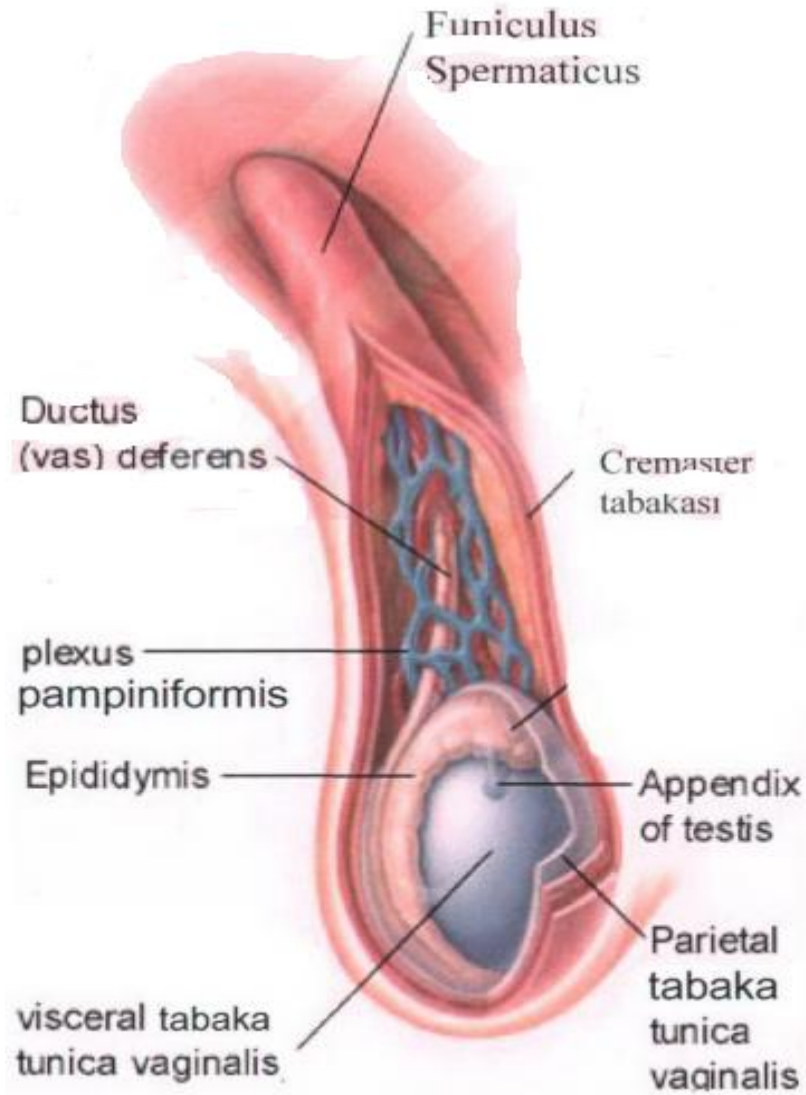
d. A.testicularis

e. A.ductus deferentis

f. A.spermatica eksterna

g. Ductus deferens

h. Plexus testicularis



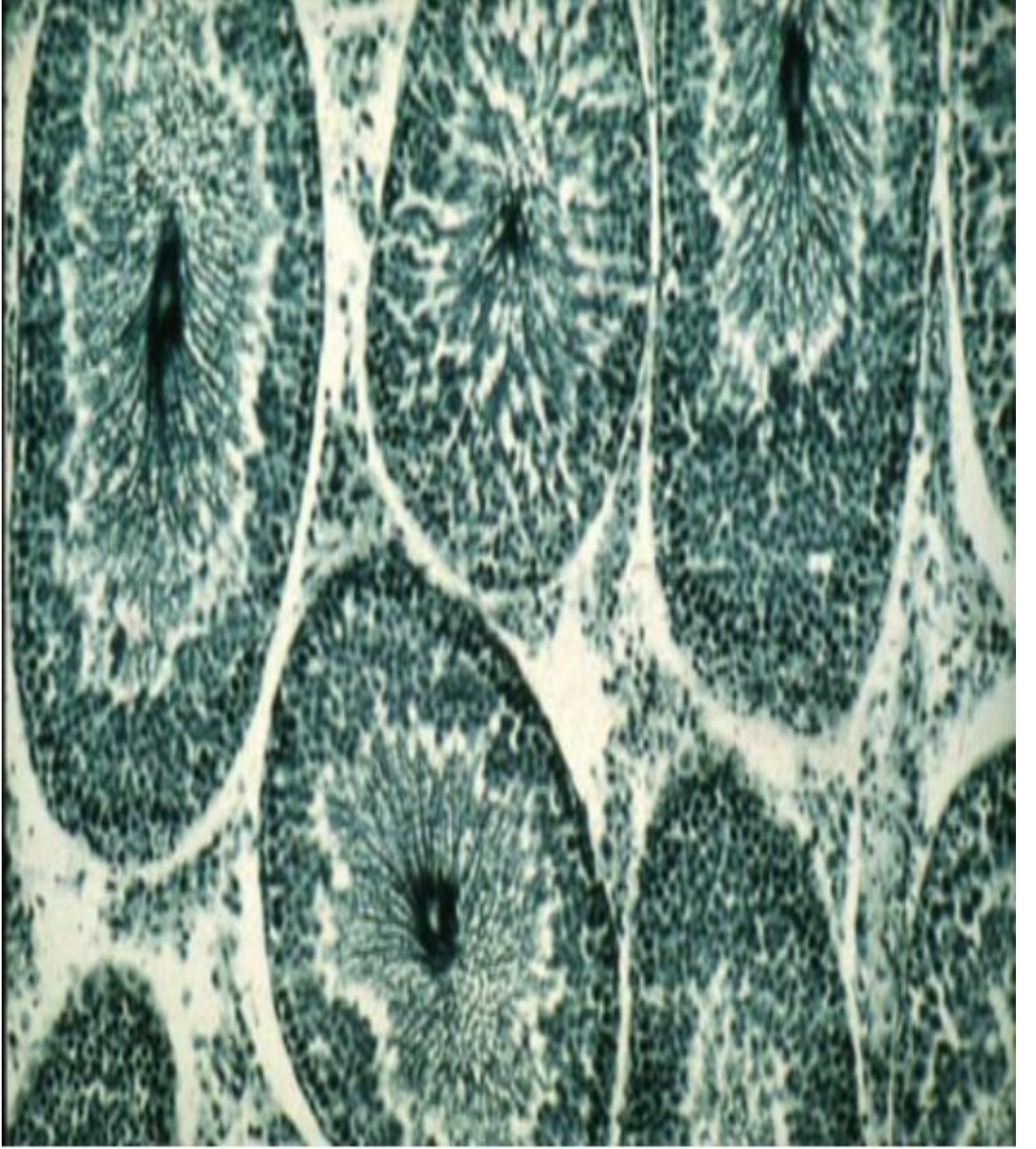
Şekil 2.12. Funiculus Spermaticus

2.3. Testis Histolojisi

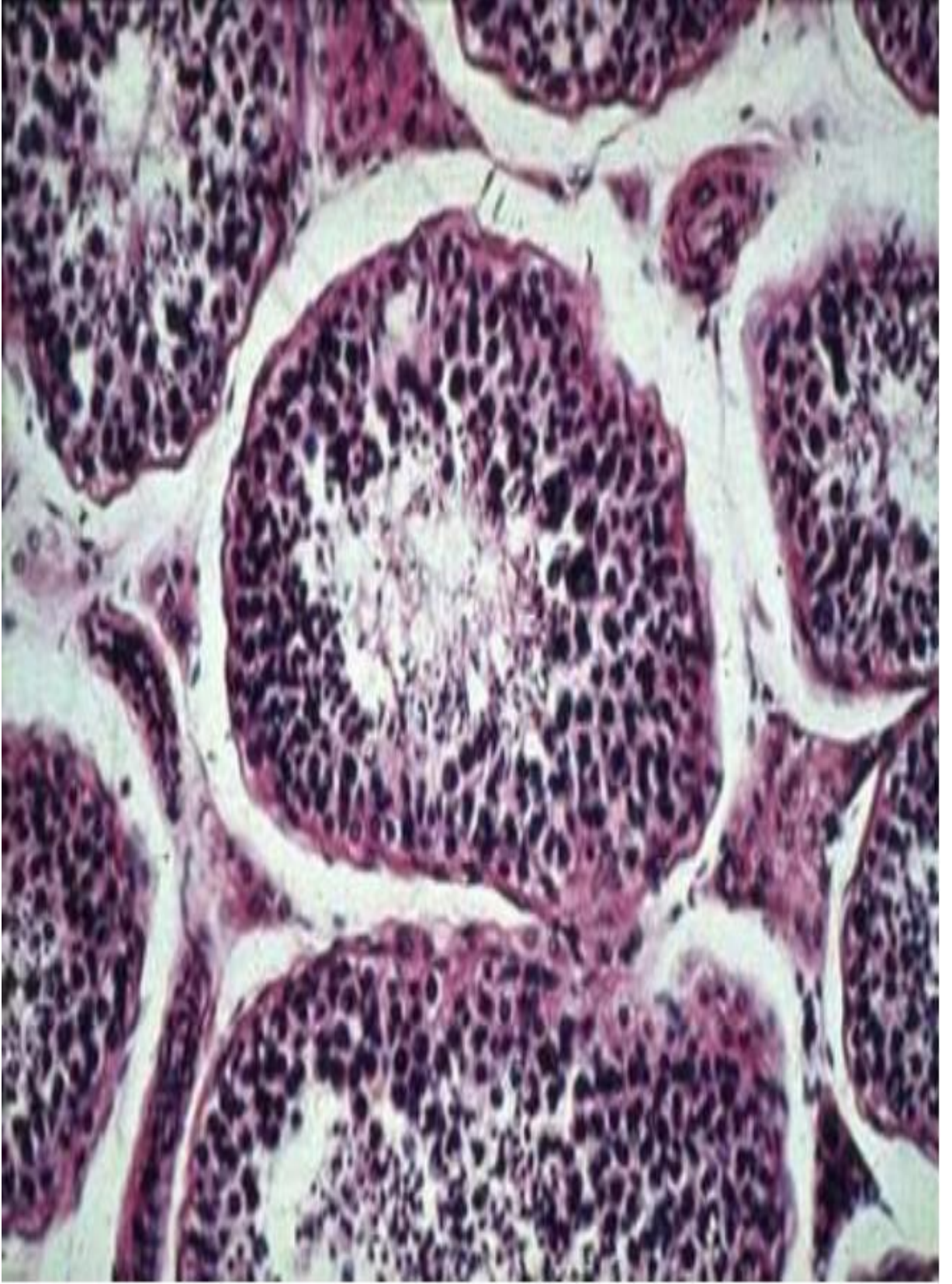
Sıçan ve insan parankim dokusu birbirine benzerlik gösterip, septula testis denilen ince fibröz bölmelerle piramit şekilli lobüli testislere ayrılır (Erkoçak 1980). Centripetal arterler testiküler septa içinde bulunarak rete testisten önce rekürren arterlere dallanır, rekürren arterler lobüllere nüfuz eder ve her lobül bu arterler vasıtasıyla kanlanır (Ergün ve ark. 1994). Bu arterlerden 300µm'luk aralıklarla segmental arterioller çıkar. Arteriollere ayrılan segmental arterler interstisyumda kapiller damarlara dönüşür. Bu damarlar bazı bölgelerden Leydig hücreleri ile sarılmıştır. Lamina propriyada da kapiller damarlar mevcuttur.

2.3.1. Tubulus Seminiferus Kontortus

Yapı olarak her biri yaklaşık 150-250µm çapında, 30-70 cm uzunluğunda, ikili-üçlü anastomozlar yapan, kıvrımlı borucuklardır. İnsan testisinin her birinde toplam uzunlukları yaklaşık olarak 250 m kadardır. Bu tübüler yapılar testisin % 92'sini oluşturur. Çevresinde lamina propriya olan her tübül duvarı seminifer epitelyumu ile döşelidir. Seminifer epitelyumu oluşturan başlıca iki tür hücre vardır; Bunlar Sertoli hücreleri ve spermatojenik seri hücreleridir (Ergün ve ark. 1994).



Şekil 2.13. Erişkin sıçan testisi



Şekil 2.14. İnsan testisi

Sıçan ve insan germinal hücreleri tubulus seminiferous içinde katmanlar halinde bulunur ve benzerlik gösterir. Sıçan ve insan seminifer tübülleri Şekil 2.13 ve Şekil 2.14'te gösterilmiştir (www.keele.ac.uk).

Germ hücreleri seminifer tubul içerisinde 4-8 katmanlı kalın bir epitelyum oluşturur. Tübülüsün bazalından lümenine doğru germ hücreleri farklılaşır. Proliferasyonla hücreler lümenine doğru itilir (Leeson ve ark. 1985). İlk sıradaki hücreler, bazal membran üzerine oturan geniş tabanlı Sertoli hücreleri ile bunların arasında yer alan çok sayıdaki spermatogonyumlardır (Tanyolaç 1999). Sertoli hücreleri bazal laminadan tübülüsün lümenine doğru uzanır (Johnson 1991). Spermatogonyumların büyümesiyle oluşan primer spermatositler en büyük germ hücreleridir. Sekonder spermatositler, primer spermatositlerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu hücreler lümenal yüze doğru uzanmışlardır (Leeson ve ark. 1985). Yuvarlak ve tübülüsün lümenine ulaşmış olan küçük spermatidler, başkalaşım geçirmek üzere Sertoli hücrelerinin sitoplazma oyuntularına gömülürler ve bir süre sonra o türe özgü şekillerini kazanarak, gelişmelerini tamamlamış spermatozoon olurlar (Tanyolaç 1999). Spermatozoonlar başkalaşımını bittikten sonra epitelyum katmandan ayrılarak lümenine geçer (Leeson ve ark. 1985).

2.3.2.Spermatogenez ve Spermatojenik Hücreler

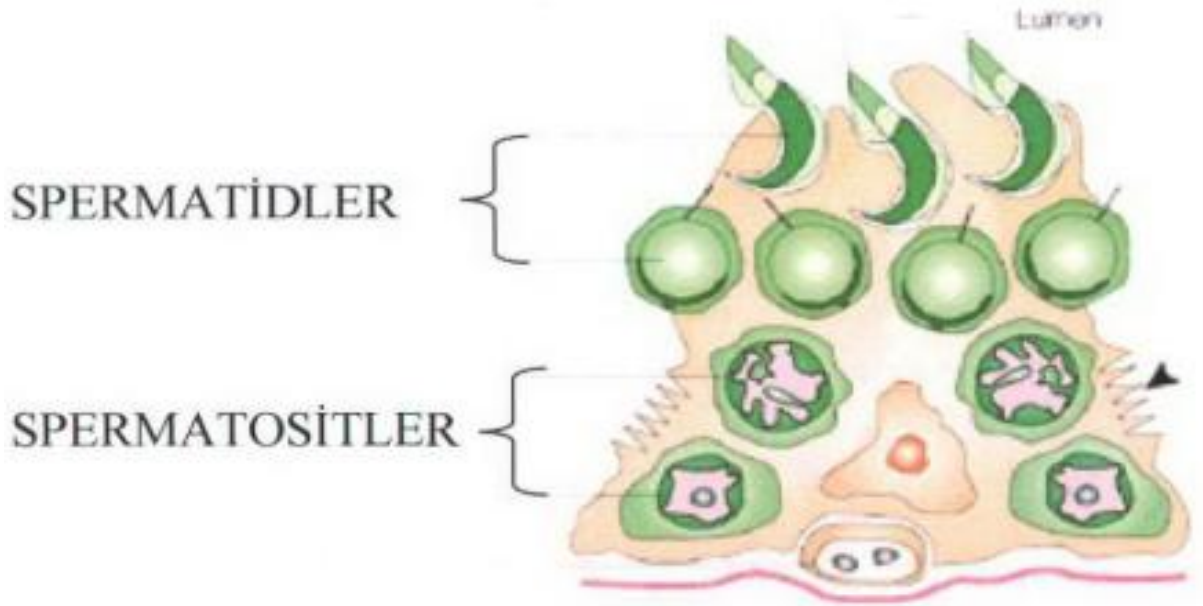
Spermatogenez, diploid kromatin içeriğine sahip spermatogonyumların ileri derecede özelleşmiş haploid kromatinli spermatozoonlara dönüştüğü süreçtir. Spermatojenik hücreler seminifer tübüllerde bazal lamina ile lümen arasında yerleşik 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş olup üç ana gelişim aşaması gösterirler; 1- Spermatogoniyal faz; spermatogenez, 2- mayotik faz; mayozis, 3- spermatid faz; spermiyositogenez (Ross ve Romrel 1989).

Spermatozoon üretimi puberte ile başlar ve bir testiste günlük olarak 50-150 milyon spermatozoon üretilir (Ross ve Romrel 1989). Olgun spermatozoon üretimi insanda 70 ± 4 günlük bir zamanda tamamlanır. Bu duruma benzer bir süreç sıçanlarda da gelişir ve yaklaşık 50 ± 4 gün sürer. Seminifer epitelyum siklusu; epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan olgunlaşma değişiklikleri dizisini anlatır. Bu dönemler; sıçanda 14, fare ve maymundada 12, insanda 6 basamaklıdır (Ross ve Romrell 1989). Prespermatogonik germ hücrelerinin spermatogonyumlara başkalaşması bazal lamina ile temaslarına bağlıdır (Ichkowski ve ark. 1991).

Belirgin bir çekirdeği olan primer spermatozoid serinin en büyük hücresidir(Ross ve Romrell 1989). Primer spermatozoidten birinci mayotik bölünmeyle oluşan sekonder spermatozoid birkaç saatlik bir ömre sahip olduğu için kesitlerde çok az görülür. Akrozomun oluşumu, flagellumun gelişimi, çekirdek şekil ve büyüklüğündeki değişiklikler, kromatin yoğunlaşması ve artık stoplazmanın atılmasıyla karakterize olaylar sonucu olgun spermatozoon oluşur. Biçimsel olgunlaşmalarını tamamlayan germ hücreleri seminifer tübül epitelyumundan lümeneye serbestleştirilir. Bu duruma spermiasyon denir.

2.3.3. Sertoli Hücreleri

Destek hücreleri de denilen Sertoli hücreler, bazalden lümeneye uzanan büyük, prizmaya benzeyen hücrelerdir. Sertoli hücreleri tübül boyunca düzgün aralıklarla yerleşim gösterir ve hücreler arasında bazale yakın yerde özel tip bağlantılar bulunmaktadır. Üçgen ya da oval şekilli çekirdek büyük olup, 1-2 belirgin çekirdekçik içerir. Bu çekirdeğin en önemli özelliği bir yada daha fazla derin invaginasyonlar göstermesidir. Sertoli hücreleri elektron mikroskopuyla incelendiğinde sitoplazmalarının bolca lipid damlacıkları içerdiği görülür. Bunun yanında yaygın agranüler endoplazmik retikulum (SER) sisternaları, gelişmiş granüler endoplazmik retikulum (GER), dağınık durumda serbest ribozomlar, primer ve sekonder lizozomlar, glikojen granülleri, mikrotübüller ve filamanlara sahiptir. İnsan sertoli hücrelerinde nadir olarak protein yapısında olduklarına inanılan ve çekirdek yakınında yer alan kristalloid cisimcikler olan kristali Charcot-Böttcher kristali görülebilir. Sitoplazmada çok miktarda görülen elektron dens cisimcikleri, steroid senteziyle ilgili oldukları düşünülür. Sitoplazmada içerisindeki mitokondriyonlar, tübüler tipte olup şekil değiştirirler. Bunun yanı sıra fincan şekilli mitokondriyonlar ve protüzyon mitokondriyonlar diye tanımlanan özel tipteki mitokondriyonlar özellikle agranüler endoplazmik retikulumun genişlemiş bir keseciğe doğru ağzlaşma gösterir. Tüm bu organeller yanında gelişmiş bir Golgi komplekside sitoplazmada yer almaktadır.



Şekil 2.15. Sertoli Hücresi

Puberteye kadar sertoli hücreleri, seminiferöz epitelin dominant hücre tipidir. Bu dönemden sonra, seminiferöz tübüleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatojenik hücre popülasyonu azaldığı zaman, Sertoli hücreleri yeniden seminiferöz epitelin temel unsuru haline gelir.

Sertoli hücreleri, bazolateral bölgelerinde komşu Sertoli hücreleri ile okludens türü bağlantıları oluştururlar. Bazolateral okludens bağlantılar, adluminal ve bazal diye seminiferöz epiteli iki kompartmana bölerler ve gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün tepkimelerden koruyan kan-testis bariyerinin temel yapısını oluştururlar (Ross ve Pawlina 2006, Abraham 2006).

Sertoli hücrelerinin görevleri :

- 1- Spermiyogenezin sonunda atılan rezidüel cisimcikleri fagosite etmek,
- 2- Gelişmekte olan spermatojenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,
- 3- Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, spermiyasyon sürecinde, seminiferöz tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,
- 4- Seminiferöz tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak,
- 5- Folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemek. Bu protein seminiferöz tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar.

6- Anteriyor hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen; inhibin ve uyarıcı; aktivin denilen peptidleri salgılamak,

7- Anti-Müllerian (Müllerian inhibe edici) hormonu üretmek. Bu hormon embriyonik gelişim sırasında, erkek fetusta Müller (Paramezofrenik) kanallarının gerilemesini sağlar (Ross ve Pawlina 2006) ve (Junquera ve ark. 2005).

2.3.4. İnterstisyel Doku

Seminifer tübülleri arasında kalan alan; kan, gevşek bağ dokusu, lenfatik damarlar ve sinirleri içerir. Testis interstisyel dokusunun %35'i bağ dokusu ve %12'si endokrin fonksiyona sahip Leydig hücrelerinden oluşur. Bu bağ dokusu içerisinde mast hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, başkalaşım geçirmemiş bağ dokusu hücreleri ve lenfositler bulunur. Leydig hücreleri puberteyle birlikte interstiyel dokunun en önemli birimi durumuna gelir (Ross ve Romrell 1989).

2.3.5. Leydig Hücreleri

İnterstiyel doku içerisinde küçük topluluklar halinde bulunan Leydig hücrelerinin çapları 15-20 µm olup, bu hücrelerin merkezinde periferik heterokromatik bir ya da daha fazla çekirdekçikli yuvarlak bir çekirdek vardır. Bu hücrelerde çekirdeğe yakın bir yerde konumlanmış ve iyi gelişmiş bir Golgi aygıtı bulunur. Bunun yanı sıra sitoplazma içinde Reinke kristalleri, peroksimozlar ve lizozomlar vardır. Ancak Reinke kristallarının işlevi bilinmemektedir. Ayrıca hücreler çok sayıda kristal türü mitokondri bulundurmaktadır.

