

ZEHRİ, ATIL	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2019
--------------------	---	---------------------	------------------------



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**METOTREKSAT İLE SIÇAN TESTİSLERİNDE
OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNE SİLİMARİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zehra ATLI

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. Meral ERDİNÇ

DİYARBAKIR-2019



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**METOTREKSAT İLE SIĞAN TESTİSLERİNDE
OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNE SİLİMARİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zehra ATLI

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. Meral ERDİNÇ

DİYARBAKIR-2019



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Zehra ATLI'nın hazırladığı "Metotreksat ile sıçan testislerinde oluşturulan hasar üzerine silimarinin koruyucu etkilerinin araştırılması" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 26/06/2019

Danışman Prof. Dr. Meral ERDİNÇ _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı Prof. Dr. Meral ERDİNÇ _____

Üye Prof. Dr. Nuriye METE _____

Üye Prof. Dr. Engin ŞAHNA _____

Üye Prof. Dr. M. Ensari GÜNELİ _____

Üye Doç.Dr. İlker KELLE _____

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../20.. tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

26/06/2019

Zehra ATLI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesi, çalışılması ve sonuçlandırılması sürecinde bilgi ve birikimleri ile bana her daim yol gösteren, ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresi boyunca akademik tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim hocalarım, Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. İlker KELLE, Doç. Dr. Hasan AKKOÇ ve Dr. Emre UYAR'a,

Öğrencilik yıllarımdan itibaren bizlere emek veren ve bilgilerine devamlı başvurduğumuz çok değerli hocalarım Prof. Dr. Nurettin AYDİLEK, Doç. Dr. Rahşan YILMAZ ve Prof. Dr. Faruk BOZKAYA'ya,

Analiz yöntemlerinin gerçekleştirilmesi için laboratuvarlarını açarak çalışmamıza emeği geçen Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD öğretim üyelerine ve Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Mustafa HİTİT'e, Şanlıurfa Eyyübiye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Uzmanı Dr. Ahmet Kaymaz'a,

Deney hayvanlarıyla ilgili çalışmalardaki yardımlarıyla yanımda olan arkadaşımız Araş. Gör. İlyas ALAK'a,

Üzerimden maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme özellikle de ablam Emine'ye ve yeğenlerime,

Tezimi en yoğun çalıştığım dönemde bana en büyük desteği sağlayan eşim M. Osman ve biricik kızlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ONAY	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.ÖZET	1
1.1. TÜRKÇE ÖZET.....	1
1.2. ABSTRACT	3
2.GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
3.GENEL BİLGİLER	7
3.1. TESTİS ANATOMİSİ	7
3.2.TESTİS HİSTOLOJİSİ	11
3.2.1.İNTERSTİSYEL DOKU (ARA DOKU)	11
3.2.1.1.LEYDİĞ HÜCRELERİ.....	11
3.2.1.2.MAKROFAJLAR, LENFOSİTLER VE SİNİR LİFLERİ.....	11
3.2.2. SEMİNİFER TÜBÜLLER	12
3.2.2.1. SERTOLİ HÜCRELERİ.	12
3.2.2.2. SPERMATOGENETİK HÜCRELER	13
3.2.3. ERKEK ÜREME HÜCRELERİNİN KLONAL YAPISI	14
3.2.3.1.GOLGİ FAZİ.....	14
3.2.3.2.BAŞLIK (CAP) FAZİ	15
3.2.3.3.AKROZOM FAZİ.	15

3.2.3.4.OLGUNLAŞMA FAZI.....	15
3.2.4.SPERMATOZOON	15
3.3. TESTİSLERİN FONKSİYONLARI	16
3.3.1.TESTİSLERİN ENDOKRİN FONKSİYONLARI.....	16
3.3.1.1. TESTOSTERON.....	16
3.3.1.1.1.TESTOSTERİNİN FONKSİYONLARI.....	17
3.4.METOTREKSAT	18
3.4.1 TARİHÇESİ.....	18
3.4.2.FARMAKOKİNETİK	19
3.4.3.FARMAKODİNAMİK.....	19
3.4.4.ETKİ MEKANİZMASI	20
3.4.5.TOKSİK ETKİLER	21
3.5. SİLİMARİN.....	26
3.5.1. KİMYASAL YAPISI.....	26
3.5.2. SİLİMARİN FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ	28
3.5.3. TOKSİK ETKİSİ	28
3.5.4. ETKİ MEKANİZMASI	28
3.5.4.1. SİLİMARİN DİĞER ETKİLERİ.....	28
3.5.5. METOTREKSAT HASARINA KARŞI SİLİMARİN KULLANILMIŞ ÇALIŞMALAR.....	30
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
4.1. GEREÇ	31
4.1.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....	31
4.1.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	32
4.1.3.KULLANILAN DENEY HAYVANLARI.....	32
4.2.YÖNTEM.....	32
4.2.1.DENEYSEL FARMAKOLOJİK İNCELEMELER	32

4.2.2.TESTİS AĞIRLIKLARININ ÖLÇÜMÜ VE TESTİS AĞIRLIK İNDEKSİNİN (TAI) HESAPLANMASI	34
4.2.3.BİYOKİMYASAL İNCELEMELER	34
4.2.3.1.SERUM ALANİN AMİNOTRANSFERAZ (ALT), SERUM ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ (AST) VE TESTOSTERON SEVİYESİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	34
4.2.3.2.TESTİS DOKUSUNDAN OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	35
4.2.3.2.1.TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYESİ (TAS), TOTAL OKSİDAN SEVİYESİ (TOS) VE OKSİDATİF STRES İNDEKSİ (OSI)’NİN BELİRLENMESİ	35
4.2.3.2.2.MALONDİALDEHİT (MDA), KATALAZ (CAT) VE SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ÖLÇÜMÜ	35
4.2.4.MOLEKÜLER İNCELEMELER.....	36
4.2.4.1.TESTİS DOKUSUNDA ANTİOKSİDAN, ANTİ/PROAPOPTOTİK VE STEROİDOGENEZİS İLE İLGİLİ GEN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ37	
4.2.4.1.1.RNA İZOLASYONU	36
4.2.4.1.2.cDNA SENTEZİ	36
4.2.4.1.3.REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL TİME PZR)	37
4.2.4.2.TESTİS DOKUSUNDAN PRO-CASPASE-3 PROTEİN MİKTARININ WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ	38
4.2.4.2.1.PROTEİN İZOLASYONU	38
4.2.4.2.2.SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE)	39
4.2.4.2.3.PROTEİN TRANSFERİ VE BLOTLAMA.....	39
4.2.4.2.4.PROTEİN İMMÜNOBLOTLAMA VE GÖRÜNTÜLEME	39
4.2.5.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMELER	40
4.2.5.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	41
4.2.5.2.İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME	41
4.2.5.2.1. PRO-CASPASE-3 PROTEİNİNİN DOKUDA GÖSTERİLMESİ.....	41
4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	43
5. BULGULAR	44
5.1. KLİNİK BULGULAR	44