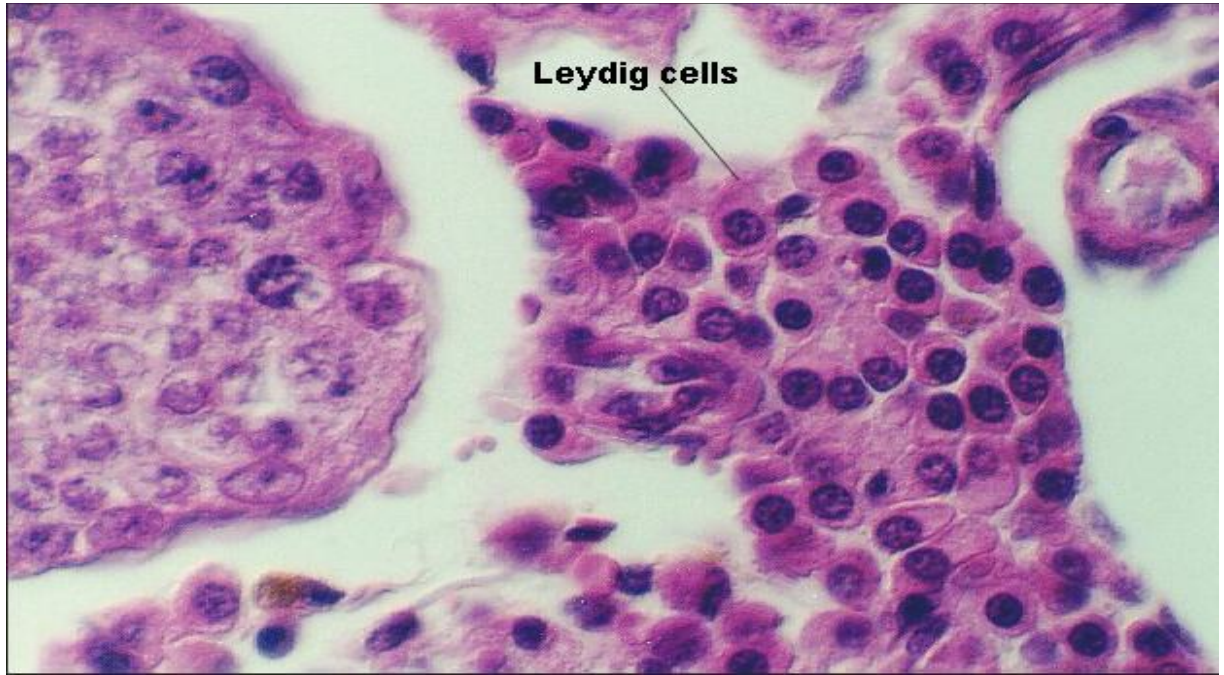
Leydig hücrelerinde lüteinizasyon hormon (Luteinisation Hormone/ LH) reseptörü bulunmaktadır (Teerds ve ark. 1999). Leydig hücrelerinin başkalaşımı ve işlevini sürdürebilmesi için LH temel etkidir (Ge ve ark. 2005). LH Leydig hücre proliferasyonunu, doğrudan ya da dolaylı olarak büyümeyi destekleyen etkenlerin üretimini düzenleyerek uyarır. Leydig hücre proliferasyonu yetişkin rat testislerinde ise az miktarda görülür (Teerds ve ark. 1999).

Androjenler olarak adlandırılan erkek cinsiyet steroidlerinin (testosterone, androstenedione ve dehydroepiandrosterone) sentez ve sekresyonu Leydig hücreleri tarafından yapılır (Nozu ve ark. 1981, Johnson 1991). Bu steroidler Leydig hücrelerinin yakınında bulunan kılcal delikçiklerden sistemik dolaşıma katılırlar. Testosteron dolaşıma girmesiyle vücuttaki hedef organları etkiler (Johnson 1991). Salgılanan testosteronun bir

kısmı da intersitisyel sıvı içersine verilir ve spermatogeneziste otokrin ve parakrin bir etki gösterir (Ge ve ark. 2005).

Puberte dönemiyle birlikte Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteronun (Dellmann ve Brown 1987, Johnson 1991) temel işlevleri arasınada cinsel isteğin (libido) ortaya çıkması, spermatogenezisin kontrolü, hipofiz ve hipotalamusta olumsuz geri tepki, genel anabolik etkiler gösterilebilir (Dellmann ve Brown 1987, Johnson 1991, Hassa ve Aştı 1997). Leydig hücrelerinin hem testisteki toplam sayıları hem de steroidojenik kapasitesi testosteron seviyeleri ile doğrudan ilişkilidir (Ge ve ark. 2005).

İlerleyen yaşlarda Leydig hücrelerinin testosteron üretimi azalır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak tahmin edilen olası nedenleri; Leydig hücrelerinin sayısında azalma, azalan LH uyarımı, Leydig hücrelerinin testosteron üretme yeteneğinin azalması ve önemli germ hücre kayıplarıdır (Chen ve ark. 1994).



Şekil 2.16. Leydig hücreleri (www.microanatomy.net)

Doğumdan sonra 10. günde ratlarda Leydig hücre gelişimi başlar. Bu hücre gelişiminde beş hücre türü bulunur; bunlar mezenşimal prekürsör hücreler (Mesenchymal Precursor Cells/ MPC), progenitör hücreler (Progenitor Leydig Cells/ PLC), yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri (Newly Formed Adult Leydig Cells/ NFALC), genç erişkin Leydig hücreleri (Immature Adult Leydig Cells/ IALC) ve olgun erişkin Leydig hücreleri (Mature

Adult Leydig Cells/ MALC)'dir. LH'dan bağımsız olarak mezenşimal prekürsör hücreler progenitör hücelere başkalaşmaya başlar. LH sonraki gelişme dönemlerinde, progenitör hücrelerin çoğalması ve bu hücrelerin sırasıyla yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri, genç erişkin Leydig hücreleri ve olgun erişkin Leydig hücrelerine başkalaşımı ve başkalaşımı devamında Leydig hücrelerinin çoğalmasını sağlar. Leydig hücrelerinde mitoz Mezenşimal prekürsör hücre başkalaşımı ile aynı zamanda meydana gelir. Mezenşimal ve Leydig hücre sayıları gelişim boyunca doğrusal olarak 1:2 oranında artar. Gelişimini bitirtmiş Leydig hücrelerinin boyutu önemli derecede artmıştır. Hücrelerin testosteron salgılama kapasitesi steroid üretimi için gerekli bütün organelleri elde ettiği için artar. Böylelikle Leydig hücreleri fazla sayıda LH reseptörüne sahip olmuştur. Bu nedenle Leydig hücresinin LH uyarımına karşı hassasiyeti artmıştır (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Postnatal rat testisinde Leydig hücrelerinin başkalaşımında iki farklı fazın olduğu Hardly ve ark. (1989) tarafından ileri sürülmüştür. Birinci faz mezenşimal prekürsör hücrelerin progenitör Leydig hücrelerine dönüştüğü postnatal 14. ve 28. günler arasındadır. İkinci faz ise 28. günde başlar ve Leydig hücre sayısı mitoz ile artar.

Leydig hücre gelişimi, insan ve diğer memeli türleri için de ratlarda belirtildiği şekle benzerdir. Progenitör Leydig hücreleri ratlarda gelişim sırasında ilk tanımlanan oldukça yüksek proliferatif hücrelerdir. İçerisinde birkaç steroidojenik enzim bulunan granülsüz endoplazmik retikulum içerir. Bu safhadan sonraki gelişim genç Leydig hücreleri (Immature Leydig Cells/ ILC) ile oluşur. Genel olarak postpartum 28-56. günlerde görülür. ILC, yüksek bir steroidojenik kapasiteyi destekleyen sitoplazmik yağ damlacıkları olan 3 alfa-androstanediol, 5 alfa-androstanediol içermesinin yanı sıra PLC'e göre daha fazla granülsüz endoplazmik retikuluma sahiptir (Ge ve Hardly 1998). Ratlar 20-40 günlük yaşlarındaiken bu hücreler tarafından 3 alfa-androstanediol ve 5 alfa-androstanediol - testosteron metaboliti- üretmektedir (Chase ve Payne 1983). 56. günde ILC yetişkin Leydig hücreleri(Adult Leydig Cells/ALC)'ne dönüşmeden önce son kez bölünmeye uğrar. Büyük hücreler olan ALC hücreleri az miktarda yağ damlacığı ile çok miktarda granülsüz endoplazmik retikulum barındırır. Steroidojenik enzim etkinliği yüksektir ve predominant olarak testosteron salgırlar (Hardly ve ark. 1989).

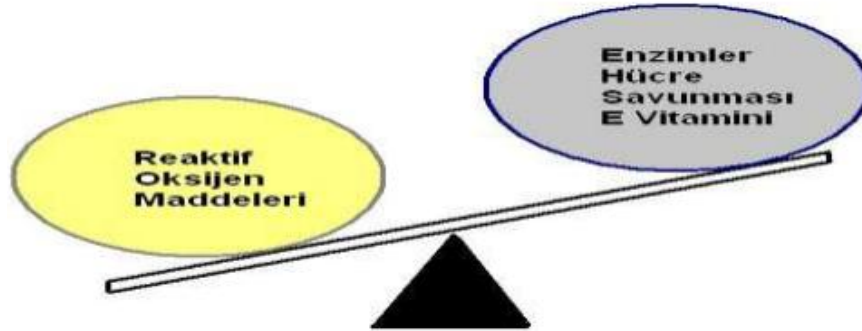
Leydig hücre gelişimine LH dışında bazı hormonlar ve kimyasal etkenlerde etki etmektedirler. Testosteron ve östrojen, prekürsör hücre başkalaşımının başlamasını inhibe

eder. Androjenler, progenitör hücrelerin oluşturulduktan sonra olgun erişkin tip Leydig hücrelerine başkalaşımı için gereklidir (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Hem Leydig hem de mezenşimal hücre sayıları doğumdan cinsel olgunluğa kadar rat testisinde artar (Ariyaratne ve Mendis-Handagama 2000).

2.4. Oksidatif Stres

Normal metabolizma sonucunda sağlıklı bireylerde meydana gelen reaktif oksijen radikalleri vücudun savunma mekanizması olan antioksidan sistem ile uzaklaştırılır. Sağlıklı organizmada oksijen radikalleri ile antioksidan savunma işleyişi tam bir denge durumunda çalışır. Bu dengenin radikaller lehine bozulması ile ortaya çıkan duruma “oksidatif stres” adı verilir (Şekil 2.17.) (Sorg 2004). Oksidatif stres doğal bir süreç olup bu stresi kontrol altında tutan özelleşmiş mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların yetersizliği halinde oksidatif hasar meydana gelir.



Şekil 2.17. Oksidatif Stres (Akkuş 1995)

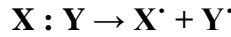
Oksidatif stres, ateroskleroz, DM, kanser, kronik inflamtuvar hastalıklar, santral sinir sistemi bozuklukları gibi patofizyolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve bu nedenle hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde etkisi olan önemli bir mekanizmadır.

2.4.1. Serbest Radikaller ve Oluşumları

Biyolojik moleküllerin bir çoğu ortaklanmış elektron taşırlar. En dış yörüngesindeki orbitalinde ortaklanmamış elektron bulunan atom ya da moleküllere serbest radikal adı verilir (Akkuş 1995). Bir başka tanımla bu moleküllere “reaktif oksijen türleri (ROT)” ya da “oksidan moleküller” isimleri de verilmektedir. Kararsız yapıda olan serbest radikaller tek elektronlarını çiftlemek için karbonhidratlar, proteinler, lipitler, amino asitler, serbest yağ asitleri ve nükleotidler gibi tüm hücre bileşenleri ile tepkimeye girebilirler (Halliwell 1991).

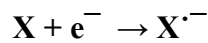
Bulduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli bir radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar sırasında değişik tür ve miktarlarda radikaller meydana gelmektedir. Radikallerin meydana gelişi 3 temel mekanizma ile olur (Cheeseman ve Slater 1993).

I. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması:Yüksek sıcaklık (500-600 °C) ya da yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar bağların kırılmasına neden olur. Kırılma arasında bağ yapıdaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma adı verilir.



II. Sıradan Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi:Radikal özellik göstermeyen bir molekülden elektron kaybı esnasında dış yörüngedeki orbitalinde ortaklanmamış elektron kalıyorsa, radikal form meydana gelir. Örneğin glutatyon, askorbik asit ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon (GSH) radikalleri indirgerken, kendisinin radikali oluşur (GS[•]).

III. Sıradan Bir Moleküle elektron Transferi: Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde ortaklanmamış elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin (O₂^{•-}) oluşumuna neden olur (Akkuş 1995).



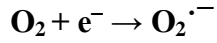
Çizelge 2.1. Serbest Radikaller ve Tepkimeleri (Halliwell ve Gutteridge 1989)

Süperoksit	$\cdot\text{O-O}^-$	Fe^{2+} ve Cu^+ iyonlarını geri kazanma yoluyla Haber-Weiss tepkimesini katalizleme, hidrojen peroksit veya peroksinitrit oluşumu
Hidrojenperoksit	HO-OH	Hidroksil radikali oluşumu, enzim inaktivasyonu, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hidroksil radikali	$\text{OH}\cdot$	Hidrojen çıkarılması, serbest radikallerin ve lipidperoksitlerin üretimi, tiyol oksidasyonu
Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$	Serbest radikal reaksiyonlarının başlaması, süperoksit radikalinin dismutasyonu
Ozon	$\text{O}=\text{O}+\text{O}^-$	Bütün biyomoleküllerin özellikle çift bağ içerenlerin oksidasyonu, sitotoksik aldehit ve ozonit oluşumu
Oksijen	$\text{O}=\text{O}$	Peroksitlerin oluşumu, çifte bağlarla reaksiyon, aminoasitlerin ve nükleotidlerin oluşumu
Nitrik oksit	$\cdot\text{N}=\text{O}$	Peroksinitrit oluşumu, diğer radikaller ile reaksiyon
Peroksinitrit	$\text{O}=\text{N-O-O}^-$	Tiyollerin ve aromatik grupların oksidasyonu hidroksil radikali oluşumu, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hipoklorit	ClO^-	Klorin oluşumu, kükürt ve amino içeren grupların oksidasyonu
Peroksil radikali	$\text{R-O-O}\cdot$	Radikallerin oluşumu, hidrojen çıkarılması, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin bozunması
Hidroperoksit	R-O-OH	Biyolojik membranların bozulması, biyomoleküllerin oksidasyonu
Bakır ve Demir iyonları	$\text{Cu}^{2+} \text{Fe}^{3+}$	Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri ile hidroksil radikali oluşumu

İnsan metabolizmasında oluşabilen radikallerin sayısı birçok değişik tür halinde belirtilebilirse de, bu radikaller içinden süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikali başlıca bilinen radikaller olarak öne çıkmaktadır (Kenneth ve Bruce 1998).

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$): Orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyan oksijen molekülüne süperoksit radikali denir (Halliwell 1991). Canlı metabolizmasında oluşumu ilk olarak gözlemlenen süperoksit radikali, temel olarak dört mekanizma ile üretilmektedir.

1- Redüktaz özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali meydana gelir. Flavinler, tiyoller, hidrokinonlar, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi birçok molekül oksijenli ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına sebep olurlar.

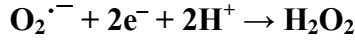
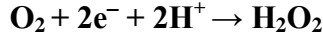


2- Çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi esnasında süperoksit radikali oluşabilir.

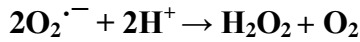
3- Mitokondride gerçekleşen enerji metabolizması esnasında oksijen kullanılırken, kullanılan oksijenin %1-5 kadarı süperoksit üretimi ile sonlanır. Buradaki radikal üretiminin nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Sitokrom oksidaz, Fe: Cu: Zn: Mg atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Böylelikle sitokrom oksidaz üzerinde süperoksit ya da hidrojen peroksit oluşsa bile, içerdiği enzimatik aktivite sayesinde hızla ortamdan temizlenir.

4- Fagositik lökositler çok büyük miktarlarda süperoksit üreterek; ürettikleri süperoksitleri fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Bu radikal yapımı, antibakteriyel etki için gerekli olup, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Ayrıca radikal yapımı bazı hücrel görevler için de gerekli olabilir. Süpeoksidin yarılanma ömrü genel olarak milisaniye düzeyindedir ve hücrelerin farklı yerlerinde bulunan SOD'un varlığına bağlıdır (Steinman 1982).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂): Süperoksit radikalının bir elektron alması ya da moleküler oksijenin iki elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti oluşturur.

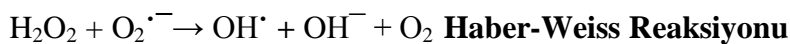


Fakat biyolojik sistemlerde asıl H₂O₂ üretimi süperoksitin dismutasyon tepkimesiyle gerçekleşir. Bu reaksiyonda serbest radikal reaktifleri, radikal olmayan ürünler meydana getirdiğinden, bu bir dismutasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyon aerobik organizmalarda süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalize edilir (Cross ve ark. 1987).



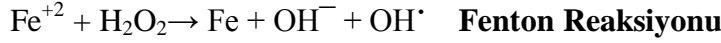
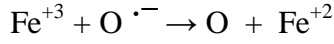
Serbest radikal olmadığı halde hidrojen peroksit serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Süperoksit radikali ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerden derhal uzaklaştırılmaz. Bu görevi peroksidaz ve katalaz enzimleri yerine getirmektedir (Kılınc ve Kılınc 2002).

Hidroksil Radikali (OH[•]): Canlı metabolizmasında üretilen en güçlü reaktiviteye sahip radikaldir. Yüksüz bir molekül olan H₂O₂ hücre içine kolaylıkla girebilir ve geçiş iyonları varlığında, serbest oksijen radikallerinden en reaktif ve en hasar verici özelliğe sahip olan hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturmak için kolayca parçalanabilir (Cross ve ark. 1987).



Haber-Weiss reaksiyonunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları rol oynayabilir. İlk olarak Fe⁺³ iyonu süperoksit radikali aracılığıyla Fe⁺² iyonuna indirgenir. Fe⁺² iyonu ise

H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH[•] radikalini oluşturur. Çok çabuk gerçekleşen bu reaksiyon Fenton Reaksiyonu olarak adlandırılır.

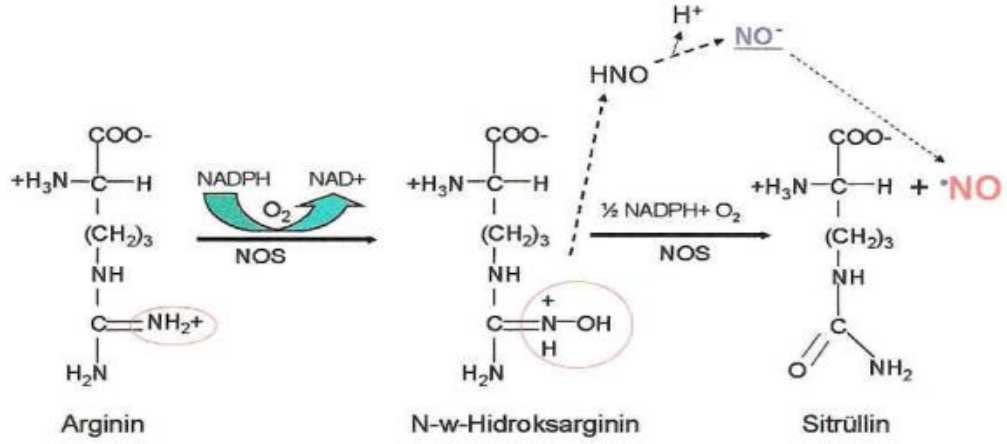


Yarılanma ömrü çok kısa olan Hidroksil radikali çok güçlü bir oksidan olduğundan ciddi hasarlar oluşturur. 3 tür reaksiyon gerçekleştirir (Kılinc ve Kılinc 2002).

- Hidrojen çıkarma
- Elektron transferi
- İlave reaksiyon (protein-protein, protein-lipit, lipit-lipit çapraz bağlanması)

Singlet Oksijen (¹O₂): Singlet oksijen yapısında ortaklanmamış elektron bulunmaması nedeniyle gerçek bir radikal değildir. Serbest radikal tepkimelerinin başlatıcı olması nedeniyle önemlidir. Elektronlarının dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönünde olan başka bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve H₂O₂'in hipoklorit ile tepkimesi sonucunda da meydana gelebilir (Van Der Vliet ve ark. 1996).

Nitrik Oksit (NO): Çok kısa yarı ömürlü olup birçok biyolojik olayda rol oynayan serbest radikaldir (Moncada ve ark. 1989). Ortaklanmamış elektron gerçekte azot atomuna ait ise de, bu elektronun hem azot hem de oksijen atomu üzerinde de yer alması sonucu tam olarak radikal özelliği göstermez. Dolayısıyla bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından daha uzun ömürlüdür. Nitrik oksit ve diğer bir son ürün olan sitrulin, arginininden Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir (Şekil 2.18.) (Pitkänen ve ark. 1992).



BH_4 , kalmodulin, Ca^{2+} , FAD ve FMN ko-faktör

Şekil 2.18. Nitrik Oksit Sentezi

Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluştururlar. Buna karşılık vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça azdır. Metabolizmamıza alınan nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO'dan başka, endojen NO oluşturan tek kaynak NOS enzimleridir. NOS enzimi sayesinde NO yarı esansiyel amino asit olan L-argininden oksidatif deaminasyon sonucunda sentezlenir (Moncada ve ark. 1989). NOS enziminin üç tür formu vardır.

- endotel (eNOS)
- nöronal (nNOS)
- indüklenebilir (iNOS)

Nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Oksijensiz ortamda NO karalı değildir; konsantrasyonun artmasıyla oksidasyon hızlanır. Bu nedenle ortamdaki konsantrasyonu ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Örneğin; iNOS enziminin indüksiyonu sırasında NO konsantrasyonunun artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif azot oksit türleri meydana gelir. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücresel proteinlerin, enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler (Murphy 1999).

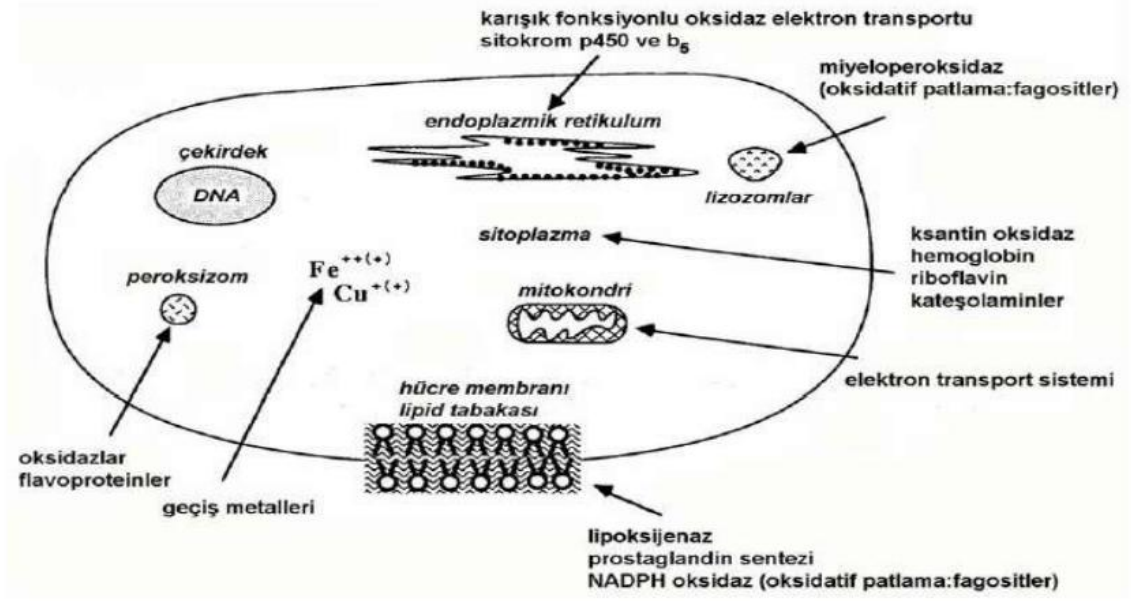
2.4.2. Serbest Radikal Kaynakları

İnsan vücudunda meydana getirilen radikallerin tümü tehlikeli ve kötü kimyasal türler olarak görülmemelidir. Biyokimyasal reaksiyonlarda oksijeni kullanabilmek için, oksijen reaktif formlarına dönüştürülmesi gerekmektedir. Örneğin steroid yapılı birçok bileşik, ksenobiyotiklerin zararsız hale getirilmesi, eikosanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, çok sayıda oksidaz ve hidrolaz enzimlerinin etkileri için ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin görevlerini yapabilmeleri için radikal yapımı önemli bir gerekliliktir. Hem oksijen radikallerinin yapımı hem de nitrikoksit radikallerinin yapımı çok önemli bir gerekliliktir. “Nerede ve ne kadar” üretildikleri bu radikallerin ne kadar iyi ya da ne kadar kötü olduklarını belirleyen etkidir (Cheeseman ve Slater 1993).