5.2. CANLI AĞIRLIKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	44
5.3. TESTİS AĞIRLIK İNDEKSİ	46
5.4. SERUM BİYOKİMYA DEĞERLERİ	47
5.4.1. SERUM TESTOSTERON KONSANTRASYONU.....	47
5.4.2. SERUM ALANİN AMİNOTRANSFERAZ (ALT) AKTİVİTESİ.....	48
5.4.3. SERUM ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ (AST) AKTİVİTESİ.....	49
5.5. TESTİS DOKUSUNDAKİ TAS, TOS, OSI, MDA, CAT, SOD DEĞERLERİ	51
5.5.1. TESTİS DOKUSU TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYESİ (TAS)	51
5.5.2. TOTAL OKSİDAN SEVİYESİ (TOS).....	52
5.5.3. TESTİS DOKUSUNDA OKSİDATİF STRES İNDEKSİ (OSI: TOS / TAS).....	53
5.5.4. TESTİS DOKUSU MALONDİALDEHİT (MDA) SEVİYESİ	54
5.5.5. TESTİS DOKUSU SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) SEVİYESİ.....	55
5.5.6. TESTİS DOKUSU KATALAZ (CAT) SEVİYESİ.....	56
5.6. MOLEKÜLER ANALİZLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	57
5.6.1. STEROİDOGENESİZ, APOPTOZİS VE ANTİOKSİDANLAR İLE İLGİLİ GENLERİN mRNA DÜZEYİNDEKİ RT-PZR ANALİZLERİ	58
5.6.1.1. STAR GEN EKSPRESYONU.....	58
5.6.1.2. TESTİS DOKUSU ANDROJEN BAĞLAYICI PROTEİN (ABP) GEN EKSPRESYONU	59
5.6.1.3. KASPAZ İLE AKTİVE EDİLEN DNAZ (CAD) GEN EKSPRESYONU	60
5.6.1.4. TESTİS DOKUSUNDA BCL-2 İLİŞKİLİ X (BAX) GEN EKSPRESYONU	61
5.6.1.5. TESTİS DOKUSU BCL-2 GEN EKSPRESYONU	62
5.6.1.6. TESTİS DOKUSU BAX/BCL-2 GEN EKSPRESYONU	63
5.6.1.7. TESTİS DOKUSU ÇİNKO-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (ZN-SOD) GEN EKSPRESYONU	64
5.6.1.8. TESTİS DOKUSU MAGNEZYUM-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (MG-SOD) GEN EKSPRESYONU	65
5.6.1.9. TESTİS DOKUSU GLUTATYON PEROKSİDAZ 1 (GPX1) GEN EKSPRESYONU	66

5.6.1.10. TESTİS DOKUSU KATALAZ (CAT) GEN EKSPRESYONU	67
5.6.2. PRO-CASPASE-3 PROTEİN MİKTARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	69
5.7. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	71
5.7.1. TESTİS DOKUSUNUN HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ.....	71
5.7.2. PRO-CASPASE-3 PROTEİNİN TESTİS DOKUSUNDA YERİNİN GÖSTERİLMESİ.....	77
6.TARTIŞMA	78
7.SONUÇ VE ÖNERİ	93
8.KAYNAKLAR.....	94
9. ÖZGEÇMİŞ.....	104
10.EKLER.....	105
10.1. ETİK KURUL KARARI	105
10.2. ORJİNALLİK RAPORU.....	106

Resimler Dizini

	Sayfa
Resim 1. Kontrol grubuna ait testis kesiti	71
Resim 2. MTX (1.Gün) grubuna ait testis kesiti	72
Resim 3. MTX (1.Gün)+SLM grubuna ait testis kesiti	73
Resim 4. SLM grubuna ait testis kesiti	74
Resim 5. MTX (7.Gün) grubuna ait testis kesiti	75
Resim 6. MTX (7.Gün)+SLM grubuna ait testis kesiti	76
Resim 7. Negatif kontrol ve MTX (1.Gün)+SLM grubuna ait Pro-Caspase-3 proteininin İHK ile yerinin gösterilmesi	77

Tablolar Dizini

	Sayfa
Tablo 1. Sıçan Primerleri ve Referans (Hausekeeping) Gen Listesi.	35
Tablo 2. Deney başı ve sonunda grupların canlı ağırlıkları.	42
Tablo 3. Deneme gruplarına ait testis ağırlık indeksi değerleri.	43
Tablo 4. Serum ALT, AST aktiviteleri ve Testosteron Seviyesi.	47
Tablo 5. Testis dokusunda bazı oksidan ve antioksidan parametreleri.	54
Tablo 6. Apoptozis, Steroidogenezis, ve Antioksidan ile ilgili genlerin mRNA düzeyindeki RT-PZR analiz sonuçları	65

Şekiller Dizini

	Sayfa
Şekil 1. Testis dokusunun anatomik görünümü.	6
Şekil 2. Silimarinin genel özellikleri.	30
Şekil 3. Deney protokolü.	35
Şekil 4. Deney başı ve deney sonu sıçanların canlı ağırlık değişimi.	42
Şekil 5. Testis ağırlık indeksi değerleri.	43
Şekil 6. Serum testosteron değerleri.	44
Şekil 7. Serum ALT değerleri.	45
Şekil 8. Serum AST değerleri.	46
Şekil 9. Testis dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS).	48
Şekil 10. Testis dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS).	49
Şekil 11. Testis dokusu Oksidatif Stres İndeksi (OSI)..	50
Şekil 12. Testis dokusu Malondialdehit (MDA) değerleri.	51
Şekil 13. Testis dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) değerleri.	52
Şekil 14. Testis dokusu Katalaz (CAT) değerleri.	53
Şekil 15. Testis dokusu Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) mRNA ekspresyonu.	55
Şekil 16. Testis dokusu Androjen bağlayıcı proteinin (ABP) mRNA ekspresyonu.	56
Şekil 17. Testis dokusu Caspase-activated DNase (CAD) mRNA ekspresyonu.	57
Şekil 18. Testis dokusu Bcl-2 ilişkili X'in (BAX) mRNA ekspresyonu.	58
Şekil 19. Testis dokusu Bcl-2 mRNA ekspresyonu.	59
Şekil 20. Testis dokusu Bax/Bcl-2 gen ekspresyonu.	60
Şekil 21. Testis dokusu Çinko-süperoksit dismutaz (Zn_SOD) mRNA ekspresyonu.	61
Şekil 22. Testis dokusu Magnezyumsüperoksit dismutaz (MgSOD) mRNA ekspresyonu.	62
Şekil 23. Testis dokusu Glutasyon peroksidaz 1 (GPx1) mRNA ekspresyonu.	63
Şekil 24. Testis dokusu Katalaz (CAT)mRNA ekspresyonu.	64

Şekil25. Testis doku gruplar Pro-Caspase-3 protein değişim miktarı	67
Şekil 26. Kontrol göre 7 günlük MTX veya MTX+SLM etkileri	91



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-Amino PGA	4-Amino-Pteroilglutamik Asittir
7-OH MTX	7-Hidroksi Metotreksat
ABP	Androgen-Binding Protein
ALT	Serum Alanin Aminotransferaz
AST	Serum Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
B-act	Beta –Actin
BAX	BCL2 Associated X
BCL2	B-cell lymphoma 2
BSA	Sığır serum albümin
CAD	Caspase ile aktive edilen DNase
CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	Eşik Döngüsü Cycle Threshold
DAB	Diaminobenzidine
DEPC	Dietilpirokarbonat
Dhf	Dihidrofolat
Dhfr	Dihidrofolat Redüktaz
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ETOH	Etanol
FPGS	Folylpolyglutamate Sentaz
FSH	Folikül Salgılatıcı Hormon
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Ggh	Γ-Glutamil Hidrolaz
GİS	Gastrointestinal Sistem
Glo1	Glioksalaz I
GPx-1	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
ip	İntraperitoneal
LD50	Letal doz
LH	Lüteinleştirici Hormon
MDA	Malondialdehit
Mg-SOD	Magnesium-Superoxide Dismutase
mRNA	MesajcıRNA
MTX	Metotreksat
MTX-Glu	Metotreksat Poliglütamatları
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
one-way ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
Real Time PZR	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RGBT	Roche Blocking Reagent
RNA	RiboNükleik asit
ROS	Serbest Oksijen Radikalleri
SAM	S-Adenosil Metioninin
SD	Standart Sapma
SLM	Silymarin
SOD	Süperoksit Dismutaz
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein

TAİ	Testis Ağırlık İndeksi
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TBSTw	Tris-Buffered Saline Tween
Thf	Tetrahidrofolat
TOS	Total Oksidan Seviyesi
Ts	Timidilat Sentaz
Zn_SOD	Zinc-Superoxide Dismutase



1. ÖZET

1.1. TÜRKÇE ÖZET

Metotreksat ile sıçan testislerinde oluşturulan hasar üzerine silimarinin koruyucu etkilerinin araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı :Zehra Atlı