Organizmada metabolik aktiviteyle oluşan oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri esnasında veya çeşitli dış kaynaklı faktörler sayesinde serbest radikaller oluşabilir (Kehrer 1993).

Hücre içi Serbest Radikal Üretim Kaynakları (Şekil 2.19.)

- 1- Mitokondriyal elektron transport sistemi tepkimeleri
- 2- Plazma Membranları
- 3- Otooksidasyon tepkimeleri
- 4- Antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması
- 5- Mikrozomal elektron transport zinciri
- 6- Peroksizomlar ve Miks Fonksiyonlu Oksidazlar
- 7- Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membran Elektron Taşıma Sistemleri



Şekil 2.19. Endojen Serbest Radikal Kaynakları (Kehrer 1993)

1- Mitokondriyal Elektron Taşınması

Elektron taşınım zincirleri birçok aerobik hücrelerde $O_2^{\cdot-}$ radikalinin en önemli kaynağıdır. Bunlar ökaryotik hücrelerin mitokondri ve endoplazmik retikulumları ile bakteriyel membranlarda bulunur. Mitokondrielerde solunum zincirindeki elektron taşıyıcılardan kaçan elektronlar moleküler oksijen ile birleşerek $O_2^{\cdot-}$ oluşturabilir. Elektron taşınma oranı ve $O_2^{\cdot-}$ radikal oluşumu memeli sitokrom oksidaz aktivitesinin O_2 'e doymun olduğu durumlarda mitokondrieler tarafından arttırılır. Fizyolojik oksijen düzeylerinde, oksijenin yaklaşık %1-3'ü mitokondride $O_2^{\cdot-}$ 'e dönüştürülür. Mitokondri hasarı neticesinde $O_2^{\cdot-}$ oluşumu ve elektron taşınması artar (Turrens 1997).

2- Plazma Membranları

Bu yapılar serbest radikal meydana getirme ve serbest radikallere hedef olup zincir tepkimelerinin ve lipit peroksidasyonun gerçekleştiği yer olması nedeniyle önemlilik arz eder. Siklooksijenaz enzimleri tarafından katalizlenen araşidonik asidin oksidasyonu sırasında OH^{\cdot} radikali meydana gelir (Şekil 2.20.).



Şekil 2.20. Araşidonik Asit Metabolizması Sonucu Oluşan Serbest Radikaller (Freeman ve Crapo 1982)

3- Otooksidasyon Tepkimeleri

Biyolojik moleküllerden bazıları oksijen varlığında oksitlenir ve bu sırada O_2 , $O_2^{\cdot-}$ 'e dönüşür. Bu moleküller; indirgenmiş flavin mononükleotid (FMN H_2), gliseraldehit, indirgenmiş flavin adenin dinükleotid (FAD H_2), adrenalin, dopamin, noradrenalin, L-dopa, tetrahydropteridinler ve sistein gibi tiyol bileşikleridir. Tetrahydropteridinler; fenil alanin hidroksilaz, NOS, tirozin hidroksilaz gibi oksijenaz enzimlerinin kofaktörüdür (Halliwell ve Gutteridge 1988).

4- Antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması

Etkinleştirilmiş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller fagositoz esnasında membran ve sitoplazmalarında buldukları NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici hipoklorit asit (HOCl) gibi ajanları üreterek karşılaştıkları bakteri, virüs ve mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. İşlemler sırasında hem ana hem ara ürün olarak çok fazla miktarda reaktif oksijen metabolitleri oluşur (McCord 1985, McCay ve ark. 1992).

5- Mikrozomal elektron transport zinciri

Serbest radikaller endoplazmik retikulumda ksenobiyotiklerin metabolizmaları sırasında ve diğer endojen maddelerin metabolizmaları sırasında yan ürün olarak üretilir. Bu faaliyette elektronların kaçak yaptığı en önemli yapı nikotinamid adenin dinükleotit fosfat redüktaz P450 enzimidir (Buko ve Sadovnichy 1996, Stoyanovsky ve Cederbaum AI 1996).

6- Peroksizomlar ve Miks Fonksiyonlu Oksidazlar

Çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağı olan peroksizomlar bünyelerindeki aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar (Goel ve ark. 1986, Reddy ve Rao 1989).

7- Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membran Elektron Taşıma Sistemleri

Serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Nükleer membran ve endoplazmik retikulumda üretilen serbest radikaller organellerin içine girebilir ve sitozolik tepkimelere katılabilir. DNA'da hasar meydana getiren serbest radikaller nükleer membranda oluşan radikallerdir (Meng ve Liu 2007, Pryme 1986).

Çizelge 2.2.Serbest oksijen radikallerinin hücre içi hücre dışı kaynakları (Aruoma ve ark.1991)

HÜCRE İÇİ KAYNAKLAR	HÜCRE DIŞI KAYNAKLAR
Yaşlanma	Egzersiz
İskemi, travma, intoksikasyon	Metal iyonları
Elektron transport sistemleri ve Peroksizomlardaki enzimler	Ksenobiyotikler: hiperoksi, hava kirliliği, anestezi
Mitokondri elektron transport sistemi	Alkol ve uyuşturucu maddeler
NADPH oksidaz, lipooksijenaz gibi plazma membranı enzimleri ve lipid peroksidasyonu	Strese bağlı vücutta katekolamin düzeyinin artması
Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, denozin deaminaz, hemoglobin	Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri
Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler, hidrokinonlar moleküllerin oksidasyonu	İyonize ve non-iyonize radyasyon
Geçiş metallerine afinitesi olan antibiyotikler	Antineoplastik ilaçlar
Makrofaj ve fagosit hücrelerin hiperaktivasyonu	

Canlı organizmasından kaynaklanmayan, dış etkenlerin varlığında oluşan tepkimeler sonucunda da serbest radikaller meydana gelebilir. Bu etkenler;

- Radyasyon
- Bağımlılık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular.
- Antineoplastik ajanlar
- Çevresel ajanlar: Ksenobiyotikler (Sigara dumanı, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, solventler, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, anatezik maddeler, titanyum, alüminyum, kurşun, molibden, nikel, arsenik).
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır (Guemouri ve ark. 1991; Akkuş 1995; Yanbeyi 1999)

2.4.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller metabolizmada antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli hasarlara neden olurlar. Lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşim özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (Kenneth ve Bruce 1998)

Çizelge 2.3.Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

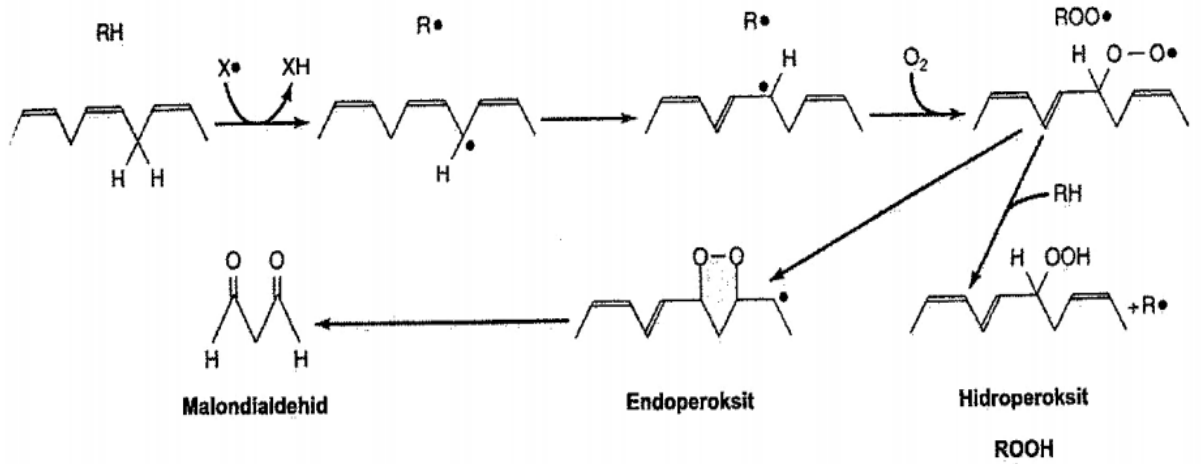
Doymamış Yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Nükleik Asit Bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Karbonhidratlarda benzer tepkimeler
Nükleik Asitler	Tek ve çift iplikçik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Kükürtlü Aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Karbonhidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Hiyalunorik Asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme

2.4.4. Lipidlere Etkileri

Biyolojik dokularda serbest radikallerin doymamış yağ asitlerine etkisi olan lipid peroksidasyonunun toksik olduğu bilinmektedir. Tepkimeler zincirleme olarak meydana gelir ve dönüşümsüzdür. Lipid peroksitlerin düzeyi ölçülerek toksik etki belirlenir. Doymamış yağ asitlerindeki bir hidrojen atomunun çıkması peroksidasyonun başlamasına neden olur; böylelikle yağ asit zinciri lipid radikali niteliği kazanır. Bu radikal dayanıksız olup, çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksil radikaline dönüşür.

Bu radikaller diğer doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikalleri oluşturur, bunun yanında hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler (Halliwell 1996)

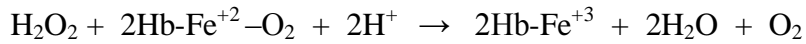
Antioksidan tepkimeler ile lipid peroksidasyonu sonlandırılır ya da devam ederek daha ileriye gider. Cu, Fe gibi indirgenme-yükseltgenme yapan metaller ile lipid peroksidasyonu artar (Reily ve ark. 1991).



Şekil2.21. Lipid Peroksidasyonu

2.4.5. Proteinlere Olan Etkileri

Proteinler lipidlere göre serbest radikallere karşı daha az duyarlılık gösterirler. Aminoasit bileşimi etkilenme derecelerini doğrudan ilgilidir. Sülfür ve doymamış bağ içeren tirozin, histidin, sistein, fenil alanin, triptofan gibi amino asitlerden oluşan proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur. Karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçümüyle proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir. Bu hasar sonucu proteinlerde çapraz bağlanmalar, fragmatasyon ve proteinlerin agregasyonu oluşur. Bozulan proteinler olağan işlevlerini yerine getiremezler. Enzimlerin çalışmasında değişiklikler olur. Proteinleri serbest radikaller nedeniyle hasara uğrar. Oksihemoglobin H₂O₂ ya da O₂^{•-} tepkimeye girerek methemoglobin meydana gelir (Rice-Evans ve ark. 1991, Akkuş 1995, Dikici 1999)



2.4.6. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu neticesinde peroksitler, H₂O₂, okzoaldehitler oluşmaktadır. Bu maddeler kanser, DM, sigara içimi ile ilgili kronik hastalıklar gibi patolojik süreçlerde rol oynarlar. DNA,RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar meydana getirme özelliklerinden dolayı okzoaldehitler antimitotik etki gösterirler. Dolayısıyla yaşlanma ve kanser olaylarında etkisi olduğu göz önünde bulundurulmaktadır (Agrawal ve Kale 2001).

2.4.7. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyonla meydana gelen serbest radikaller, DNA'ya doğrudan etki ederek hücrede değişime ve ölüme neden olurlar. Bazlarla ve deoksiriboz molekülüyle tepkimeye giren OH[·] radikali hücrede değişikliklere yol açar. Hücre zarından kolayca geçen H₂O₂ hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA'nın zarar görmesine hatta ölümüne neden olabilir. O₂^{·-} radikali oksitleyici etkisi güçlü olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküller ile daha kolay tepkimeye girer (Halliwell ve Gutteridge 1984).

2.5. Antioksidan Savunma ve Mekanizmaları

Potansiyel olarak toksik olan serbest radikallere karşı organizmalar bunları etkisiz hale getirmek için savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bunlar **antioksidan** olarak adlandırılmaktadır (Halliwell 1996). Olağan koşullarda peroksitler ve serbest radikal ürünleri güçlü antioksidan sistemler tarafından dengelenir. Antioksidan moleküller serbest oksijen radikallerini temizleyerek oksidatif hasarın önlenmesinde büyük rol oynarlar (Halliwell 1996).

Antioksidanlar oksijeni uzaklaştırarak, geçiş metal iyonlarını uzaklaştırarak ve reaktif oksijen türlerini temizleyerek ya da baskılayarak başlamış olan zincir tepkimesini kırarak etkili olurlar (Halliwell 1996).

Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak 2'ye ayrılmaktadır (Çizelge 2.4.)

Çizelge 2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları (Aydın ve ark. 2001).

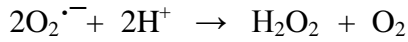
Enzimatik Savunma Mekanizmaları	Enzimatik Olmayan Savunma Mekanizmaları		
	Suda çözünen	Yağda çözünen	Metal iyonlarını bağlayan
Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (CAT) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) Glutatyon S-transferaz (GST) Glutatyon redüktaz (GSSG-R) Sitokrom oksidaz Fosfolipit hidroperoksit glutatyon Peroksidaz (PLGSH-Px)	Glutatyon Vitamin C Ürik asit	α -tokoferol β -karoten Bilirubin Ubikinon	Albumin Ferritin Transferin Haptogloblin Seruloplazmin

2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz iki reaktif oksijen türünü, radikal olmayan moleküllere dönüştürmesi nedeniyle antioksidan sistemin önde gelen unsurlarından birisidir. SOD etkinliği oksijen kullanımını yüksek olan dokularda fazladır.

Süperoksitin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalize eden metallo enzimidir.



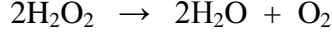
Metabolizmada iki tür SOD enzimi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik, kofaktörleri bakır ve çimko olan izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik, kofaktörü mangan olan izomerdirler (Mn-SOD). Tesir işlevsellikleri aynı olan iki enzim arasındaki temel fark etkinlikleri üzerine pH'nın etkisidir. Her ikisi de pH:7'de etkindir. Ancak Mn-SOD, pH:7'nin üzerine çıktığında etkinliğini yitirirken, Cu-ZN SOD 'ın etkinliği pH:5,5-10 aralığında değişmez (Haris 1992, Markiund 1984, McCord ve Fridovich 1978).

Aslında SOD toksik arındırıcı bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H_2O_2 toksik bir ajandır. Fakat bu tepkime, reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna giden yolun başlangıç basamağıdır. İkinci basamak glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri tarafından H_2O_2 'in suya dönüşmesini katalizler (Haris 1992).

Katalaz (CAT)

Tüm hücre türlerinde farklı konsantrasyonlarda bulunan 4 tane Hem grubu içeren bir hemoproteindir. H₂O₂'yi moleküler oksijen ve suya katalizler (Tudhope 1967, Palmer 1990, Akkuş 1995, Yanbeyi 1999, Dikici 1999).

CAT

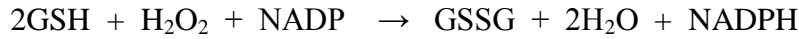


Çoğunlukla peroksizomlarda lokalize olan CAT'ın indirgeyici etkinliği hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlere karşı etkili olmaz. Karaciğer, böbrek, kan, mukoz membranlar, kemik iliğinde yüksek miktarda bulunmaktadır (Tudhope 1967, Gonzales ve ark. 1984, Rice-Evans ve ark. 1991, Rachmilewitz ve ark. 1994, Akkuş 1995, Bast ve ark. 1997, Yanbeyi 1999, Dikici 1999).

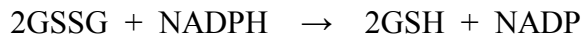
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz etkin bölgesinde tetramerik, dört selenyum atomu bulunduran sitozolik bir enzimdir. İndirgenmiş glutasyon (GSH) varlığında hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesinde görev alır.

GSH-Px



GSH-Red



GSH-Px'm etkinliğinin sürekli olması için GSH'un belirli bir seviyede olması gerekir. NADPH'e bağımlı glutasyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyonla glutasyon disülfid (GSSG) yeniden iki molekül GSH'a dönüşür. Katalazdan farklı olarak GSH-Px çeşitli tepkimelerde anlık meydana gelen hidrojen peroksidin ortadan kaldırılmasını sağlar (Akkuş 1995, Frei 1994).

GSH-Px %60-75'i sitoplazmada, %25-40'ı mitokondride olmak üzere en çok karaciğer ve eritrositlerde etkin olarak bulunur (Fantone ve Ward 1985, Michiels ve ark. 1994).

Glutasyon S-Transferaz (GST)

İlk kez 1961 yılında tanımlanan iki protein alt biriminden oluşmuş bir enzim grubudur. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol almaktadır. Araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlere (ROOH) karşı GST'ler Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi göstererek bir antioksidan etkinlik gösterirler (Di Ilio ve ark. 1985).

GST



Glutasyon Redüktaz (GSSG-R)

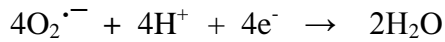
GSH, GSH-Px tarafından H_2O_2 ya da diğer lipit peroksitlerin indirgenmesiyle GSSG'e dönüşür. Metabolizmanın GSH deposu sınırlı olduğu için okside formun yeniden redükte forma dönüşerek tepkimelerde kullanılması gereklidir (Acan ve Tezcan 1991). Tepkimenin gerçekleşmesi için NADPH'a gereksinim vardır (Rice-Evans ve ark. 1991).

GSSG-R



Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Süperoksiti detoksifiye eden sitokrom oksidaz, solunum zincirinin son enzimidir.



Bu tepkime, fizyolojik koşullarda olağan bir işlev olup, sürekli devam ederek yakıt maddelerinin oksidasyonunu tamamlar ve böylece bol miktarda enerji üretimi sağlanır (Akkuş 1995).

2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon (GSH)

Glutasyon, bitkilerin mitokondri, sitozol, endoplazmik retikulum ve vakuelleri başta olmak üzere tüm hücrelerinde yoğun olarak bulunur. İçerisinde sülfür bulundurması nedeniyle GSH konjugasyonu ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu sağlar (Lamb ve Dixon 1997). Glutasyon antioksidan etkisini yapısında merkezi olarak bulunan sistein rezidüsü ile yerine getirir. Sitotoksik H₂O₂'yi doğrudan, hidroksil, süperoksit radikalleri ile singlet oksijeni ise enzimatik olmayan biçimde etkisizleştirir (Avsian-Kretchmer ve ark., 1999). Askorbat-glutasyon döngüsü ile suda çözünen güçlü bir antioksidan olan askorbatın rejenerasyonunu sağlar (Lamb ve Dixon 1997).

Vitamin C (Askorbik Asit)

Bir ketolakton olan C vitamini, L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu olan iyi bir redüktan maddedir. Radikal süpürücü ve redükleyici bir ajan olan askorbik asit, reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etki sağlar. Bu özelliklerinin yanında askorbik asit, serbest radikal kaynağı gibi hareket edebilen çeşitli fonksiyonlara sahip bir bileşimdir (Yanbeyi 1999).

Ürik Asit

Ürik asit olağan plazma konsantrasyonunda süperoksit, hidroksil, singlet oksijeni ve peroksil radikallerini temizler. Demir ve bakır iyonları ile meydana gelen oksidasyona karşı şelasyon yaparak askorbik asitin oksidasyonunu engeller (Henson ve ark. 1991)

Vitamin E (α -tokoferol)

Tokotrienoller ve tokoferoller olarak ve α , β , γ , δ alt grupları ile 8 farklı türdedir. Sadece bitkisel organizmalar tarafından sentezlenen tokoferoller bitkilerin tüm kısımlarında bulunur. Özellikle kloroplast membranlarında α -tokoferol yoğun olarak bulunur ve bu kısımda oksijenin etkisi ile meydana gelen oksidatif strese karşı koruyucu etki sağlar (Hofius ve Sonnewald 2003). Hücre membranlarındaki lipit peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan alkoksil, lipit peroksil ve alkil radikallerine karşı koruyucu etki sağlar ve oluşan tokoferil radikali ise askorbat, redükte glutasyon ve koenzim Q ile tokoferole

dönüştürülür. Tokoferoller doğrudan Aktif Oksijen Türlerini (AOS) etkisizleştirir; özellikle singlet oksijeni tokoferolün geri dönüşümsüz oksidasyonu ile etkisizleştirirler. Ayrıca membranların akıcılığını ve geçirgenliğini düzenleyerek kararlılık ta sağlar. Tokoferollerin membranlardaki yağ asitleri ve lizofosfolitlerle kompleks oluşturması membranları zararlı etkilere karşı korumaktadır (Hofius ve Sonnewald 2003).

β-Karoten

β-karoten A vitaminin ön maddesi olup, kuvvetli singlet oksijen temizleyicisidir. Bunun yanında hidroksil, peroksi ve alkoksi radikalleriyle de reaksiyon vererek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önler (Yagi 1980).

Bilirubin

Bilirubin hem proteinlerinin yıkım ürünüdür. Çok etkili bir lipit antioksidanıdır. Mikromolar konsantrasyonlarda dahi peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davranış gösterdiği görülmüştür (Gutteridge 1995).

Ubikonon (Koenzim Q-10)

Güçlü antioksidan özellik gösteren ubikinon, mitokondride enerji üretiminde rol oynayan hidrofobik, vitamin benzeri bir bileşiktir. ATP sentezi için gerekli bir madde olduğundan bütün hücrel işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynar (Coenzyme Q-10, Alternative Medicine Review Volume 12 2007).

Albumin

Albumin, plazmanın zincir kırıcı anrioksidan aktivitesine neden olan plazma sülfidril gruplarının büyük bileşenidir. Hipokloröz asidin güçlü bir temizleyicisidir (Halliwell ve Gutteride 1990).

Ferritin

Demirin depolanmasında rol oynayan yüksek moleküler ağırlıklı bir proteindir (Finch ve ark. 1986).

Transferrin

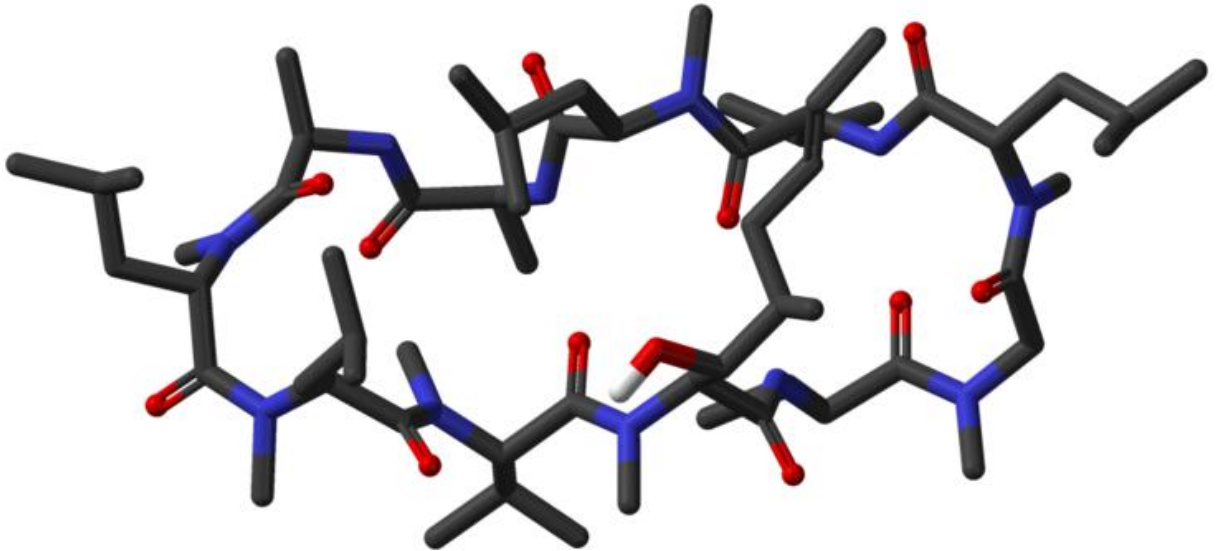
Dolaşımdaki serbest demiri bağlayan bir antioksidandır (Akkuş 1995).

Seruloplazmin

Basit lipid emülsiyonlarında ve doku homojenatlarında güçlü bir serbest radikal inhibitördür (Winyard ve ark. 1984). Demirin transferine bağlanmasını kolaylaştırır ve ekstrasellüler SOD gibi davranış gösterir. Ferik demiri ferro demire yükseltgeyerek fenton tepkimesini önler (Akkuş 1995).

2.6. Siklosporin A (CsA)

11 amino asitli, siklik bir polipeptit olan Siklosporin A (CsA), *Tolypcladium inflatum* gams adlı mantardan elde edilir. Halen kullanılan immunosupresif ilaçların en etkili olanıdır. Kimyasal formülü $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ 'dir. Antijenin tanınmasını izleyen otoimmün yanıtın erken basamaklarını önleyerek immünosupresyon yapar. Önceden gelişmiş bir otoimmün yanıtı ya da ret tepkimesini tedavi edemez, ancak gelişmeden önce verilerek yanıtın ya da tepkimenin meydana gelmesini önler. İndükleyici/yardımcı ($CD4^+$) alt türü T lenfositlerini seçici bir şekilde inhibe eder, farklılaşmasını ve çoğalmasını engeller (Kayaalp 2002).



Şekil 2.22. Siklosporin A'nın kimyasal yapısı (www.wikipedia.org)

CsA olgunlaşmış T lenfositleri üzerinde etkisizdir. Bundan dolayı antijen sataşmasından sonra mümkün olduğu kadar erken, tercihen 24 saat içinde uygulanmaya başlanılmalıdır (Kayaalp 2002).

CsA'nın immünosupresif etkisi üç önemli özelliği barındırmaktadır:

- Supressör lenfositlerin (CD8⁺) işlevini bozmadır, CD4⁺ler tarafından yapılan ve CD8⁺leri indükleyen lenfokinlerin yapımına dokunmaz,
- Benzer diğer ilaçların aksine miyelosüpresyon yapmaz,
- Tabii öldürücü lenfositleri (NK) inhibe etmez.

CsA'nın makrofajlar üzerindeki inhibitör aktivitesi yetersiz seviyede olduğundan, bu hücreleri baskılamak için prednizolon ile birlikte kullanılır. T hücrelerine bağlı antijenlerin yaptığı mitojenik etkinliği, interlekin-2 (İL-2), İL-2 reseptörü, İL-3,İL-4, Tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF- α) ve gama interferon gibi immün sistemin bir çok düzenleyici proteininin yapımını azaltır. Geç meydana gelen hassasiyet reaksiyonlarını güçlü bir şekilde inhibe eder. B lenfositlerinin antikor üretimini ve kemik iliğinde granülositkoloni uyarıcı etken üretimini azaltır (Strestikova ve ark. 2001, Kayaalp 2002, Matsuoka ve ark. 1999).

İmmünosüpresif ve ikincil nöronal hasarı inleyici etkisini CD4 türü T lenfositlerinde, T lenfosit reseptörünün antijenle uyarılması ile başlatılan sinyalleme kaskadı basamaklarından birini oluşturan ve Ca²⁺'a bağımlı bir enzim olan kalsinörini seçici bir şekilde inhibe ederek gösterir. Bu işlem için CsA'nın önce sitoplazmik bir reseptör olan siklofiline bağlanması gerekir. Siklofilinler, hücre çoğalmasına katkıda bulunan, peptidil prolil sis-trans izomeraz (rotamaz) aktivitesi gösteren ve prolinli proteinlerin uygun bir üçüncül yapı kazanmalarını sağlayan enzimlerdir (Kayaalp 2002).

CsA'nın dokulara geçen bölümü fazladır. Yarı ömrü 6 saattir. Çok az miktarı ve metabolitleri idrarda çıkar. Karaciğerde metabolize olur, safrayla atılır. CsA'nın esas toksik etkisi böbreklere olmakta, bu oran %25-75 'e kadar çıkmaktadır. Bu etki doza bağlı artmakta, proksimal tubuluslarda endotelial ve kapiller düzeyde hasara yol açmaktadır. Glomerüler filtrasyon azaltmakta, BUN, kreatinin değerleri yükselmektedir. Özellikle karaciğer nakillerinde nörotoksisite gözlenmektedir. CsA'nın testis üzerine toksik etkileri anlaşılmiş olup, bu konuda bu çalışma ile beraber çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. CsA Leydig hücre atroisi, testosteronda azalma, spermatogenetik arrest ve

bozucu değişiklikler, anormal formlarda artmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bunlarda fertilitayı olumsuz yönde etkilemektedir (Rajfer ve ark. 1987, Seethalaksmi ve ark. 1987).

CsA'nın en önemli yan etkileri nefrotoksisite, hipertansiyon, malignite gelişimi, hiperlipidemi ve nörotoksisitedir (Magee ve Pascual 2004). Çok az da olsa görülebilecek diğer yan ekiler karaciğer disfonksiyonu, hirsutizm ve gingival hiperplazidir. Tüm yan etkiler genel olarak doza bağlıdır ilaç dozunun azaltılması ya da geçici olarak kesilmesi ile genelde düzelir (Sibley ve ark. 1983).

Yapılan bazı çalışmalarda CsA, dokular arası dağılımda en çok yağ dokusunda birikmiştir. Bunun dışında siklosporinden yoğun miktarda pankreas ve sürrenallerde bulunur. Çok düşük miktarlarda ise beyin ve beyin-omurilik sıvısı (BOS)'nda bulunur. Bu düşük geçiş oranı ile CsA'nın santral sinir sistemi üzerine olan etkilerini açıklamak güçtür (Eemarie ve ark. 1986).

CsA'nı yan etkilerini açıklayacak olursak;

Nefrotoksisite: Siklosporin nefrotoksik etkiye sahip bir ilaçtır. Bu nedenle nefrotoksisite, siklosporin tedavisine sınırlamalar getirebilen, bazen başka tedavi yollarının aranılmasına neden olan en önemli sorun olarak gözlemlenmiştir (Humers ve ark. 1988). Siklosporine bağlı değişikliklere böbrek transplantasyon hastalarının böbrek biyopsilerinin %50'sinde rastlanılmaktadır. Nefrotoksisite siklosporine bağlı olarak üç şekilde görülmektedir:

- Akut böbrek yetmezliği
- Subakut böbrek yetmezliği
- Kronik nefropati

Buradaki esas işleyişin böbrek damar direncindeki artış ve böbrek kan akımındaki azalma olduğu düşünölmektedir. Bu durumda prostagldinlerin rolü olabileceği gibi, siklosporinin doğrudan böbrek damarları üzerine etkisi ya da böbrek sinirleri vasıtasıyla meydana getirdiği vazokonstriksiyon söz konusu olabilir. Akut böbrek yetmezliğinde proksimal tübölüs hücrelerinde dev mitokondri oluşumu, izometrik vakuolizasyon ve mikro kalsifikasyon histopatolojik incelemede bulunurken, kronik nefropatide tabloya fokal glomerüloskleroz ve siklosporin arteriolopatisi eklenir. Uzun süredir siklosporin kullanan ve serum kreatinin seviyelerinde yükselme gözlemlenen bir hastada durumun nefrotoksisite mi, yoksa kronik rejeksiyona mı bağlı olduğunu gerçekte söylemek zordur.

Siklosporin düzey ölçümü ve böbrek biyopsisi yapıldığı halde bazen bu mümkün olmayabilir (Naesens ve ark. 2009).

Sekonder Malignite Gelişimi:Bazı kanserlerin ortaya çıkması bağışıklığın uzun süre baskılanması nedeniyle olabilir. Lenfomalar, siklosporin tedavisi sonrasında gelişen malignitelerin başında gelir ve sıradan tedaviye göre daha kısa sürede ortaya çıkar. Oluşan kanser türleri arasında ikinci sırayı deri kanserleri alır. Renal karsinomlar ve kaposi sarkomu da görülen maligniteler arasındadır. Onkogenik virüslerin immünsüpresyon altında kontrolsüz çoğalması ve bununla ilgili olan TGF- β üretimi malignite gelişiminde etkili olabilir (Penn ve Branson 1980).

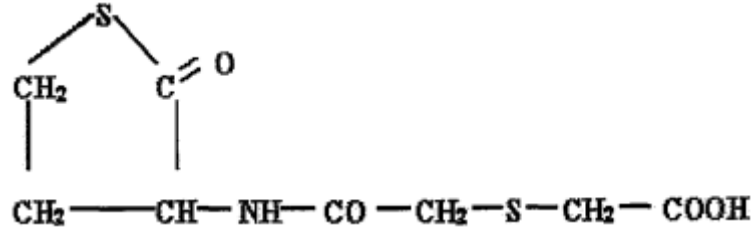
Hipertansiyon:Yapılan çalışmaların çoğunda siklosporin kullanılan kemik iliği transplantasyon hastalarının %60'ında kısa sürede hipertansiyon geliştiğini göstermiştir. Hipertansiyon görülme riski sıradan tedavi ile karşılaştırıldığında, siklosporin alan hastalarda 30 defa fazla görülmüştür. Böbrek kan akımındaki azalma ve renal vazokonstriksiyon sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Bazen hipertansif ensefalopati yapabilecek ölçüde ciddi olabilmektedir. Diüretikler ve vazodilatörler tedavi için kullanılır (Schacter 1988).

Hepatotoksisite:Siklosporinin %20-40 oranında görülen önemli bir yan etkisidir. Alkalen fosfatazda, aminotransferazda ve bilirubinde yükselmeye neden olur. Hepatotoksisite ile siklosporin düzeyi arasında belirgin bir ilişki vardır ve doz azaltılmasıyla çoğunlukla ortadan kalkar (Tredger ve ark. 2008). Siklosporin hepatosit hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyon oluşumuna ve karaciğer sinüzoidlerinde genişlemeye neden olur. Bunun yanında portal alanlarda nötrofil ağırlıklı bir lökosit filtrasyonu gözlenir (Kuruş ve ark. 2008).

2.7. Erdosteine

Doğal bir amino asit olan homosisteinin bir formu olan Erdosteine, bu amino asidin N-tiolaktonik şeklidir. Mukolitik ve balgam sökücü özelliği nedeniyle oral olarak yaygın bir şekilde kullanılır (Vagliasindi 1996). Kronik pulmoner hastalıkların tedavisi için geliştirilen erdosteine, bu özelliği yanında hem serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek hem de elastaz enziminin aktivitesini inhibe ederek etki gösterir (Decahnt ve Noble 1996).

Kimyasal kapalı formülü $C_8H_{11}O_4N_1S_2$ 'dir. Kimyasal adı N-karboksimetil tioasetil homosisteine tiolakton olan erdosteine kimyasal yapısı aşağıda görüldüğü gibidir.



Şekil 2.23. Erdosteinin açık formülü

Acı, beyaz mikro kristalli ve toz görünümündedir.

Erdostein karaciğerde metabolik transformasyonundan sonra serbest bırakılan iki tane engellenmiş sülfidril grubu içerir. Serbestleşen sülfidril grupları glukoprotein lifleriyle mukusu bir arada tutan disülfid bağlarını kırar, dolayısıyla bronşiyal sekresyon daha sıvı hale gelir, bu durum çok daha hızlı bir şekilde atılmasına imkan verir. Erdosteinin antioksidan ve serbest radikali ortamdan uzaklaştırma özelliklerinden sülfidril gruplarının indirgeme potansiyelleri sorumludur (Gazzani ve ark. 1989).

Erdosteinin; Metabolit I, II ve III olmak üzere üç aktif metaboliti vardır. Metabolit I; N-tiyoglikol homosistein, metabolit II; N-asetil homosistein, metabolit III; homosisteindir. Plazma proteinlerine %64,5 oranında bağlanır. Eliminasyon yarılanma ömrü 1,4 saattir. Erdostein, oral alım sonrası çabuk absorbe olur ve absorpsiyonu gıdalardan etkilenmez. Barsaklardan emilerek portal dolaşıma geçer ve karaciğerde metabolize olur. Karaciğerde metabolize olduktan sonra serbest hale gelen sülfidril (tiyol = -SH) grupları sayesinde çok yönlü etki mekanizması oluşur. Üç aktif metaboliti de serbest radikal temizleyici aktivite ve mukolitik göstermektedir (Biagi ve ark. 1989, Inglesi ve ark. 1994, Yağmurca ve ark. 2007, Cabuk ve ark. 2008).

Ekspektoran ve bronşiyal mukus salgısını seyreltici özelliğine sahip olan Erdostein, hem serbest radikallerin oluşumunu engeller, hem de elastaz enziminin aktivitesini inhibe ederek etki gösterir (Titti ve ark. 2000). Erdostein, solunum sisteminde bakterinin mukozaya kolonize olmasında en önemli aşama olan adezyon aşamasını önler ve kullanılan antibiyotiklerin balgamdaki konsantrasyonunda artış sağlayarak antibiyotikler ile sinerjik etki gösterir (Biagi ve ark. 1989, Gazzani ve ark. 1989). Erdostein antiadeziv

etkisini, bakteri fimbriasındaki disülfid bağlarını kırarak bakterinin hücre reseptörüne bağlanmasını sağlayan yapıyı bozma şeklinde gösterir. Bu etkisi kanıtlanmış tek mukolitik ajandır (Braga ve ark. 1999).

Erdosteine antoksidan aktiviteye sahip olduğu bilinerek birçok çalışmada bu özelliğinden dolayı kullanılmış ve serbest radikal oluşumunu önlediği biyokimyasal ve histolojik olarak gösterilmiştir (Koç ve ark. 2005, Yağmurca ve ark. 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar

Bu deneysel çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MKUHDEK) tarafından etik kurul yönergesine uygun bulunarak onaylanmıştır. Çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde (MKUDAM) gerçekleştirildi. Dokuların boyanması, mikrofotograflanması ve incelenmesi aşamaları Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada 32adet, 250 ± 20 gr ağırlığında, *Wistar albino* erişkin erkek sıçan kullanıldı. Deneylerde kullanılan hayvanlar Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Yeni ortama adaptasyon için 5 gün süreyle bekletildi. Deney süresince hayvanların deney ortamı; ışık düzeni 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve sıcaklık 20 ± 2 °C olacak şekilde ayarlandı. Deney süresince hayvanlar standart pellet yem ve şehir şebeke suyu ile ad libitum olarak beslendi.

Her grupta 8 hayvan olmak üzere, 4 gruba ayrılan hayvanlara 10 gün boyunca ilaç uygulamaları yapıldı.

Gruplar:

1. Kontrol grubu (n:8)
2. Siklosporin grubu (n:8)
3. Siklosporin +Erdosteine grubu (n:8)
4. Erdosteine grubu (n:8)

3.2. İlaçlar ve Uygulama Yolları

Deneyde hayvanlara uygulanan maddeler Siklosporin, Erdosteine ve Serum fizyolojiktir (SF).

Kontrol grubundaki hayvanlara 0,5 ml SF, intraperitoneal yolla verildi.

Siklosporin, Novartis Sandimmun® 50 mg/ml ampul kullanıldı. 50 mg siklosporin içeren her ampul, 4 ml SF ile seyreltilti. Her ampulden 5 ml; 50 mg siklosporin içeren çözelti elde edildi. Siklosporin 20 mg/kg dozunda, intraperitoneal (i.p) yolla verildi.

Erdosteine, Sandoz Erdostin 300 mg/kapsül kullanıldı. Her bir kapsül 10 ml'lik bikarbonat içerisinde çözüldü. Oluşan karışımdan 2 ml alınarak, üzerine 8 ml daha bikarbonat ilave edildi. Elde edilen 10 ml'lik çözelti 60 mg erdosteine içermekteydi. Her uygulamada bu karışımdan hayvanlara 0,5 ml uygulandı. Erdosteine 12 mg/kg dozunda, özofagial-prob aracılığıyla intragastrik yolla verildi.

Çizelge 3.1. Deney grupları ve ilaç uygulamaları

Gruplar	Uygulanan madde	Uygulama yolu	Doz
1.Kontrol grubu	SF	İntraperitoneal	20 mg/kg
2.Siklosporin grubu	Novartis, Sandimmun® 50 mg/ml ampul	İntraperitoneal	20 mg/kg
3.Siklosporin+ Erdosteine grubu	Novartis, Sandimmun® 50 mg/ml ampul + Sandoz, Erdostin 300 mg/kapsül	Siklosporin intraperitoneal, erdosteine oral	Siklosporin 20 mg/kg, Erdosteine 12 mg/kg
4.Erdosteine grubu	Sandoz Erdostin 300 mg/kapsül	Oral	12 mg/kg

3.3. Cerrahi Uygulama

On günlük deney sonunda ratlara intraperitoneal olarak Ketamin (90 mg/kg)- Xylazin (10 mg/kg) anestezi uygulandı. Hayvanlar ön orta hattan açıldı. Kanatma yöntemi ile kalpten kan alınarak hayvanlar öldürüldü. Hedef doku olan testisleri alındı. Dokular SF ile temizlendikten sonra uygun büyüklüklerde bölünerek tespit solüsyonuna alındı.

3.4. Histolojik Tekniklerin Uygulanması

Alınan testis dokuları, daha iyi tespit sağlanması için yaklaşık 1 cm³'lük parçalar halinde %10'luk nötral formaldehite alındı. Tespit solüsyonu haftada iki kez değiştirilerek fiksasyon yenilendi. Fiksasyon aşamasından sonra dokular, klasik histolojik takip metoduyla takip edilip parafine gömüldü.

Takip aşamaları:

1.Hidratasyon (çeşme suyu altında, 12 saat)

2.Dehidratasyon

%70 alkol 1 saat

%80 alkol 1 saat

%90 alkol 1 saat

%96 alkol 1 saat

Absolü alkol 2×½ saat

3.Şeffaflandırma

Xylene 2×1 saat

2. Parafine Gömme

Xylene + parafin 1 saat

Sıvı parafin 1 saat (etüvde)

Katı parafin 1 saat

3. Bloklama

Bloklanan dokulardan mikrotomla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler etüve alınarak 30 dakika bekletildi ve boyama için hazır hale getirildi. Dokular verilen prosedürlere göre Hematoksilen-Eozin, PAS ve Elastik doku boyası ile boyandı.

Hematoksilen- Eozin (HE) boyama (SIGMA-ALDRICH MHS 128- HT110180):

Dokunun genel histolojik yapısını incelemek amacıyla HE boyama yapıldı. Dokular aşağıdaki prosedüre göre HE ile boyandı.

1. Xylene I 5 dk
2. Xylene II 5 dk
3. Absolü alkol 3 dk
4. Absolü alkol 3 dk
5. %96 alkol 3 dk
6. %80 alkol 3 dk
7. %70 alkol 3 dk
8. Çeşme suyu 1-2 dk
9. Mayer's hematoksilen 15 dk
10. Çeşme suyu 1-2 dk
11. Eozin 1 dk
12. %96 alkol 30 sn
13. Absolü alkol 30 sn
14. Xylene 30 dk
15. Entellan ile kapatma

PAS (Periodic Acid-Schiff) Boyama (SIGMA-ALDRICH 395B):

Hepatositlerin sitoplazmasındaki glikojen granülleri ve bazal membranların daha iyi incelenebilmesi için dokular PAS ile aşağıdaki prosedüre uygun olarak boyandı.

1. Deparafinizasyon
Ksilol 2×5 dk
2. Hidratasyon
Absolü alkol 2×3 dk
%96 alkol 3 dk
%80 alkol 3 dk
%70 alkol 3 dk
3. Çeşme suyu 1-2 dk
4. Peryodik asit çözeltisi 5 dk
5. Distile suya birkaç kez daldırıp çıkarma

6. Schiff ayracı 10 dk
7. Çeşme suyunda yıkama 5 dk
8. Hematoksilen 90 sn
9. Çeşme suyunda yıkama 3 dk
10. Dehidratasyon
 - %96 alkol 30 sn
 - %100 alkol 30 sn
- 11.Şeffaflandırma
 - Ksilol 30 dk
- 12.Entellan ile kapama

Elastik Lif Boyama (SIGMA-ALDRICH HT25A):

Portal alanlar ve santral vendeki kollajen liflerini görebilmek amacıyla doku Elastik Lif boyası ile aşağıdaki prosedüre göre boyandı.

1. Deparafinizasyon
 - Ksilol 2×5 dk
2. Hidratasyon
 - Absolü alkol 2×3 dk
 - %96 alkol 3 dk
 - %80 alkol 3 dk
 - %70 alkol 3 dk
 - Çeşme suyu 1-2 dk
3. Verhoeff boyası 10 dk
4. Distile suda hafifçe yıkama
5. Ferik klorit solüsyonuna birkaç defa daldırıp çıkarma
6. Çeşme suyunda hafifçe yıkama
7. %95'lik alkole birkaç defa daldırıp çıkarma
8. Distile suda yıkama
9. Van Gieson solüsyonunda bekletme, 1-2 dk.
10. Dehidratasyon
 - %96 alkol 30 sn
 - %100 alkol 30 sn

11. Şeffaflandırma

Ksilol 30 dk

12. Entellan ile kapama

Hazırlanan preparatlar Olympus CX20 ışık mikroskobu ile incelenerek fotoğraflandı.