Danışmanı :Prof. Dr. Meral Erdinç

Anabilim Dalı :Tıbbi Farmakoloji

Amaç: Çalışmamızda, kısa süreli MTX (1 ve 7 günlük) ile oluşturulan testis hasarına karşı SLM'nin koruyucu etkilerinin histolojik, enzim aktivitesi, hormon, protein ve moleküler olarak gen ekspresyonu düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:Kırk 48 erkek sıçan GrupI (kontrol, n=7), grupII (ilk-gün-MTX,n=8), grupIII (ilk-gün-MTX+7gün-SLM,n=8), grupIV (7gün-SLM,n=7) grupV (altıncı-günde-MTX,n=8) ve grupVI (altıncı-günde-MTX+7gün-SLM, n=8) olarak altı gruba ayrıldı. Tedavi gruplarına SLM (100mg/kg) veya MTX (20mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Sıçanlar 8. günde sakrifiye edildi ve AST, ALT ve testosteron konsantrasyonları ölçüldü. Testiste MDA,CAT,SOD,TAS/TOS/OSI seviyeleri belirlendi.Apoptoz (BCL2, BAX, CAD) anti-oksidan enzimler (Zn-SOD, Mg-SOD, CAT, GPx1) ve steroidogenez yolu (ABP, StAR) içeren genlerin ekspresyonu realtime-PCR ile ölçüldü. Pro-kaspaz-3'ün protein seviyesi de değerlendirildi.Veriler, tek-yönlü-ANOVA kullanılarak analiz edildi ve post-hoc Tukey testi uygulandı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular:GrupII ve III'te MTX'in yedi günlük etkisi hem vücutta hem de testis ağırlığında bir azalmaya neden oldu. Testosteron grupII ve III'te azalmış olsa da, AST ve ALT sadece grupII'de arttı. GrupII'de antioksidan parametreler azalırken, oksidasyon parametreleri arttı. SLM'in (grupIII) bu parametreler üzerinde iyileştirici etkileri oldu. StAR-mRNA ekspresyonu, grupII ve III'de azaldı. CAD ve BAX'in-mRNA ekspresyonu grupII ve III'de arttı. GPx1 ve BCL2'nin-mRNA ekspresyonu, MTX ve SLM birlikte kullanıldığı gruplarda (III,VI) arttı. Pro-Caspase-3 grupIII'de artarken, sadece MTX kullanımı grupII'de Pro-Caspase-3 'ü azalttı.

Sonuç: Çalışmamızda MTX'in bir günlük etkisi yedi günlük etkisiyle kıyaslandığında ciddi bir hasar oluşturmadığı bununla beraber MTX'in yedi günlük etkisinin sıçan testis dokusu üzerinde ciddi toksisiteye neden olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca, SLM'nin sıçanlarda MTX kaynaklı testiküler toksisite üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Metotreksat, Silimarin, Koruyucu Etkiler, Testis, Sıçan



1.2. ABSTRACT

Investigation of protective effects of silymarin on methotrexate-induced injury in rat testis

Student's Surname and Name: Atlı, Zehra

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Meral Erdinç

Department :Medical Pharmacology

Aim: The protective effects of silymarine (SLM) on the methotrexate(MTX)-induced testicular toxicity in rats was investigated by using enzyme activity, histopathological, and levels of hormone, protein and gene expression.

Material and Method:Forty-six-male rats were divided into six-groups as following; groupI(control,n=7); groupII(MTX-on-day1,n=8); groupIII(MTX-on-first-day+7days SLM,n=8); groupIV(7days SLM, n=7); groupV(MTX-on-day-7,n=8), and groupVI(7days SLM+MTX-on-day7,n=8). SLM (100mg/kg) or MTX (20mg/kg) was administered intraperitoneally. On-day-8, rats were sacrificed. Plasma AST, ALT and testosterone levels were measured. Levels of MDA, CAT, SOD, TAS/TOS/OSI was measured. Real-time-PCR was used to evaluate genes in apoptosis(BCL2, BAX, CAD), anti-oxidant enzymes (Zn-SOD, Mg-SOD, CAT, GPx1), and steroidogenesis (ABP,StAR). The protein level of pro-caspase-3 was also evaluated. Data were analyzed using one-way-ANOVA and post-hoc Tukey test was applied. $p<0.05$ were accepted as statistically significant.

Results: Seven-day effect of MTX caused a decrease in body and testicular weights in groupII and III. Although testosterone levels decreased in groupII and III, AST and ALT increased in groupII. While antioxidant parameters decreased, oxidation parameters increased in group II. SLM (groupIII) had improving effects on those parameters. StAR-expression was down-regulated in groupII, and III. CAD and BAX expressions increased in groupsII and III. BCL2 and GPx1 increased in those groups where MTX and SLM were used together (III,VI). While Pro-Caspase-3 increased in groupIII, MTX decreased Pro-Caspase-3 in groupII.