3.5. Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

Histolojik testleri yapıldıktan sonra çalışma yapılana kadar tüm numuneler 4 ay süreyle -80 °C derin dondurucuda saklandı. Serum numunelerden antioksidan enzimler (MDA, SOD, CAT, GSH-Px) manuel spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.5.1.Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.2.Kullanılan Cihazlar Listesi

	Marka ve Model
Spektrofotometre	Bausch and Lomb Spectronic 20D
Su Banyosu	Thermomix BU
UV spektrofotometre	Schimadzu-UV 260
Santrifüj	NUVE D7200
Soğutmalı Santrifüj	NUVE Centrifuge 5403
Buz Makinesi	Scotsman AF-10
Vorteks	Electro-mag M-16
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 2002
Dijital pH metre	WTW pH S25
Otomatik Pipet	Gilson P-20, P-100, P-200, P-1000 µl
Elektrikli Terazı	Metler P 1210
Aspiratör	Vacumat

3.5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler Listesi

Kimyasallar	Kullanım Yeri	Firma
Amonyum Sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	SOD,GSH-Px	Sigma A6387
Na ₂ EDTA	SOD,GSH-Px	Sigma ED2SS
Hidrojen Peroksit H ₂ O ₂ %30	SOD,GSH-Px, CAT	Merck 1,08597
Bovin Serum Albumin	SOD	Sigma A-2153
Bakır Klorür Dihidrat (CuCl ₂ .2H ₂ O)	SOD	Sigma C-6641
Kloroform (CHCl ₃)	SOD	Merck 24.31
Nitroblu Tetrazolyum (NBT)	SOD	Sigma N-6876
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	SOD	Merck 1.06398
Sodyum Siyanit (NaCN)	SOD	Sigma S3296
Ksantin (C ₅ H ₄ N ₄ O ₂)	SOD	Sigma X-7375
Ksantin Oksidaz (XO)	SOD	Sigma X-1875
n-Bütanol (C ₄ H ₁₀ O)	MDA	Merck 1.00988
2-Tiyobarbitürik asit (TBA)	MDA	Sigma T-5500
Glutasyon Redüktaz	GSH-Px	Sigma G-3664
Glutasyon-redüklenmiş (GSH) (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S)	GSH-Px	Sigma G-6529
NADPH-redüklenmiş	GSH-Px	Sigma N-1630
Potasyum Dihidrojen Fosfat	GSH-Px	Sigma N-6872
Sodyum Azid (NaN ₃)	GSH-Px	Merck 6688
Kadmiyum Granülleri (Cd)	NO	Merck 1.02001
Glisin (NH ₂ CH ₂ COOH)	NO	Merck 1.00590
NaOH	NO	Merck 1.09959
Sülfanilamid (C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S)	NO	Merck 1.11799
N-Naftiletlen Daimin (NDA)	NO	Sigma Z-292982
Bakır (II) Sülfat (CuSO ₄)	NO	Sigma C-1297
Sülfirik Asit (H ₂ SO ₄)	NO	Sigma 68279
Çinko Sülfat (ZnSO ₄)	NO	Merck 1.08883

3.6. Analiz Yöntemleri

3.6.1. Süperoksit Dismutaz Ölçümü

Deneyin Prensipleri

Süperoksit dismutaz aktivitesi; Sun ve arkadaşlarının metodun ve Durak ve arkadaşlarını tariflediği modifikasyona göre tayin metodu: ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri (O_2^-) ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Enzim bulunmayan (Kör) değeri ile enzim bulunan numune absorbanans değerleri hesaba katılır.

Reaktifler

- 0.3 mmol/L Xanthine
- 0,6 mmol / L EDTA (2 Na tuzu)
- 150 μ mol / L NBT
- 400 mmol / L Na_2CO_3
- 1g / L bovine serum albumin (BSA)
- 0.8 mmol/L $CuCl_2$
- 2M $(NH_4)_2SO_4$ (Amonyum sülfat)
- 167 U/L Xanthine Oxidase (XO)

*** İlk 5 kimyasal hacimleri koyu renk cam şişeye köpürtülmeden birleştirilir (**ASSAY reaktifi**). Toplam hacim 490 mL oldu; her numune için 2.85 mL kullanılacağından 170 numune çalışılabilir. Miadı yaklaşık 2-8°C'de 2 aydır.

Deneyin yapılışı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
ASSAY reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt (Etanol fazı)	-	0.10
Bidistile su	0.10	-
167 U/L XO	0.05	0.05

Kör tüpüne enzim ilâvesi ile tüp altüst edilir ve inkübasyon süresi başlatıldı. 25 °C'de 20 dakika inkübasyon sonu hemen; kör ve numune tüplerine 0.08 mM/L CuCl₂ pipetlendi ve reaksiyon durduruldu. Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm.'de okundu.

Hesaplama

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune(AN)}] / (\text{AK}) \times 100$$

% 50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için;

$$\%50 \text{ inhibisyon} = (\text{AK}-\text{AN}) / \text{AK} \times 20 = \text{Spesifik aktivite (SA)}$$

** Eritrosit için: SA x 5 (sulandırma faktörü) / Hb (gr/mL) = Ü/gr hemoglobin

3.6.2. Katalaz Ölçümü

Deney Prensipleri

Katalaz aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (Aebi 1974). Deney ortamına eklenen H₂O₂ 'nin numune içinde bulunan katalaz tarafından ortamdaki uzaklaşması esasına göre ölçüm yapılır. H₂O₂'nin spektrofotometrik olarak 240 nm' deki absorbansı kaydedilir.

Reaktifler

- Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM)
- H₂O₂ çözeltisi: Absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponu olup; yaklaşık 300 mL pH 7, 50 mM olan fosfat tamponu renkli kaba (plastik, cam olabilir) aktarıldı. Spektrofotometre fosfat tamponuna göre sıfırlanıp renkli kabdaki tampona 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilâve edildi. Optik Dansite 0.500 nm oluncaya kadar devam edildi.

Deneyin yapılışı

Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda fosfat tamponuna göre sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisinin absorbansı 0.500'e ayarlandı.

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ çözeltisi	0.01	2.99
Hemolizat	-	0.01

Numune ilâvesi ile quartz küvetin ağzı bekletilmeden kapatılıp hemen küvet alt-üst edilip absorbans okundu. Absorbans azalması her 10 sn'de bir defa olmak üzere 2 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (OD₁) ve en düşük (OD₂) değerleri esas alınır.

Hesaplama

$$K = [2.3 \times \log (OD_1/ OD_2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$K/\text{mg Hb} = k / [(\text{mg/dl Hb}) \times 1000]$$

3.6.3. Glutasyon Peroksidaz Ölçümü

Deney Prensipleri

GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (Paglia ve Valentine 1967). Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın $NADP^{+}$ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorban azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

*** **Enzim Ünitesi:** Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarıdır.

Reaktifler

- GSH-Px Tamponu (pH 7, 50 mM Fosfat Tamponu + 5 mM EDTA)
- Amonyum Sülfat (3.2M $(NH_4)_2SO_4$)
- Redükte Glutasyon (150 mM)
- 1M NaN_3 (Sodyum Azid)
- GSH-Redüktaz
- 2 mM Hidrojen Peroksit

Deneyin Yapılışı

Reaktifler	Numune (mL)
Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM) + EDTA	2.650
150 mM Redükte GSH	0.100
8 mM NADPH	0.100
GSH-Redüktaz	0.010
1 M NaN_3	0.010
Numune	0.020

*** 30 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldıktan sonra her tüpe 2 mMH_2O_2 'dan 0,100 ml pipetlendi. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin

absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

Hesaplama

$$\text{IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{IU/mg Hb} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg Hb} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

ΔA = OD değişimi, t = zaman (dk), W = Enzim çözeltisinin protein miktarı (mg/mL)

$$\text{NADPH} = 6.22 \times 10^{+3} \text{ M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$$

3.6.4. Malondialdehid Ölçümü

Prensip

Lipit peroksidasyonundaki bu yöntem çift kaynatma esasına dayanır. Birinci ısıtmada bağlı olan MDA proteinlerden serbestleştirilerek proteinler çöktürülür, ikinci ısıtmada ise total MDA, TBA ile sıcak ve asidik ortamda renkli kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Hammode ve ark. yönteminde, TBA-MDA'nın oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm'de verdiği absorbansıyla doğru orantılı olarak MDA'nın konsantrasyonu hesaplanmış olur (Hammouda ve ark. 1995).

Reaktifler

- % 10'luk triklorasetik asit (TCA)
- % 0.675'lik tiobarbitürik asit (TBA)

Deneyin yapılışı

Kontrol ve numunetüplerine 2,5mL TCA(%10) kondu. Numunetüpüne 0,5mL serum, kontrolüpüneise 0,5mL distile su eklendi. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak önceden 90°C'ye kadar ısıtılmış su banyosu içinde 15dakika bekletildi. Bekleme süresi sonunda tüpler su banyosundan çıkarılarak akan musluk suyu altında soğutuldu. 3.000 rpm de 10 dakika çevrildi.

10 mL'lik vidalı-kap cam tüp	Kör tüpü (mL)	Numune tüpü (mL)
% 10'luk TCA (mL)	2.5	2.5
Numune (mL)	-	0.5
Distile su (mL)	0.5	-

Üstteki süpernatandan 2'şer mL başka boş tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine 1mL TBA çözeltisi (%0.675) eklendi ve aynı şekilde ağızları sıkıca kapatılarak 90°C'lik su banyosunda 15dakika bekletildi.

10 mL'lik vidalı-kap cam tüp	Kör tüpü	Numune tüpü
Süpernatant (mL)	2	2
% 0.675'lik TBA (mL)	1	1

Süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler akan musluk suyunda soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı numunenin absorbansı ölçüldü.

Hesaplama

Körün absorbansı numunenin absorbansından çıkartılarak net absorbanslar bulundu. TBA-MDA kompleksinin 532nm'deki molarektinksiyon katsayısı olan $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'den faydalanılarak ve dilüsyon faktöründe dikkate alınarak nmol/mL cinsinden MDA konsantrasyonları hesaplandı.

3.6.5. Nitrik Oksit

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (Lit NO₁). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO₂⁻) daha sonra da nitrate (NO₃⁻) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma

gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu açıdan biz nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçtük. Zor olmakla birlikte *in vivo* olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO propları geliştirilmiştir ama bunların *in vitro/ex vivo* şartlarda çalışılması mümkün değildir (Lit NO₂).

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir (Lit NO₃). Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu (Cortas ve Wakid 1990) ile değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune (homojenat, serum, eritrosit) süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi.

Reaktifler

- Kadmiyum granülleri
- Glisin-NaOH tamponu pH 9.7
- Sülfanilamid
- NNDA
- 5 mmol/L CuSO₄
- 0.1mol/L H₂SO₄
- 0.1 mol/L NaNO₂
- 75 mmol/L ZnSO₄
- 55 mmol/L NaOH

Deneyin Yapılışı

Deproteinizasyon işlemi: 500 µL numune + 2mL 75 mmol/L ZnSO₄ ile vortekslendi. 1.250 mL 55 mmol/L NaOH eklenip yeniden vortekslendi [(200 µL numune + 800 µL 75 mmol/L ZnSO₄ vortekslendi) + 1 mL 55 mmol/L NaOH vortekslendi] ve 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.

Nitrat Tayini: Glisin tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granüllü tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edildi. Üzerine 1 mL deproteinize numune ve 2 mL deiyonize su ilâve edildi, tüplerin ağzı kapatıldı. 90 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda ara ara kadmiyumlu tüpler alt-üst edilerek inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Nitrit Çalışma Tablosunda numune veya standart olarak kullanıldı.

	Blank (mL)	Deprot. Örnek (mL)	St1	St2	St3
Deproteinize Örnek	-	2	-	-	-
St1	-	-	2	-	-
St2	-	-	-	2	-
St3	-	-	-	-	2
Distile H ₂ O	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sülfanilamid çöz.	1	1	1	1	1
NNDA	1	1	1	1	1

Tüpler vorteksleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra 20-60 (45) dk. Oda sıcaklığında inkübe edildi. 545 nm'de köre karşı okundu.

3.7. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen biyokimyasal bulguların değerlendirilmesinde MedCalc 12.3.0.0 istatistik paket programı kullanıldı. Gruplar ortalama \pm standart sapma olarak belirtildi.

Tüm grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis (H Testi) kullanıldı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

Histolojik verilerin değerlendirilmesinde HE ile boyanan preparatların skorlaması yapılırken histolojik değişiklikler; Sınıf 0 = yok (bulgu yok), Sınıf 1 = hafif (<%25 alanda herhangi bir bulgunun varlığı), Sınıf 2 = orta (alanların %25-50'sinde herhangi bir bulgunun varlığı), Sınıf 3 = ağır (>% 50 alanda bulgu olması) olarak değerlendirildi.

Testislere ait 50 kesit hemoraji, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, seminifer tübül dejenerasyonu, tübüler atrofi ve nekroz varlığı açısından Erpek ve ark. (2004) çalışmalarından modifiye edilen skorlama sistemine göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4. Grupların histolojik olarak skorlanması

	Kontrol	Siklosporin	Erdosteın	Erdosteın + Siklosporin
Kesit 1	0	2	1	1
Kesit 2	0	3	0	0
Kesit 3	0	2	1	1
Kesit 4	1	2	0	0
Kesit 5	0	3	0	1
Kesit 6	1	3	1	0
Kesit 7	0	3	0	1

4. BULGULAR

Testis dokusunda siklosporin A (CsA) etkisi ile oluşturulan oksidatif strese karşı erdosteinin koruyucu etkisinin değerlendirilmesini amaçlayan bu çalışmada, deney süresi tamamlayıncaya kadar hayvan kaybı olmadı. II. grup (Siklosporin grubu) ve III. grupta (Siklosporin + Erdosteine grubu), I.(Kontrol grubu) ve IV.(Erdosteine) gruplara göre yem ve su tüketiminde azalma görüldü. Buna bağlı olarak II. ve III. gruplarda ağırlık kaybı olduğu görüldü.

Deneylerin sonunda hayvanlar ketamin/ksilazin anestezisi (60/5 mg her 1 kg için) ile uyutuldu. Toraks orta hattan açılarak kalpten 3-4 ml kadar kan alındı. Kanatma yöntemi ile öldürülen hayvanların testisleri çıkarıldı ve ikiye bölünerek bir parçası biyokimyasal incelemeler için -20 santigrat derecede saklandı, diğer parçası ise histopatolojik incelemeler için formaldehit solüsyonunda muhafaza edildi. Histolojik incelemeler H-E boyama ile yapıldı ve ışık mikroskobu kullanıldı.

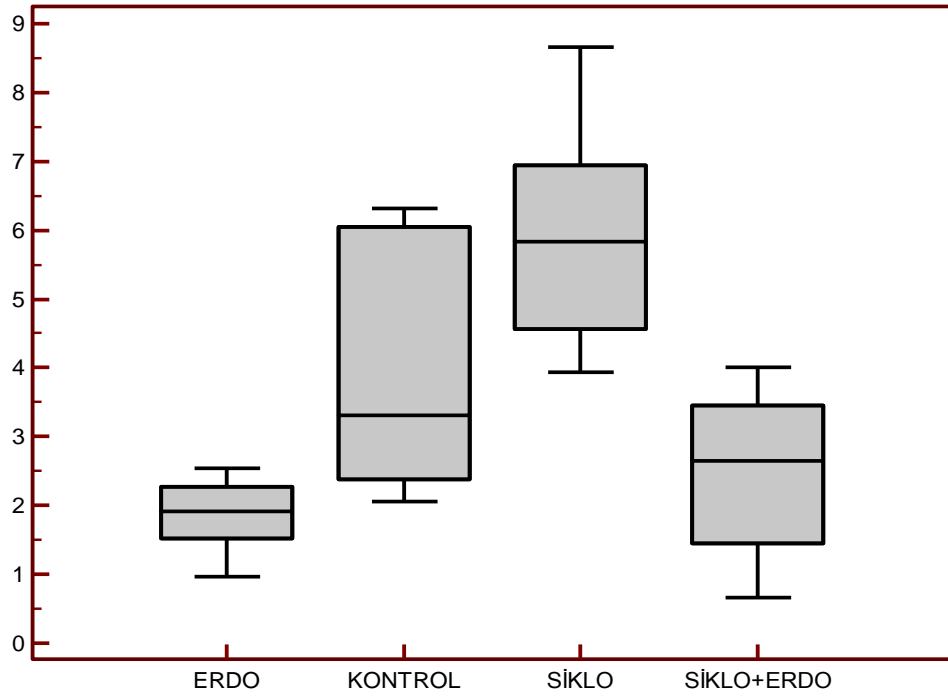
Testis dokusunda biyokimyasal incelemelerde; oksidatif stres göstergelerinden malonildialdehit (MDA) ve nitrik okside (NO) doku homojenatından, antioksidan enzimler olan katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) homojenat süpernatandan; total (Cu-Zn and Mn) superoksit dismutaza (SOD) etanol/kloroform ekstraktından çalışıldı. Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde birbirleri ile karşılaştırılarak Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1. MDA, NO seviyeleri ile SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırılması (ortalama±standart sapma)

	MDA (nmol/ g protein)	SOD (U/g protein)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (U/gprotein)	NO (umol/g yaş doku)
I- Erdosteın	1.86±0.54	0,168±0.011	0,143 ± 0.068	1,101 ± 0.420	0.015±0.008
II- Kontrol	4.1±1.89	0,168±0.018	0,126 ± 0.058	1,223±0.234	0.018±0.006
III-Siklosporin	5.98±1.64	0,161±0.028	0,070 ± 0.047	0,960±0.253	0.034±0.018
IV- Siklosporin + Erdosteın	2.89±1.23	0,162±0.013	0,013 ± 0.009	0,846±0.317	0.025±0.009
Between-groups comparisons (<i>p</i> values)					
p<(I vs. II)	<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p<(I vs. III)	<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	<0.05
p<(II vs. III)	<0.05	n.s.	n.s.	<0.05	<0.05
p<(I vs. IV)	n.s.	n.s.	n.s.	<0.05	<0.05
p<(II vs. IV)	n.s.	n.s.	n.s.	<0.05	<0.05
p<(III vs. IV)	<0.05	n.s.	n.s.	<0.05	<0.05

4.1. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle MDA Tayini İstatistik Verileri

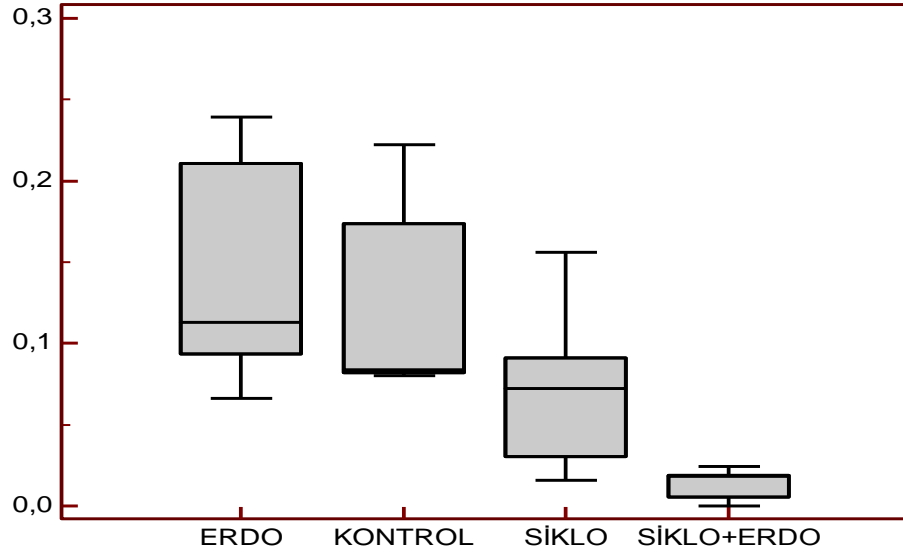
MDA (nmol/g protein) düzeyi, manuel spektrofotometrik olarak çalışıldığında Siklosporin verilen grupta, Kontrol ve Erdosteine verilen gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde artış gösterdi ($p<0,05$). Bununla beraber Erdosteine verilen grup ile Siklosporin+erdosteine verilen gruplara ait MDA düzeyleri, Siklosporin verilen gruba göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0,05$). MDA düzeylerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. MDA seviyelerinin nmol/g protein türünden gruplara göre dağılımı ($p<0,05$)

4.2. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle CAT Tayini İstatistik Verileri

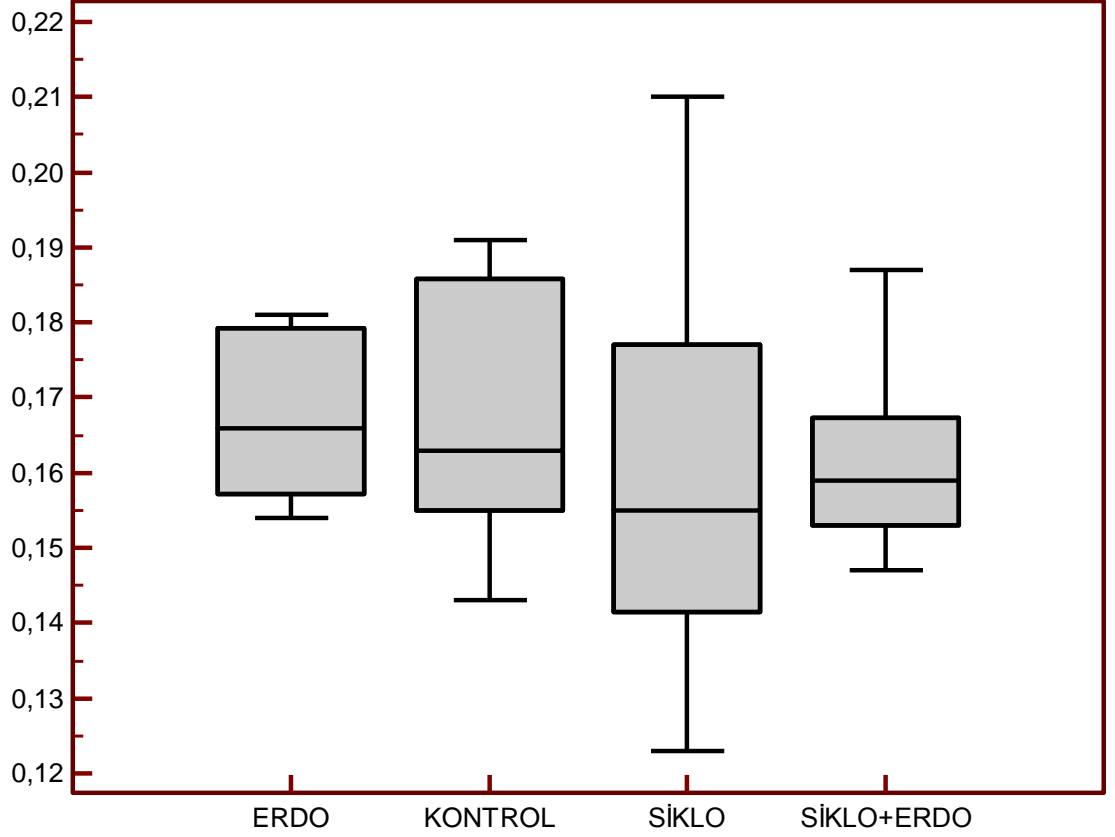
Siklosporin ve Siklosporin+Erdostein verilen gruplarda ölçülen CAT aktiviteleri, Erdostein ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük aktivite gösterdi. Ayrıca Erdostein verilen grubunda Siklosporin ve Siklosporin+Erdostein gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bir aktivite gözlemlendi ($p<0,05$). CAT aktivitelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2. CAT aktivitelerinin gruplara göre dağılımı ($p<0,05$)

4.3. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle SOD Tayini İstatistik Verileri

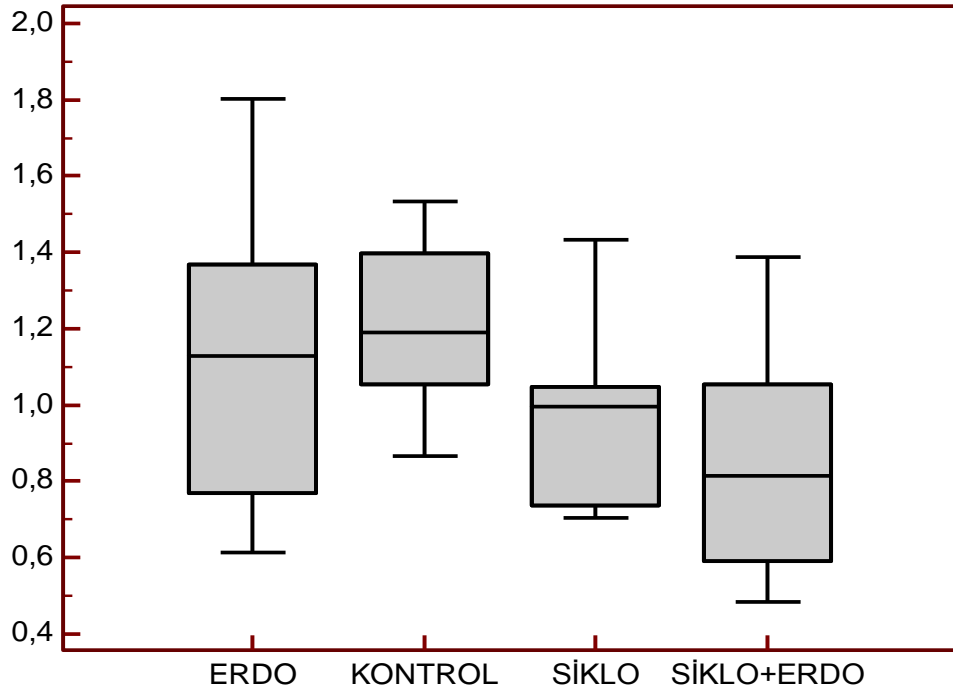
SOD aktiviteleri, manuel spektrofotometrik yöntem ile çalışıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). SOD aktivitelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. SOD aktivitelerinin tüm gruplara göre dağılımı ($p>0,05$)

4.4. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle GSH-Px Tayini İstatistik Verileri

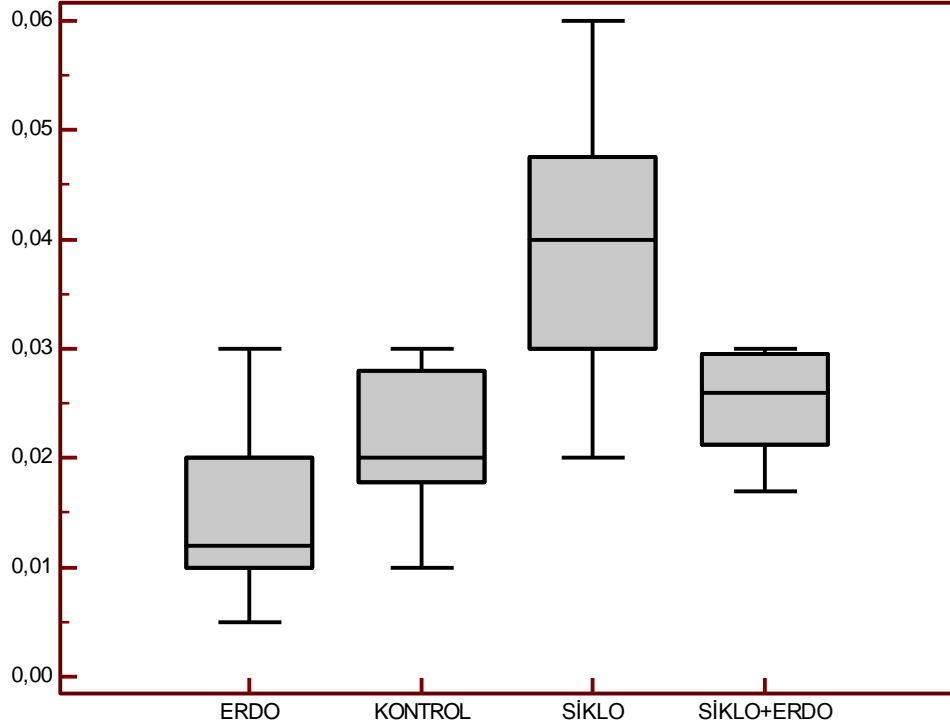
GSH-Px aktiviteleri, manuel spektrofotometrik yöntem ile çalışıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Ancak siklosporin verilen gruba ait GSH-Px aktivitelerinde, kontrol ve erdostein verilen gruplara kıyasla istatistiksel olmayan bir azalış gözlemlendi. GSH-Px aktivitelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. GSH-Px aktivitelerinin tüm gruplara göre dağılımı ($p>0,05$).

4.5. Manuel Spektrofotometrik Yöntem İle NO Tayini İstatistik Verileri

NO (nitrit/nitrat) düzeyleri, manuel spektrofotometrik yöntem ile çalışıldığında Siklosporin ve Siklosporin+erdostein grublarında, kontrol ve Erdostein gruplarına göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Bununla beraber Siklosporin+erdostein verilen gruba ait NO düzeyleri, Siklosporin verilen gruba göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0,05$). NO seviyelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. NO seviyelerinin kontrol ve diğer gruplara göre dağılımı ($p<0,05$)

4.6.Histopatolojik Testlerin Verileri

Işın mikroskopik incelemesi için testis dokuları alındı ve %10 nötral tamponlu formalin çözeltisinde tespit edildi. Parafine gömüldükten sonra 5 µ luk kesitler alındı ve hematoksilin ve eozin ile boyandı. İstatiksel analiz için, her gruptan testis dokusuna ait 7 kesit hazırlandı. Toplamda 28 kesit incelendi ve histopatolojik değişiklikler Olypus CX-41 fotomikroskop bağlı DP 20 kamera ile fotoğraflandı.

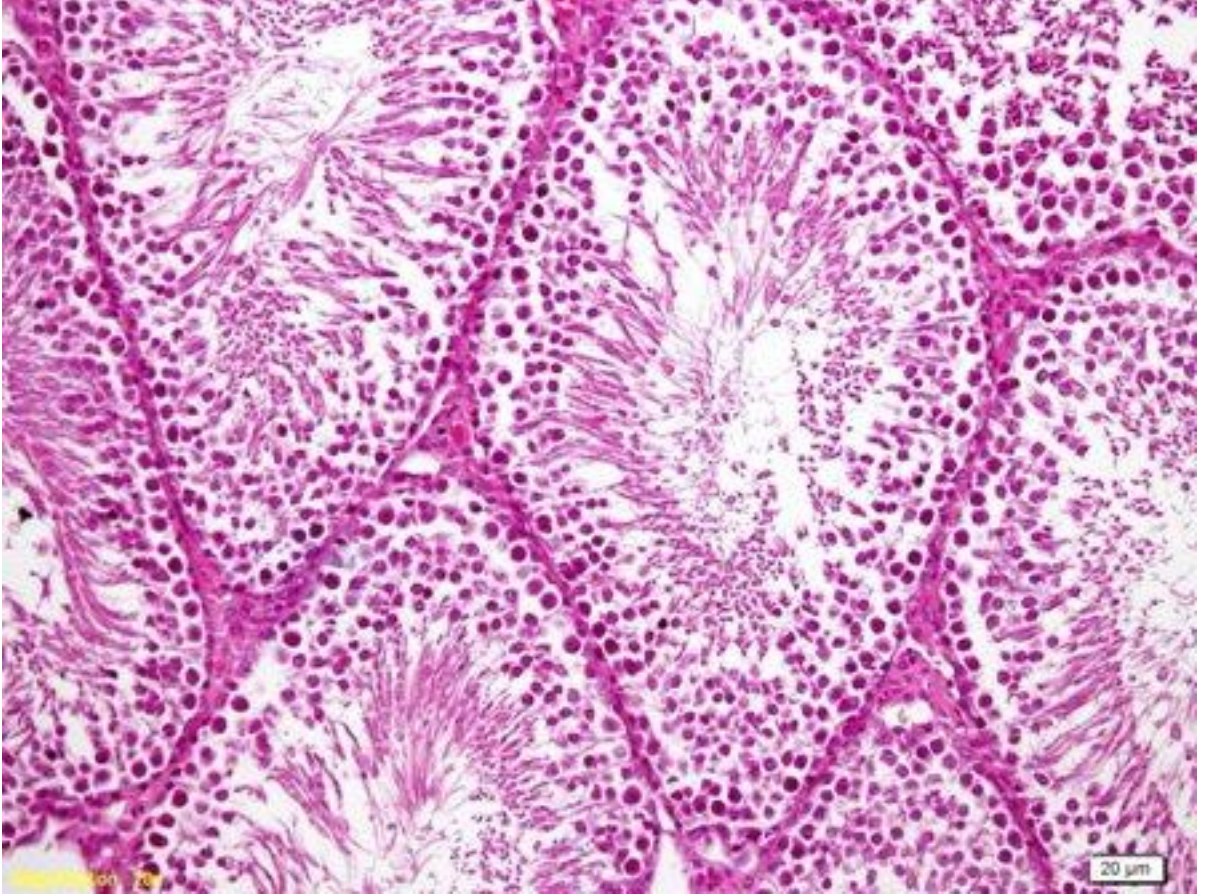
Testislere ait 50 kesit hemoraji, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, seminifer tübül dejenerasyonu, tübüler atrofi ve nekroz varlığı açısından Erpek ve arkadaşlarının (Erpek ve ark., 2004) çalışmalarından modifiye edilen skorlama sistemine göre değerlendirildi. Sınıf 0 = yok (bulgu yok), Sınıf 1 = hafif (<%25 alanda herhangi bir bulgunun varlığı), Sınıf 2 = orta (alanların %25-50'sinde herhangi bir bulgunun varlığı), Sınıf 3 = ağır (>%50 alanda bulgu olması).

Testis dokuların histopatolojik değerleri Çizelge 4.2.de verildi.

Çizelge 4.2. Testis dokuların histopatolojik değerleri

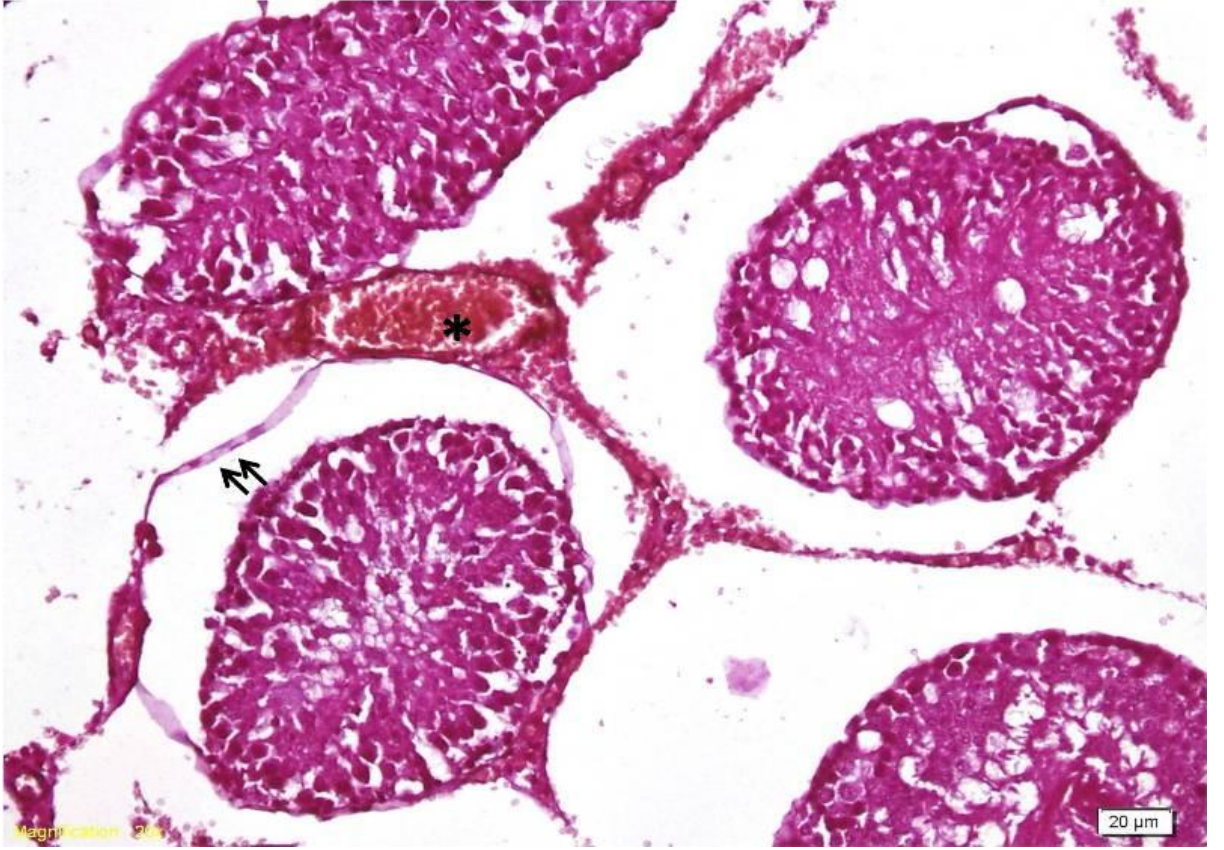
Kesit	Kontrol	Erdosteın	Siklosporin	Erdosteın+Siklosporin
Kesit 1	0	1	2	1
Kesit 2	0	0	3	0
Kesit 3	0	1	2	1
Kesit 4	1	0	2	0
Kesit 5	0	0	3	1
Kesit 6	1	1	3	0
Kesit 7	0	0	3	1

Testis dokusu histolojik değerlendirmesinde ise kontrol grubunda normal bir tübül morfolojisi saptandı. Seminifer tübüllerin germinatif epitelinin ve intersitisiyel alanda yer leyding hücrelerinin histolojisinin normal olduğu saptandı (Şekil 4.6).



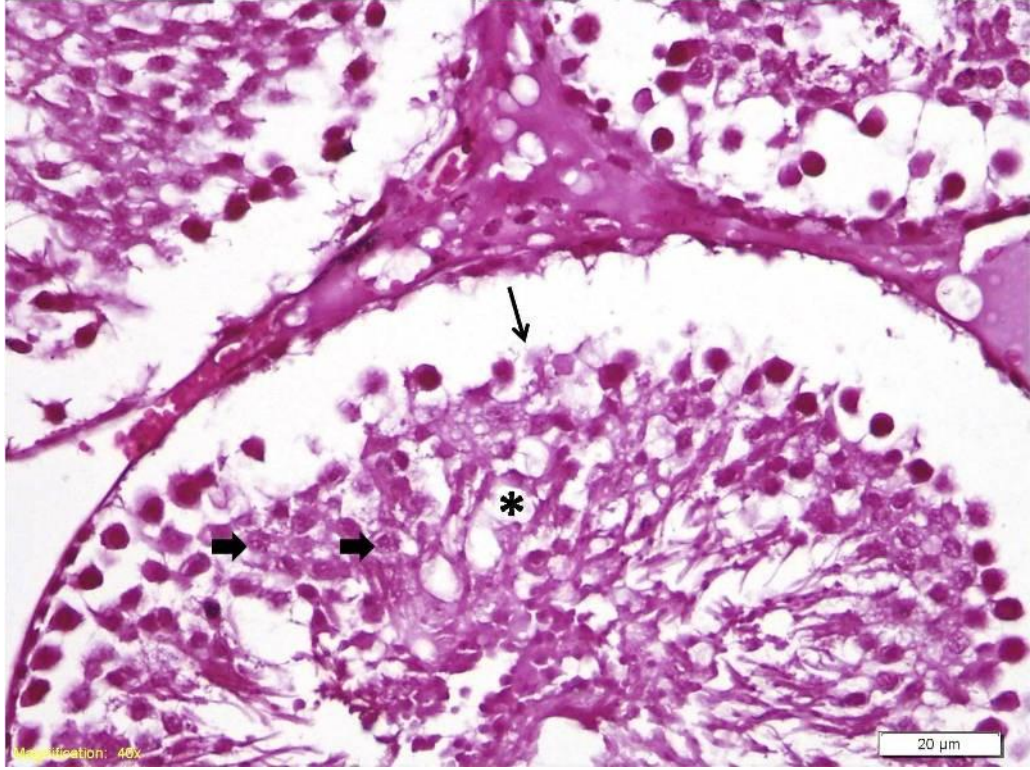
Şekil 4.6. Testis dokusunda normal tübül morfolojisi

Siklosporin grubunda histolojik yapıda tübüler büzülme, hemoraji ve dejenerasyon görüldü. Ayrıca Siklosporin grubunda seminifer tübüllerde atrofi dikkat çekmekteydi ve kontrol grubuna kıyasla daha dar bir seminifer tübül çapına sahip oldukları görüldü. Büzülen seminifer tübüllerde bazal membrandan ayrılmalar görüldü. Ve germinatif epitelde lümeneye dökülmelere rastlandı. Bununla birlikte kan damarlarında genişlemeler ve hemoraji de tesbit edildi (Şekil 4.7.).



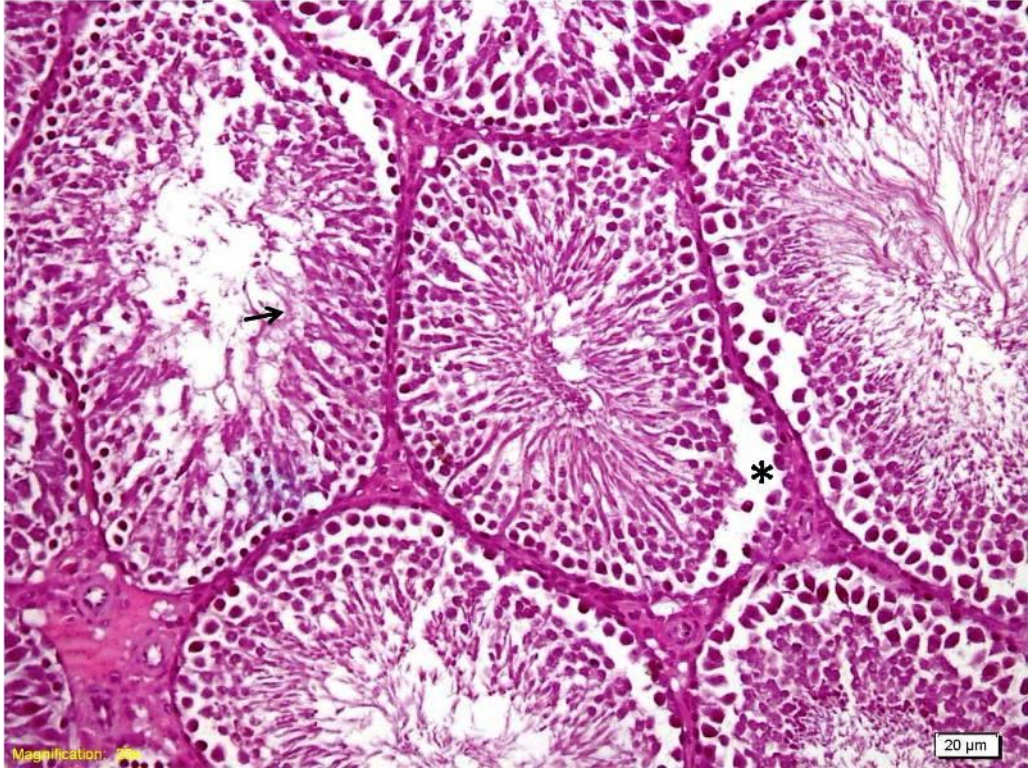
Şekil 4.7. Siklosporin uygulanmış testis dokuda tübüler büzülme, hemoraji ve dejenerasyon.

Tübüler epitelyumda yüksek büyültmede dökülme, ağır hücresel dejenerasyon ve hücre kaybı görüldü (Şekil 4.8.). Bazal membrandan ayrılarak lümene doğru dökülen germinatif epitel incelendiğinde apoptotik görünümlü hücelere rastlandı. Yine germinatif epitel hücelerinde sitoplazmada vakuoller ve lipit birikimi dikkat çekmekte idi.



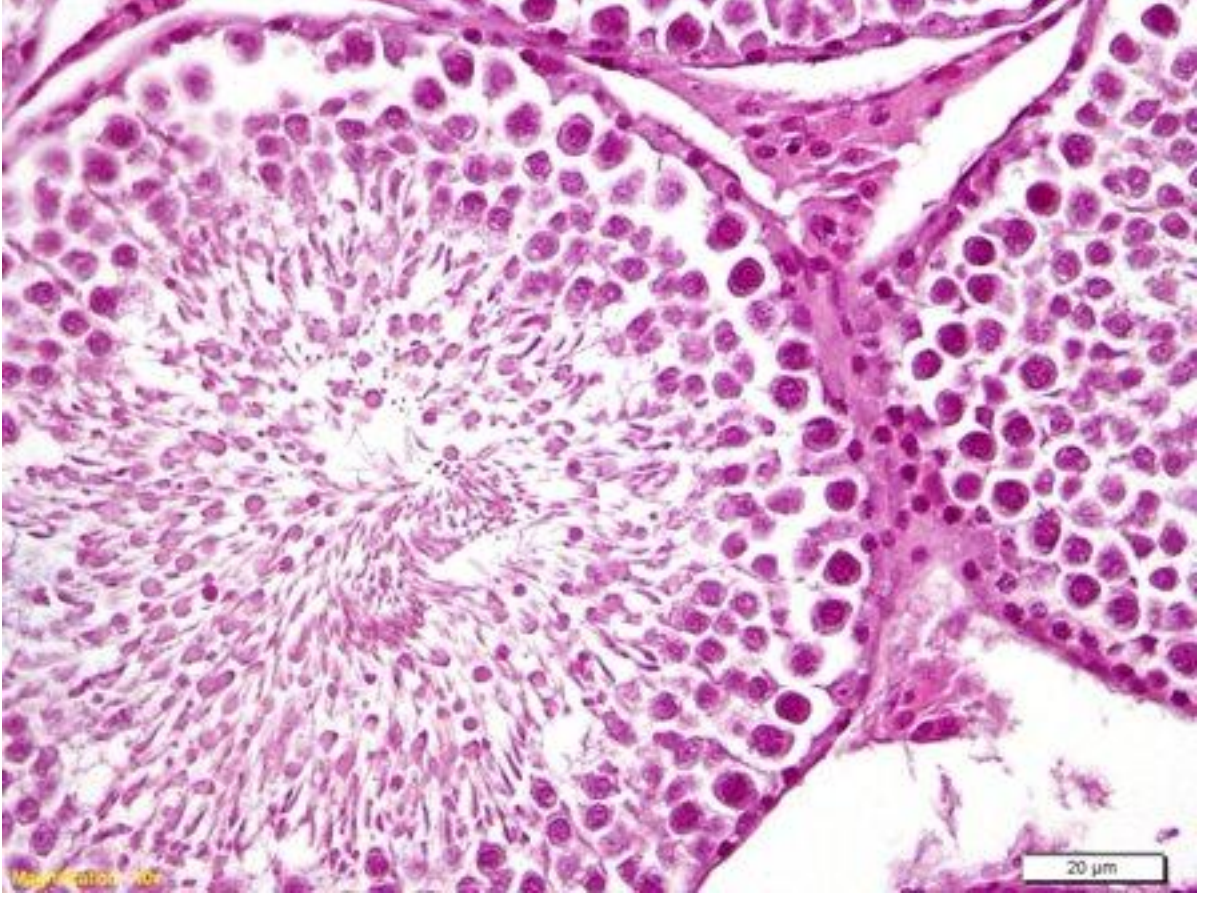
Şekil 4.8. Epitel bir dekolman (→), Siklosporin grubunda azaltılmış hüceliler (*) ve dejenere hüceler (kalm ok).