Conclusion: Compared to seven-day effect of MTX, one-day effect of MTX did not cause serious damage on rat testis. However, seven-day effect of MTX caused serious toxicity on rat testis. Moreover, SLM had protective effects on MTX-induced testicular toxicity in rats.

Key Words: Methotrexate, Silymarin, Protective Effects, Testes, Rat



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Birçok kanser türünde ve çeşitli rahatsızlıklarda (romatoid artrit, psoriasis gibi) yaygın olarak kullanılan metotreksat (MTX) antineoplastik ajanların antimetabolitler grubunda yer almaktadır. Metotreksat folik asit sentezinin ara basamağında rol alan dihidrofolatı (Dhf) tetrahidrofolata (Thf) çeviren dihidrofolat redüktaz (Dhfr) enzimini inhibe ederek nukleik asit sentezin prekürsörü olan purin ve primidin sentezlenmesini baskılar (1-4). Metotreksat'ın vücutta hızlı bölünebilme yeteneğine sahip sağlıklı doku ve organlarda toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (5). Metotreksat bu toksik etkiyi; nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) koenzimini inhibe etmesine bağlı olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH, serbest radikal hasarını engellemek için gerekli) miktarını azaltarak gösterir. Azalan NADPH miktarı glutation reduktaz mekanizmasını bozar ve buna bağlı olarak doku ve organlarda oksijen radikallerinin (ROS) miktarının artmasına neden olmaktadır (6).

Yüksek doz MTX uygulamasının (20mg/Kg, ip) testis dokusunda ROS'u arttırdığı ifade edilmiştir (7). Testiste MTX'e bağlı oluşan oksidatif hasarın seminifer tübüllerde organizasyon bozukluğu oluşturduğu, leydig hücrelerinin hücre membran permabilitesini bozarak ölümüne neden olduğu ve testosteron salınımını azalttığı kaydedilmiştir (8-11). Ayrıca sperma üzerinde MTX bağlı artan ROS'un DNA hasarı oluşturduğu, oligospermiaya (yada oligospermiye) ve dolayısı ile erkek infertilitesine neden olduğu bildirilmektedir (10-12). Testiste oksidatif hasarın, MTX parçalanmasından sorumlu multidrug resistance protein ((Mrp) 3 transporter) miktarının azalmasına bağlı olarak olduğu güncel bir çalışmada da vurgulanmıştır (13). Bununla birlikte MTX uygulamasının (20mg/Kg, ip) antioksidan CAT, SOD ve GPx azalttığı da ifade edilmektedir (7). Bu çalışmada testis toksisitesi bilinen MTX ile sıçan testislerinde hasar oluşturularak MTX'in bir ve yedi günlük etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır. Ayrıca bu çalışmada güçlü antioksidan ve antiapoptotik özelliklerinin yanısıra germ hücre ve spermatogenezis üzerine de olumlu etkileri olan SLM kullanılarak MTX ile oluşan testis hasarı üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Silymarin (SLM), deve dikenli bitkisinden (*Silybum marianum*) elde edilen bir polifenolik flavonoiddir. Silymarin güçlü antioksidan ve antiapoptotik özelliğe sahiptir (20, 21). Silymarin'in bu antioksidan özelliğini süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) aktivitelerini artırarak gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca SLM'nin antioksidan enzimlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu da uyardığı (SOD, GSH-Px, katalaz gibi) gösterilmiştir (22). Demir ile bağlanıp hücrelerdeki glutatyon redüksiyonunu arttırdığı da ifade edilmektedir (23). Benzer şekilde SLM'nin güçlü antiapoptotik etkisini hücre içerisinde p53-bağımlı yolak (Bcl-2/Bax, cytochrome C salınması, Apaf-1) ve caspase-3 üzerinden gösterdiği bildirilmiştir (24). Sıçanlarda SLM uygulamasının MTX, dokсорubisin, parasetamol ve cisplatin ile oluşturulan karaciğer böbrek, ve testis hasarına karşı koruyucu etki (cytochrome P450 3A2 ve GPX gen ekspresyon artırarak, GSH, SOD, GSH-Px, CAT artırarak ve MDA azaltarak) gösterdiği belirtilmiştir (25-29). Antioksidan özelliğine sahip bitkisel kaynaklı maddeler kullanılarak MTX'nin testis dokusu ve germ hücrelerinde oluşturduğu hasarı azaltmak amaçlı çeşitli çalışmalar yapılmıştır (14-19). Fakat sıçanlarda MTX ile oluşturulan bir günlük ve yedi günlük testis hasarı üzerine SLM'nin etkilerine yönelik yapılan bir çalışma bulunmadığı literatür taramasından görülmektedir.