Erdostein+Siklosporin grubunda Erdostein uygulaması, tübüllerde minimal dökülme ve dejenerasyon olacak şekilde katkı sağlandı (Şekil 4.9.). Kesitler incelendiğinde yer yer bazal membranda ayrılmalar gözlemlendi. Seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerin siklosporin grubuna göre daha normal olduğu, sitoplazmik vakuollerin ve lipit birikiminin azaldığı görüldü.



Şekil 4.9. Siklosporin+Erdostein grubunda minimal dökülme (*) ve dejenerasyon hücreleri (kalın ok).

Erdostein grubunda túbüllerin normal yapıya sahip olduğu bulundu. Histolojik yapının kontrol grubu ile benzer seyrettiği ve erdosteinin spermatogenik seri hücrelerde bir hasara yol açmadığı görüldü (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Erdostein grubunda normal tubul morfolojisi.

5.TARTIŞMA

Literatür araştırmamıza göre bu çalışma, siklosporin A'ya bağlı testis hasarında erdosteinin etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır. Őimdiye kadar, Erdostein'in, metotreksat ile indüklenmiş testis hasar modellerinde yararlı etkileri olduğu bulunmuştur (Oktar ve ark. 2010). Diğer taraftan, Siklosporin A'nın testiküler ve spermatozal hasara oksidatif stres ile ilişkili olarak neden olduğu bildirilmiştir (Türk ve ark. 2010). Ancak Siklosporin A'ya bağlı testis hasarında erdosteinin muhtemel etkileri daha önce tam olarak incelenmemiştir. Bu bağlamada biz bu alışmamızda, Siklosporin A'nın rat testis dokusunda oksidatif-antioksidatif duruma etkisi ve erdosteinin muhtemel antioksidan koruyucu etkisini biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Testis, içi ve dışındaki boşaltma yolları, penis ve yardımcı bezler ile beraber erkek üreme sistemini oluştururlar. Testis üreme hücresi olan spermatozoonun üretildiği organdır (Abadir ve ark. 1979). Testisler, i ve dış salgı yapan birleşik tübüler karma bezlerdir. Hücredişı salgısı, testis sıvısı ve spermiumdur. Hücreii salgısı ise steroid yapıda testosteron hormonudur. Testislerin üreme ve hormon salgılama gibi iki önemli işlevi vardır. Yapılan alışmalar incelendiğinde testis dokusunda oluşturulan toksik etkiyi önlemek için antioksidan kullanıldığı görölmüştür (Kuvandık ve ark. 2008, Yağmurca ve ark. 2007).

Fungal bir siklik peptit olan Siklosporin A (CsA), 1980' li yıllardan itibaren pek çok immünolojik hastalıkta ve organ nakillerinde red reaksiyonlarının önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Diepering ve ark. 1983, Borel ve ark. 1996). CsA aynı zamanda, güçlü bir immün baskılayıcıdır (Bianchi ve ark. 2003, Margreiter ve ark. 1983). CsA'nın kullanımı, transplantasyon hastalarında yaşam kalitesi ve süresini artırmıştır. Fakat ortaya çıkan önemli yan etkiler kullanımını kısıtlamaktadır (Calne ve ark. 1978). Bunlar; nefrotoksisite (Andoh ve ark. 1997, De Mattos ve ark. 2000, Rezzani 2004), kardiyotoksisite (Laczkovics ve ark. 1987, Miller 2002, Rezzani ve ark. 2003), hipertansiyon (Bennet 1988, Textor ve ark. 1994) ve hepatotoksisitedir (Actis ve ark. 1995, Zhong ve ark. 2001). Bunlardan hepatotoksisite en endişe verici yan etkisidir (Rezzani 2004).

Artan serbest radikaller fosfolipit ve glikolipit gibi hücre membranlarına ait lipidler ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonunu artırır. Membran yağ asitlerinin hasarını

artması iyon gradiyentini bozar ve membran geçirgenliğini artırır. Dolayısıyla membran fonksiyonları ve metabolik süreçleri bozar. ROS sentezindeki bu artış, geri dönüşümsüz hücre hasarına neden olabilir (Yagi 1980). ROS çok fazla üretildiğinde ve endojen antioksidan enzimlerce detoksifiye edilemediği durumda, ekzojen antioksidan tedavi endojen antioksidanların detoksifiye edemediği ROS'nin toksik etkisini engellenmesine katkı sağlayabilir (Lee ve ark. 2010). Eğer oksidatif stres antioksidan mekanizmalar tarafından karşılanamazsa hücrelerimizin makromolekülleri olan lipit, protein, karbohidrat ve DNA'ya saldırarak zarar verirler (Greene ve Paller 1991). Mevcut çalışmamızda da CsA aracılı testis dokusunda artan toksik durumda oksidatif durum ile SOD, CAT gibi endojen antioksidan enzimlerin aktivite değişimleri ve ekzojen bir antioksidan olan erdosteinin muhtemel koruyucu etkisi incelenmiştir.

CsA'nın dokularda oluşturduğu hasarın mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte, elde edilen bulgular reaktif oksijen türleri (ROS)'ni artırarak oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir (Amuda ve ark. 2007, Bianchi ve ark. 2003). Lipofilik bir yapıya sahip olan CsA'nın, hücre zarına kolayca bağlandığı ve membranda lipit peroksidasyonunu indükleyerek serbest radikal oluşumuna neden olduğu in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve Salahudeen 1995, Wolf ve ark. 1997, Durak ve ark. 2004). Salem ve ark. (2010) yaptıkları deneysel çalışmada CsA'nın böbrek dokusunda hasara neden olduğunu göstermişlerdir. 25 mg/kg dozunda, 21 gün süreyle CsA uyguladıkları ratların böbrek kortekslerinde kanama ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğunu, ayrıca böbrek tübüllerinde yoğun lökosit birikimi olduğu histolojik olarak gösterilmiştir. Selcoki ve ark. (2007) ratlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada, günde 15 mg/kg dozunda, 21 gün süreyle CsA uyguladıkları kalp dokusunda önemli histopatolojik değişiklikler olduğunu göstermişlerdir. CsA uygulanan kalp dokusunda inflamatuvar hücre artışı, kalp kaslarında organizasyon bozukluğu ve fibrozis oluşumu bulgularına rastlamışlardır. Nacar ve ark. (2006) CsA tedavisi uygulanan böbrek nakli hastalarından alınan biyopsi örnekleri üzerinde yaptıkları elektron mikroskopik incelemelerde; glomerül kapillerindeki endotel hücrelerinde şişme ve fenestra kaybı, dev mitokondri oluşumu bulgularını elde etmişlerdir. Ayrıca podosit hücrelerinde vakuolizasyon, lipit damlacıklarının oluşumu ve podosit hücre ayaklarında hasar oluştuğunu göstermişlerdir. Seethalaksmi ve ark. (1987) sterilityle sonuçlanabilen testiküler fonksiyonda azalma bildirmişlerdir. Rajfer ve ark. (1987) CsA ile testiküler

fonksiyonda bozulmayı göstermişlerdir. Seethalaksmi ve ark. (1987) seksüel olgunluktaki erkek ratlara 14 gün süre ile orta derecede toksik dozda CsA uygulayarak LH'da yükselme, testosteronda azalma, sterilite ve spermatogentik arrest göstermiş ve bu etkilerin doğrudan testiküler toksik etki ile olduğunu ileri sürmüştür. Benzer bir çalışmada Seethalaksmi ve ark. (1990) 40 mg/kg/gün CsA subkutan uygulamışlar ve belirgin testiküler toksisite meydana geldiğini, sonucunda testosteron düzeyinde azalma, infertiliteye gidiş ve spermiogenesiste arrest olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak testis dokusunda histopatolojik bulgular incelendiğinde, CsA verilen grupta seminifer tübüllerde atrofi dikkat çekmekteydi. Bununla birlikte tübüler epitelyumda yüksek büyültmede dökülme, ağır hücresel dejenerasyon, kan damarlarında genişlemeler, hemoraji ve hücre kaybı kaydedildi. Ayrıca germinatif epitelde lümen dökülmelere rastlandı.

CsA aracılı artan hasara serbest radikallerinin de katkı sağladığı bir çok rat dokusunda gösterilmiştir. Yapısında eşlenmemiş elektron içeren moleküllere serbest radikal denmektedir. Serbest radikaller reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS ve RNS) normal hücre metabolizmaları tarafından üretilir. NO, bir RNS olan peroksinitrit üzerinden nitrit ve nitrata yıkılabildiği için NO ve peroksinitritin oksidatif stresi artırma potansiyeli vardır. Serbest radikaller lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olabilmektedir. Biz bu çalışmamızda CsA'nın bu histopatolojik toksik etkilerinin yanısıra biyokimyasal olarak da CsA'nın rat testis dokusuna hasarında serbest radikallerinin katkı sağladığını gösterilmiştir. Şöyleki CsA verilen grupta lipid hasarı göstergesi olarak MDA'nın ve nitrojen kaynaklı bir radikal olabilen NO'nun arttığı tespit edilmiştir.

Oksijen radikalleri ile antioksidan savunma işleyişi sağlıklı organizmada tam bir denge durumunda çalışır. Bu dengenin radikaller lehine bozulması ile ortaya çıkan duruma "oksidatif stres" adı verilir. Oksidatif stres doğal bir süreç olup bu stresi kontrol altında tutan özelleşmiş mekanizmalar vardır. Bunlar ya hücrelerden sentezlenen CAT, SOD, GSH-PX gibi endojen antioksidan enzimlerimizdir yada dışardan verilen ekzojen vitamin A, E, betakaroten gibi maddelerdir. Bu mekanizmaların yetersizliği halinde oksidatif hasar meydana gelir. Lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşim özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (Kenneth ve Bruce 1998). Biz çalışmamızda ekzojen bir

antioksidan olarak erdostein kullandık. CsA ile oluşturulan oksidatif strese karşı erdosteinin koruyucu etkisini histolojik ve biyokimyasal bazda değerlendirdik.

Erdostein, kronik pulmoner hastalıkların tedavisinde kullanılan mukolitik bir ajandır. Bu ajan, ancak karaciğer metabolizması ile serbestleştirilen iki adet tiyol (-SH) grubu içerir. Erdosteinin antioksidan mekanizmasında bu iki tiyol grubu rol oynar. Çalışmamızda da erdostein bir antioksidan olarak görev yaparak CsA'nın artırmış olduğu lipid peroksidasyon ürünü MDA ile peroksinitrit gibi nitrojen kaynaklı radikallerin yıkım ürünü olan nitrit/nitratı (NO) anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. Siklosporin+Erdostein grubuna ait MDA düzeyindeki değerler kontrol grubuna ait değerlere yaklaşmış olmasına rağmen NO düzeylerindeki azalma kontrol grubuna yaklaşmamıştır. Bu durum erdosteinin korucu etkisinin özellikle süperoksit anyon gibi nitrojen dışı radikallerin temizlenmesinde daha etkin olabileceğini desteklemektedir. Klinik ve deneysel birçok çalışma mevcut çalışmamıza benzer olarak erdosteinin antioksidan olarak serbest radikal temizleyici fonksiyonlarının olduğunu göstermiştir (Biagi ve ark. 1989, Inglesi ve ark. 1994, Sahin ve ark. 2006). Diğer bir çalışmada da Nadiger ve ark. (1987) lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA seviyesinin Erdostein verilerek azaltılmasıyla Erdosteinin serbest radikal temizleyici özelliğini göstermiştir.

Kuvandık ve ark. (2008) Asetaminofen (APAP) uygulaması yaparak oluşturdukları hepatotoksik hasarın Erdostein kullanılarak azaltılabileceğini histolojik ve biyokimyasal olarak göstermişlerdir. Çalışmada APAP'ın hepatotoksik etkisine karşı 150 ve 300 mg/kg/gün dozda uygulanan erdosteinin toksik etkiyi azalttığı histolojik ve biyokimyasal olarak gösterilmiştir. Yağmurca ve ark. (2007) yaptıkları deneysel çalışmada Doksorubisin (DXR) uygulanarak ratlarda oluşturulan hepatotoksositeye karşı, Erdostein uygulaması yaparak toksik etkinin azaltılabileceğini göstermişlerdir.

Vagliasindi ve Fregnan (1989) yaptıkları çalışmada, Erdostein'in akciğer dokusunda antioksidan etkiye sahip olan alfa-1 antitripsin düzeyinde artışa neden olduğunu göstermiştir.

Fadillioglu ve Erdoğan (2003) tarafından Doksurobisin ile yapılan bir çalışmada rat eritrositlerinde Erdosteinin, SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimler ile oksidatif hasarlanmasının önlenmesine yardımcı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda ise erdostein verilen grupta CAT aktivitesinde diğer gruplara göre bir artış görülmüştür. Bu antioksidan artış, erdostein verilen gruba ait MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre azalmasını

açıklayabilir. Ancak erdostein grubuna ait CAT aktivitesindeki artış, siklosporin verilen grup ile Siklosporin+Erdostein verilen grubunda tespit edilmedi. Bu antioksidan CAT enzimindeki azalma siklosporin grubundaki MDA ve NO artışına katkı sağlamış olabilir. Ayrıca siklosporin ve Siklosporin+Erdostein verilen gruplarda diğer bir antioksidan enzim olan GSH-Px'da kontrol grubuna göre istatistiksel olmayan bir azalma görülmüştür. Bu azalmada siklosporin grubundaki MDA ile NO ve siklosporin+erdostein grubundaki NO artışına (kontrol grubuna göre) katkı sağlamış olabilir. Şöyleki; Süperoksit radikalini hidrojen peroksit'e çeviren SOD enzim aktivitesinde tüm gruplar arasında benzerlik olup herhangi bir istatistiksel farklılık gözlenmemiştir. Dolayısı ile tüm deney gruplarında eşit miktarda hidrojen peroksit oluştuğunu düşünebiliriz. Hidrojenperoksiti suya çeviren CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerindeki bir azalma fenton reaksiyonu denenen hidrojen peroksitin ağır metaller ile reaksiyona girmesi sonucu en toksik radikal olan hidroksiradikalın artmasına neden olmuş olabilir. Dolayısıyla siklosporin ve Siklosporin+Erdostein verilen gruplarda görülen MDA ve NO artışına, CAT ve GSH-PX enzim aktivitelerinin bu azalışı katkı sağlamış olabilir.

Çalışmamızı genel olarak histolojik ve biyokimyasal yönden değerlendirdiğimizde, 20 mg/kg/gün CsA uygulayarak 10 günde oluşturduğumuz testis hasarı sonucu Siklosporin grubunda kontrol grubuna göre tübüler büzülme, hemoraji, dejenerasyon, tübüler epitelyumda yüksek büyültmede dökülme, ağır hücresel dejenerasyon ve hücre kaybı kaydedildi. Histopatolojik bulguları destekleyen biyokimyasal bulgular ise oksidatif stres göstergesi olan MDA ve NO düzeylerindeki artıştır. Bu artışa antioksidan enzimler olan CAT ve GSH-PX de azalma da katkı sağlamış olabilir. Siklosporin + Erdostein grubunda Erdostein uygulaması, Seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerin siklosporin grubuna göre daha normal olduğu, sitoplazmik vakuollerin ve lipit birikiminin azaldığı görüldü. Siklosporin+Erdostein grubunda iyileşme siklosporin grubuna göre anlamlı bulundu. Buna benzer olarak Siklosporin+Erdostein grubunda MDA ve NO düzeylerinde siklosporin verilen gruba kıyasla azalma görüldü. Sonuç olarak biyokimyasal ve histopatolojik bulgular, bir antioksidan olan erdosteinin siklosporin uygulanarak oluşturulan testis hasarına karşı koruyucu etkisini desteklemektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışma Siklosporin A'ya bağlı testis hasarında, Erdosteine'in etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır.

Çalışmamızı genel olarak histolojik yönden değerlendirdiğimizde, CsA uygulayarak 10 günde oluşturduğumuz Siklosporin grubunda kontrol grubuna göre tübuler büzülme, hemoraji, dejenerasyon, tübuler epitelyumda yüksek büyültmede dökülme, ağır hücresel dejenerasyon ve hücre kaybı kaydedildi. Çalışmamızı biyokimyasal bulguları genel olarak değerlendirdiğimizde ise siklosporin verilen gruplarda oksidatif stres göstergesi olan MDA ve NO düzeylerindeki artış, antioksidan enzimler olan CAT ve GSH-Px de azalma görülmüştür. Histolojik ve biyokimyasal bulgular siklosporinin testis hasarını oluşturduğunu göstermektedir.

Siklosporin+Erdosteine grubunda Erdosteine uygulaması, seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerin siklosporin grubuna göre daha normal olduğu, sitoplazmik vakuollerin ve lipit birikiminin azaldığı görüldü. Siklosporin+Erdosteine grubunda iyileşme siklosporin grubuna göre anlamlı bulundu. Buna benzer olarak Siklosporin+Erdosteine grubunda MDA ve NO düzeylerinde siklosporin verilen gruba kıyasla azalma görüldü. Histolojik ve biyokimyasal bulgular siklosporinin oluşturduğu testis hasarını erdosteine uygulanması ile histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri kısmen de olsa azaltabileceği gösterilmiştir.

Ayrıca tek başına Erdosteine kullanımının testis dokusunda bir hasara neden olmadığı aksine sadece erdosteine verilen grupta kontrol grubuna göre CAT aktivitesindeki artış ve MDA düzeyindeki azalış erdosteinein daha da koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak biyokimyasal ve histopatolojik bulgular, bir antioksidan olan erdosteinein siklosporin uygulanarak oluşturulan testis hasarına karşı koruyucu etkisini desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abadir R, Harman J, Fahim M.** Enhancement of ionizing roollation effect on the testes of rats by microwave or ultrasound-induced hyperthermia. *J. Med*, **1979**, 1-12: s. 1-2
2. **Abraham L.** Üreme Sistemi. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara: **2005**, s. 313-354
3. **Abraham L.** Üreme Sistemi. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara: **2006**, s. 531-564
4. **Acan NL, Tezcan EF.** Kinetic Properties of Sheep Brain Glutathione Reductase Enzyme. **1991**, 45: s. 121-124
5. **Actis GC, Debernardi-Venon W, Lagget M, Marzano A, Ottobrelli A ve ark.** Hepatotoxicity of Intravenous Cyclosporin A in Patients with Acute Ulcerative Colitis on Total Parenteral Nutrition. *Liver*, **1995**, 15: s. 320-323
6. **Aebi H.** Catalase In: Methods of enzymatic analysis. New York and London Academic Press; pp.673-677, 197
7. **Agrawal A, Kale R.** Radiation Induced Peroxidative Damage: Mechanism and Significance. *Indian Journal of Experimental Biology*, **2001**, 39(4): s. 291
8. **Akkuş İ.** Serbest Radikaller ve Fiziopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın, Konya: **1995**
9. **Altınpınar A.** Prediyabetik Bireyler ve Tip 2 Diabetes Mellituslu Hastalarda Oksidatif Stres Belirteçlerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Gata Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara:
10. **Amudha G, Josephino A, Varalakshmi P.** Role of The Lopoic Acid in Recuding the Oxidative Stres Induced by Cyclosporine. *Clinica Chimica Acta.*, **2007**, 372(1-2): s. 134-139
11. **Andoh TF, Burdmann EA, Bennet WM.** Nephrotoxicity of Immunosuppressive Drugs: Experimental and Clinical Observations. *Semin Nephrol*, **1997**, 17: s. 34 – 45
12. **Ariyaratne HBS, Mendis-Hardagama SMLC.** Changes in the Testes Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity, *Biol. Reprod*, **2000**, 62: s. 680-690
13. **Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B.** Oxygen Free Radicals and Human Diseases. *JR Soc Health*, **1991**, 111(5): s. 172-177
14. **Atabekli E, Erdemli E.** Erkek Üreme Sistemi. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme, **2002**, s. 232-233
15. **Avsian-Kretchmer O, Eshdat Y, Gueta-Dahan Y, Ben-Hayyim G.** Regulation of Stress-Induced Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Expression in Citrus Planta. **1999**, 209: s. 469-477
16. **Aydın A, Soyak A, Işimer A.** Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. GATA Basımevi, Ankara: **2001**
17. **Bast A, Haenen GRMM, Cees JAD.** Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *The American Journal of Medicine*, **1997**, 91(supll 3C), 30, 3C-2S-3C-13S
18. **Bennett WM, Porter GA.** Cyclosporine-Associated Hypertension. *Am J Med*, **1988**, 85: s.131– 3
19. **Biagi G, Fregnan G, Gazzani G, Vandoni G.** Erdosteine Protection From Cigarette Smoke-Induced Loss of Alpha 1-Antitrypsin Activity in Rat Lungs. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **1989**, 27(5): s. 235-237
20. **Bianchi R, Rodella L, Rezzani R.** Cyclosporine A Upregulates Expression of Matrixmetaloproteinase 2 and Vascular Endotelial Growth Factor in Rat Heart. *Int. Immunopharmacol*, **2003**, 3: s. 427-433
21. **Borel JF, Baumann G, Chapman I, Donatsch P, Fahr A ve ark.** In Vivo Pharmacological Effects Of Cyclosporine And Same Analogues. *Adv Pharmacol*, **1996**, 35: s. 115-246
22. **Braga PC, Dal Sasso M, Sala MT, Gianelle V.** Effects Of Erdosteine And İts Metabolites On Bacterial Adhesiveness. *Arzneimittelforschung*, **1999**, 49(4): s. 344-50
23. **Buko VU, Sadovnichy VV.** Cytochrome P-450 and Free Radical Generation in Rat Liver Microsomes Under the Influence of Prostaglandin E1. *Biochem Mol Biol Int.*, **1996**, 39(6): s. 1117-1184
24. **Cabuk M, Gurel A, Sen F, Demircan N.** Renoprotective Effect of Erdosteine in Rats Against Gentamicin Nephrotoxicity: A Comparison of 99m Tc-DMSA Uptake with Biochemical Studies. *Mol. Cell Biochem*, **2008**, 308: s. 35-42

25. **Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster ve ark.** Cyclosporin A in Patients Receiving Renal Allografts from Cadaver Donors. *Lancet*, **1978**, 2: s.1323-1327
26. **Cavallini L, Malendowicz LK, Mazzocchi G, Belloni AS, Nussdorfer GG ve ark.** Effects of Prolonged Cyclosporine A Treatment on the Leydig Cells of the Rat Testis. *Virchows Arch*, **1990**, 58: s. 215-220
27. **Chase DJ, Payne AH.** Changes in Distribution and Androgen Production of Leydig Cells of Two Population During Sexual Maturation in the Rat. *Endocrinology*, **1983**, 112: s. 29-34
28. **Cheeseman K, Slater T.** An Introduction to Free Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin*, **1993**, 49(3): s. 481
29. **Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR.** Age-Related Decreased Leydig Cell Testosterone Production in the Brown Norway Rat. *J. Androl*, **1994**, 15(6): s. 551-557
30. **Cortas NK, Wakid NW.** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method: *Clin Chem* 1990;36 (8Pt):1440-1443
31. **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN ve ark.** Oxygen radicals and Human Disease. *Annals of Internal Med*, **1987**, 107: s. 526-545
32. **Dechant K, Noble S.** Erdosteine. *Drugs*. **1996**, 52(6): s. 875-881
33. **Dellmann HD, Brown EM.** Text Book of Veterinary Histology. Lea and Febiger, Philadelphia: **1987**, 3. Baskı: s. 286-312
34. **De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennet WM.** Nephrotoxicity of Immunosuppressive Drugs: Long-Term Consequences and Challenges for the Future. *Am J Kidney Dis*, **2000**, 35:s. 333– 46
35. **Dere F.** Anatomi. Adana: **1994**, 3. Baskı: s. 210-214
36. **Diepering H, Frandsen NE, Kemp E.** Cyclosporine A Bright Propects For Organ Transplantation ?. *Ugeskr, Laeger*, **1983**, 145:36 s. 2749-2752
37. **Dikici İ.** Akut Viral Hepatitlerle Interferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Konya: **1999**, s. 73
38. **Di Ilio C, Sacchetta P, del Boccio G, la Rovere G, Federici G.** Glutathione Peroxidase, Glutathione S-Transferase and Glutathione Reductase Activities in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue. *Cancer Letters*, **1985**, 29(1): s. 37-42
39. **Durak I, Ozbek H, Elgun S.** Cyclosporine Reduces Hepatic Antioxidant Capacity: Protective Roles of Antioxidants. *Int Immunopharmacol*, **2004**, 4: s. 469 – 73
40. **Ecevit H.** Orak Hücre Anemili Hastalarda, Oksidatif Stres Belirteci Olarak 8-Hidroksi Deoksi Guanozin, Malonil Dialdehit ve Protein Karbonil Düzeylerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay: **2013**
41. **Eemaire M, Maurer G, Wood AJ.** Pharmacokinetics and Metabolism. *Prog Allergy*, **1986**, 38: s. 93-107
42. **Ergün S, Sting J, Holsterin AF.** Segmental Angioarchitecture of the Testicular Lobule in Man. *Androl*, **1994**, 26: s. 143-150
43. **Erkoçak A.** Özel Histoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara: **1980**, 3. Baskı
44. **Erpek G, Kurt İ, M, Kurt N, Gürel A.** Adnan Menderes Üniversitesinde İzlenen Zehirlenme Olguları, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 5(3) : 37 - 40
45. **Fadilloğlu E, Erdoğan H.** Effects of Erdosteine Treatment Against Doxorubicin-Induced Toxicity Through Erythrocyte and Plasma Oxidant/Antioxidant Status in Rats. *Pharmacological Research*, **2003**, 47.4: s. 317-322
46. **Fantone JC, Ward PA.** Polymorphonuclear Leucocyte Mediated and Tissue Injury. *Human Pathology*, **1985**, 16: s. 973-978
47. **Finch CA, Bellotti V, Stray S, Lipschitz DA, Cook JD ve ark.** Plasma Ferritin Determination as a Diagnostic Tool. *West Journal Med.*, **1986**, 145: s. 657-663
48. **Freeman BA, Crapo JD.** Biology of Disease: Free Radicals and Tissue Injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, **1982**, 47(5): s. 412
49. **Frei B.** Reactive Oxygen Species and Antioxidants Vitamins: Mechanisms of Action. *The American Journal of Medicine*, **1994**, 197: s. 5-13
50. **Gazzani G, Fregnan GB, Vandoni G.** In Vitro Protection by Erdosteine Against Oxidative Inactivation of Alpha-1-Anti-Trypsin by Cigarette Smoke. *Respiration*, **1989**, 55: s. 113-118
51. **Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR ve ark.** Gene Expression in Rat Leydig Cells During Development from the Progenitor to Adult. *Biol, Reprod*, **2005**, 104.037499
52. **Ge RS, Hardy MP.** Variation in the End Products of Androgen Biosynthesis and Metabolism During Postnatal Differentiation of Rat Leydig Cells. *Endocrinology*, **1998**, 139: s. 3787-3795

53. **Goel SK, Lalwani ND, Reddy JK.** Peroxisome Proliferation and Lipid Peroxidation in Rat Liver. *Cancer Res*, **1986**, 46(3): s. 1324-1330
54. **Gonzales R, Auclair C, Voisin E, Gautero H, Dhermy D ve ark.** Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells from Patients with Malignant Disease. *Cancer Res.*, **1984**, 44(9): s. 4137-4139
55. **Goodman Ga, Rall TW, Nies A, Taylor P.** Godman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. **1990**, 8. Baskı: 1395-1397: s. 1267-1270
56. **Greene EL, Paller MS.** Oxygen Free Radicals in Acute Renal Failure. *Miner ElectrolyteMetab.*,**1991**, 17: s. 124-132
57. **Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeondel C, Cuny G ve ark.** Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase in Blood. *Clin Chem*, **1991**, 37(11): 1932-1937
58. **Gutteridge JM.** Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem Dec*, **1995**, 41: s. 1819-1828
59. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage and Antioxidant Therapy. *Lancet*, **1984**, 23: s. 1396-1397
60. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Free Radicals and Antioxidant Protection: Mechanisms and Significance in Toxicology and Disease. *Human&Experimental Toxicology*, **1988**, 7(1): s. 7-13
61. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press Oxford, **1989**, c.137
62. **Halliwell B, Gutteridge JM.** The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Arch Biochem Biophys Jul*, **1990**, 280(1): s. 1-8
63. **Halliwell B.** Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The American Journal of Medicine*, **1991**, 91(3): s. 514-522
64. **Halliwell B.** Antioxidants In Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, **1996**, s. 16-33
65. **Halliwell B.** Antioxidants In Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, **1996**, 16(1): s. 33-50
66. **Hammouda Ae-R, Khalil MM, Salem A.** Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clin Chem*. 1995;41(9):1314-5. Epub 1995/09/01.
67. **Handagama C, Ariyaratne S.** Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testes. *Biol. Reprod*, **2001**, 65: s. 660-671
68. **Hardly MP, Zirkin BR, Ewing LL.** Kinetic Studies on the Development of the Adult Population of Leydig Cells in Testes of Prepubertal Rat. *Endocrinology*, **1989**, 124: s. 762-770
69. **Haris ED.** Regulation of Antioxidant Enzymes. *Faseb Journal*, **1992**, Vol. 6: s. 2675-2683
70. **Hassa O, Aşti RN.** Embriyoloji. Yorum Basım Yayın, Ankara: **1997**, 3. Baskı: s. 07-10
71. **Henson DE, Block G, Levine M.** Ascorbic Acid: Biologic Functions and Relation to Cancer. *Journal of National Cancer Institute*, **1991**, 83: s. 547
72. **Hofius D, Sonnewald U.** Vitamin E Biosynthesis: Biochemistry Meets Cell Biology. *Trends Plant Science*, **2003**, 8: s. 6-8
73. **Humers HD, Coffman T, Halderman II.** Cyclosporine Nephrotoxicity. A workshop to Discuss Mechanism, Diagnosis and Treatment. *Transpl. Proc.*, **1988**, 6: s. 511-516.
74. **Ichkowski KA, Sun EL, Gondod B.** Morphometric Study of the Prepubertal Rabbit Testes: Germ Cell Number and Seminiferous Tubule Dimensions. *The American Journal of Anatomy*, **1991**, 190: s. 266-272
75. **Inglesi M, Nicola M, Fregnan G, Bradamante S, Pagani G.** Synthesis and Free Radical Scavenging Properties of the Enantiomers of Erdosteine. *Farmaco*,**1994**, 40(11): s. 703-708
76. **Johnson KE.** Histology and Cell Biology. Harwal Publishing Company, USA: **1991**, 2. Baskı: s. 295-304
77. **Jungueria LC, Carneiro J, Kelley OR.** Temel Histoloji. Barış Kitabevi, İstanbul: **1993**, s. 602-603
78. **Jungueria LC, Carneiro J, Kelley OR.** Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul: **2005**, 1. Baskı: s. 431-448
79. **Kaloğlu C, Gürsoy E.** Sıçanlarda Gonadların Gelişimi ve Testiküler Farklılaşma. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*, **1997**, 18: s. 243-251
80. **Karaboga İ.** Siklosporin Uygulanarak Karaciğer Hasarı Oluşturulan Ratlarda Erdosteinin Koruyucu Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Hatay: **2011**

81. **Kayaalp O.** Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Kitabevi, **2002**, 10. Baskı: s. 420-422
82. **Kayali H, Şatıroğlu G, Taşyürekli M.** İnsan Embriyolojisi. Alfa Basım Yayın Ltd., İstanbul: **1992**, 7. Baskı: s. 300-320
83. **Kehrer JP.** Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. Critical Reviews in Toxicology, **1993**, 23(1): s. 21-48
84. **Kenneth B, Bruce N.** The Free Radical Theory of Aging Matures. Physiol Reviews, **1998**, 78(2): s. 547-581
85. **Kılınç K, Kılınç A.** Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, **2002**, 332: s. 110-118
86. **Koc A, Narci A, Duru M, Gergerlioglu HS, Akaydin Y.** The Proctective Role of Erdosteine on Testicular Tissue After Testicular Torsion and Detorsion. Molecular and Celular Biochemistry, **2005**, 280: s. 193-199
87. **Krinke GU.** The Laboratory Rat. Academic Press, Switzerland: **2000**, 1. Baskı: 311-. Annual Review Plant Physiol Plant Mol. Biol, **1997**, 48: s. 251-275
88. **Kurus M, Esrefoglu M, Karabulut AB, Sogutlu B, Kaya M ve ark.** Oral L-Arginine Protects Against Cyclosporine-Induced Hepatotoxicity in Rats. Experimental and Toxicologic Pathology, **2008**, 60: s. 411-419
89. **Kurus M, Esrefoglu M, Sogutlu G, Atasever A.** Melatonin Prevents Cyclosporine-induced Hepatotoxicity in Rats. Med Princ Pract **2009**, 18: s. 407-410
90. **Kuvandık G, Duru M, Nacar A, Yonden Z, Helvaci R.** Effects of Erdosteine on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. Toxicol Pathol. **2008**, 36: s. 714-719
91. **Lamb C, Dixon RA.** The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. Annual Review Plant Physiol Plant Mol Biol, **1997**, 48: s. 251-275
92. **Laczkovics A, Havel M, Teufelsbauer H, Harvath R, Schreiner W ve ark.** Cyclosporin-A Induced Heart Failure After Orthotopic Heart Transplantation. Thorac Cardiovasc Surg, **1987**, 35: s. 83- 6
93. **Lee JY, Kim HS, Park CS, Kim MC.** Erdosteine in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study in Pigs. J Vet Med Sci, **2010**, 72(1): s. 127-130
94. **Leeson RC, Leeson ST, Paparo AA.** Textbook of Histology. WB Saunders Company, London: **1985**, s. 486-489
95. **Magee CC, Pascual M.** Update in Renal Transplantation. Arch. Intern Med., **2004**, 164: s. 1373-1388
96. **Margreiter R, Huber C, Spielberger M, Konig P.** Cyclosporine in the Treatment of Acute Cadaveric Kidney Graft Rejection Refractory to High-Dose Methylprednisolone. Transplantation, **1983**, 36: s. 203-204.
97. **Markiund SL.** Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissue nad Human Cell Lines. Journal Clin, Inveot, **1984**, Vol.74: s. 1398-1403
98. **Matsuoka Y, Kitamura Y, Takahashi H, Tooyama I, Kimura H ve ark.** Interferon-Gamma Plus Lipopolysaccharide Induction Of Delayed Neuronal Apoptosis In Rat Hippocampus, **1999**, Neurochem Int, 34: s. 91-99
99. **McCay PB, Reinke LA, Rau JM.** Hydroxyl Radicals are Generated by Hepatic Microsomes During NADPH Oxidation: Relationship to Ethanol Metabolism. Free Radic Res. Commun, **1992**, 15(6): s. 335-346
100. **McCord JM, Fridovich I.** Three Biology and Pathology of Oxygen Radicals. Annuals of Internal Med., **1978**, 89: s. 122-128
101. **McCord JM.** Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. N. Engl J. Med., **1985**, 312(3): s. 159-163
102. **Meng Z, Liu Y.** Cell Morphological Ultrastructural Changes in Various Organs from Mice Exposed by Inhalation to sülfür Dioxide. Inhal Toxicol, **2007**, 19(6-7): s. 543-551
103. **Michiels C, Raes M, Toddsaint O, Remacle J.** Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, Cu-Zn Superoxide Dismutase for Cell Survival Against Oxidative Stress. Free Rod. Biol. Med., **1994**, 17: s. 235-248
104. **Miller LW.** Cardiovascular Toxicities of Immunosuppressive Agents. Am J Transpl, **2002**, 2: s.807-18.
105. **Moncada S, Palmer R, Higgs EA.** Biosynthesis of Nitric Oxide from L-Arginin: A Pathway for the Regulation of Cell Function and Communication. Biochem, Pharmacol, **1989**, 38,17: s. 9-15

106. **Murphy MP.** Nitric Oxide and Cell Death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, **1999**, 1411(2-3): s. 401-414
107. **Nacar A, Kıyıcı H, Ogus E, Zagyapan R, Demirhan B ve ark.** Ultrastructural Examination of Glomerular and Tubular Changes in Renal Allografts with Cyclosporine Toxicity. *Renal Failure*, **2006**, 28: s. 543-547
108. **Nadiger HA, Mathew CA, Sadasivudu B.** Serum Malanodialdehyde (TBA Reactive Substance) Levels in Cigarette Smokers. *Atherosclerosis*, **1987**, 64.1: s. 71-73
109. **Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M.** Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. *Clin Journal Am Soc. Nephrol*, **2009**, 4: s. 481–508
110. **Neoral ® and Sandimmune ® (cyclosporine, USP).** Product Information Web Page. Available from: URL: <http://www.novartis-ransplant.com/medpro/product-info/neoral.html>, **2007**.
111. **Nozu K, Dufau ML, Catt KJ.** Estradiol Receptor- Mediated Regulation of Stereoid- Geneois in Gonadotropin- Desensitized Leydig Cells. *J. Biol Chem*, **1981**, 256(4): s. 1915-1922
112. **Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarci M, Meydan S ve ark.** Beneficial Effect of Erdosteine on Methotrexate-Induced Testicular Toxicity in Mice. *Toxicol Ind Health*, **2010**, Aug 26(7): s. 433-8
113. **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 1967; 70:158-169.
114. **Palmer T.** Understanding Enzymes. **1990**
115. **Penn I, Branson ME.** Cancers After Cyclosporine Therapy. *Transpl. Proc.*, **1980**, 20: s. 885-892
116. **Pitkänen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblam HK, Sariola H ve ark.** Free Radical Activity During Development of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the Rat. *Life Sciences*, **1992**, 50(5): s. 335-339
117. **Pryme IF.** Compartmentation of the Rough Endoplasmic Retikulum. *Mol Cell Biochem*, **1986**, 71(1): s. 3-18
118. **Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Samuni A.** A novel Antiulserogenic Stable Radical Prevents Gastric Mucosal Lesions in Rats. *Gut*, **1994**, 35: s. 1181-1188
119. **Rajfer J, Sikka SC, Lemni C, Koyle MA.** Cyclosporine Inhibits Testesteron Biosynthesis in the Rat Testis *Endocrinology*. **1987**, s. 121, 586
120. **Reddy JK, Rao MS.** Oxidative DNA Damage Caused by Persistent Peroxisome Proliferation: Its Role in Hepato Carcinogenesis. *Mutat Res*, **1989**, 214(1): s. 63-68
121. **Reily PM, Schiller IJ, Bulkley GB.** Pharmacologic Approach to Tissue Injury Mediated by Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites. *Am J. Surg*, **1991**, 161: s. 488-503
122. **Rezzani R, Rodella L, Bianchi R.** Melatonin Antagonizes the Cyclosporine A Immunosuppressive Effect in Rat Thymuses. *Int. Immuno Pharma*, **2001**, 8: s. 1615-1619
123. **Rezzani R, Rodella R, Dessy C, Daneau G, Bianchi R ve ark.** Changes in Hsp90 Expression Determine the Effects of Cyclosporine A on the NO Pathway in Rat Myocardium. *FEBS Lett*, **2003**, 552: s. 125–9
124. **Rezzani R.** Cyclosporine A and Adverse Effects on Organs: Histochemical Studies. *Prog Histochem Cytochem*, **2004**, 39: s. 85–128
125. **Rezzani R.** Exploring cyclosporine A Side Effect and the Protective Role Played by Antioxidans: the Morphological and Immunohistochemical Studies. *Histo Hispathol*, **2006**, 21: s. 301-316
126. **Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR.** Techniques in Free Radicals Research. Elsevier, Amsterdam: **1991**, Vol 22
127. **Ross MH, Pawlina W.** Histology A Text and Atlas. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Philadelphia: **2006**, 5. Baskı: s. 728-748
128. **Ross MH, Romrell LJ.** Histology A Text and Atlas. William and Wilkins, **1989**, 2. Baskı: s. 603-646
129. **Sadler TW.** Ürogenital Sistem. Bayraklar AC. Longman’s Medika Embriyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara: **2005**, 9. Baskı: s. 313-354
130. **Sahin M, Cam H, Olgar S, Tunc SE, Arslan C.** Protective Role of Erdosteine on Vancomycin-Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2006**, 291: s. 155–160
131. **Salem NA, Salem EA, Maarouf AM, Kamel M, Elgalaly H.** Proctetive Effect of Trapidil and L-Arginine Against Renal and Hepatic Toxicity Induced by Cyclosporine in Rats. *Renal Failure*, **2010**, 32: s. 959-968
132. **Schacter M.** Cyclosporine A and Hypertension. Editorial Review, **1988**, 6: s. 511-516
133. **Seethalaxmi L, Menon M, Malhotra RK, Diamond DA.** Effect of Cyclosporine A on Male Reproduction in Rats *J. Urology*. **1987**, s. 183, 991

134. **Seethalaksmi L, Folers C, Khauli RB, Diamond DA, Menon M.** Evaluation of the Effect of Experimental Cyclosporine Toxicity on Male Reproduction and Renal Function. Reversal by Concomitant Human Chorionic Gonadotropin Administration. *Transplantation*, **1990**, 49: s. 17-19
135. **Selcoki Y, Uz E, Bayrak R, Sahin S, Kaya A ve ark .** The Protective Effect of Erdosteine Against Cyclosporine A-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Toxicology*, **2007**, 239(1-2): s. 53-59
136. **Sibley RK, Rynasiewicz J, Ferguson RM.** Morphology of Cyclosporine Nephrotoxicity and Acute Rejection in Patients Immunosuppressed with Cyclosporine and Prednisone. *Surgery*, **1983**, 94: s. 225-234
137. **Sikka SC, Coy DC, Lemni CA, Rajfer J.** Effect of Cyclosporine on Steroidogenesis in Rat Leydig Cells. *Transplantation*, **1988**, 46(6): s. 886-890
138. **Sorg, O.** Oxidative Stress: A Theoretical Model or A Biological Reality? *Comptes Rendus Biologies*, **2004**, 327(7): s. 649-662
139. **Steinman HM.** Superoxide Dismutases: Protein Chemistry and Structure-Function Relationships. *Superoxide Dismutase*, **1982**, 1: s. 11-68
140. **Stoyanovsky DA, Cederbaum AI.** Thiol Oxidation and Cytochrome P450-Dependent Metabolism of CC14 Triggers Ca²⁺ Release From Liver Microsomes. *Biochemistry*, **1996**, 35(49): s. 15839-15845
141. **Strestikova P, Otava B, Filipec M.** Different Mechanisms in Inhibition of Rat Macrophage Nitric Oxide Synthase Expression by FK 506 and CsA *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **2001**, 23 (1): s. 67-74, 600-608
142. **Tanyolaç A.** Özel Histoloji. Yorum Basım Yayın, Ankara: **1999**, 3. Baskı: s. 132-143
143. **Teerds KU, Boer- Brouwer M, Dorrington HJ, Balvers M, Ivell R.** Identification of Markers for Precursor and Leydig Cell Differentiation in the Adult Rat Testes Following Ethane Dimethyl Sulphonate Administration, *Biol. Reprod*, **1999**, 60(6): s. 1437-45
144. **Textor SC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wilson DJ, Schwartz LL ve ark.** Cyclosporine-Induced Hypertension after Transplantation. *Mayo Clin Proc*, **1994**, 69: s. 1181-93
145. **Titti G, Lizzio A, Termini C, Negri P, Fazio S ve ark.** A Controlled Multicenter Pediatric Study in the Treatment of Acute Respiratory Tract Diseases with the Aid of a New Specific Compound, Erdosteine. *Int. Journal of Clin Pharmacol Ther.*, **2000**, Aug;38(8): s. 402-7.
146. **Tredger JM, Brown NW, Dhawan A.** Calcineurin Inhibitor Sparing in Pediatric Solid Organ Transplantation: Managing the Efficacy/Toxicity Conundrum *Drugs*, **2008**, 68(10): s. 1385-1414
147. **Tudhape GR.** Red Cell Catalase in Health and in Disease with Reference to the Enzyme Activity in Anaemia. *Clin Science*, **1967**, 33: s. 165-182
148. **Turk G, Sonmez M, Ceribasi AO, Yuce A, Atessahin A.** Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. *International Immunopharmacology*, **2010**, Volume 10, Issue 2: s. 177-182
149. **Turrens JF.** Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Bioscience Reports*, **1997**, 17(1): s. 3-8
150. **Ulutas KT.** Orak Hücre Anemili Hastalarda Ferrutin-A, Enflamatuvar Marker ve Oksidatif Stres İlişkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay: **2013**
151. **Vagliasindi M, Fregnan GB.** Erdosteine Protection Against Cigarette Smoking-Induced Functional Antiprotease Deficiency in Human Bronchiolo-Alveolar Structures. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*, **1989**, 27.5: s. 238.
152. **Vagliasindi M.** Clinical Expert Report, **1996**
153. **Van Der Vliet A, Eiserich IP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B.** Nitrotyrosine as Biomarker for Reactive Nitrogen Species. *Methods in Enzymology*, **1996**, 269: s. 175-184
154. **Wang C, Salahudeen AK.** Lipid Peroxidation Accompanies Cyclosporine Nephrotoxicity: Effects of Vitamin E. *Kidney Int*, **1995**, 47: s. 927-34
155. **Williams PL, Warwich R, Dyson M, Bannister LH.** *Gray's Anatomy*. Churchill Livingstone, New York: **1989**, 37. Baskı: s. 1424
156. **Winyard P, Lunec J, Brailsford S, Blake D.** Action of Free Radical Generating Systems upon the Biological and Immunological Properties of Caeruloplasmin *Int. J. Biochem*, **1984**, 46: s. 1273-1278
157. **Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, Prieto P, Houy S ve ark.** Cyclosporin A-Induced Oxidative Stress in Rat Hepatocytes. *J Pharm Exp Ther*, **1997**, 280: s. 1328- 34
158. **Yagi K.** Lipid Peroxidase and Human Diseases. *Chem and Phy of Lipids*, **1980**, 45: s. 337-351
159. **Yagmurca M, Bas O, Mollaoglu H, Sahin O, Nacar A.** Protective Effects of Erdosteine on Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Arch. Med. Res.*, **2007**, 38: s. 380-5

160. **Yanbeyi S.** Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Kataloz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun: **1999**, s. 885
161. **Zhong Z, Li X, Yamashina S.** Cyclosporine A Causes A Hypermetabolic State and Hypoxia in the Liver: Prevention by Dietary Glycine. J. Pharmacol. Exp. Ther, **2001**, 299: s. 858–865
162. <http://www.embryology.ch/anglals/ugenital/diffmorfho04.html>
163. <http://www.keele.ac.uk/depts/ms/resources/anatomy/histologyimages/t232.html>
164. <http://www.microanatomy.net>
165. <http://www.wikipedia.org>

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Akyazı/ Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2007 yılında İstanbul Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. 2008 yılında Türk Silahlı Kuvvetleri saflarına subay olarak katıldı. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.