Bu çalışmada MTX'in bir günlük (gen düzeyinde) ve yedi günlük etkisinin (metabolitlerin; poliglütamatlar) dokuda oluşturduğu hasarın histolojik, enzim aktivitesi, hormon, protein ve gen ekspresyonu düzeyinde nasıl değiştiğini ve SLM'nin bu hasarı azaltmadaki rolünün anlaşılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda 1 ve 7 günlük MTX ve/veya SLM uygulaması sonrasında testis dokusunda histopatolojik değişimler, serum testosteron, AST ve ALT seviyeleri, testis dokusunda spesifik oksidan/antioksidan (TAS, TOS, ve OSI, MDA, CAT, SOD) düzeyleri, western blot yöntemi ile antiapoptotik markerın (pro-Caspase3) miktarı ve immunohistokimya yöntemi ile testis spesifik hücrelerde (sertoli, leydig, germ hücreleri gibi) pro-Caspase-3'ün ekspresyon yerinin gösterilmesinin yanısıra real-time PZR ile antioksidan, pro/antiapoptotik ve steroidogenezisde rol oynayan genlerin ekspresyonunun belirlenmesiyle MTX ve SLM'in etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır.

3.GENEL BİLGİLER

3.1. TESTİS ANATOMİSİ

Testisler vücutta skrotum adı verilen kaslı bir kese içinde bulunur. Skrotum derisi seyrek tüylü, yağ bezleri, ter bezleri, duyuşal sinirler ve pigmentasyon yönünden zengindir. Skrotum sadece testisleri değil spermatik kordon, kan ve lenf damarları ve testiküler sinir liflerini de sarar. Skrotum içerisinde spermanın taşınmasından sorumlu spermatik kordon vardır bu yapı pubisin ön yüzünde inguinal kanalın içinden devam ederek testisin arkasından ve üstünden geçerek testise bağlanır. Anatomik olarak bakıldığında skrotum içerisinde sol testis genellikle sağ testisin altında asılı kalır. Skrotumun anatomik olarak katları incelendiğinde subkutan katını musculus dartos (dartos kası) oluşturur. Bu kas içeriye doğru ilerleyerek her bir testisi birbirinden ayıran skrotal septumun oluşumuna katılır böylelikle her bir testis birbirinden bağımsız olur. Skrotumun'un içinde yer alan diğer bir yapı da karın duvarından aşığı inen ve testisleri saran iki tane kremaster kasıdır. Dartos ve kremaster kasları aynı anda kasılarak testisleri soğuk havada vücuda yaklaştıırır (musculus kremaster) ve skrotumun yüzey alanını azaltarak (musculus dartos) spermatogenez için gerekli optimum sıcaklığın sağlanmasına yardımcı olur. Çevre ısısı yükseldiğinde ise ısı kaybını artırmak için skrotum gevşetilerek yüzey alanı artırılır (musculus dartos) ve testisler vücuttan uzaklaştırılır (m. kremaster). Skrotumun iç sıcaklığı vücut sıcaklığından 2-4°C daha azdır bu durum sağlıklı spermilerin üretimi için gereklidir. Skrotum içinde kalan diğer bir yapıda pampiniform pleksuslardır. Bu yapı spermatik kordonda testis arterini çevreleyen geniş venöz damar ağıdır. Zıt akım ısı değiştirici sistem oluşturarak optimum testis ısının sağlanmasına katkı sağlar. Skrotum kesesi, erkek fetüste, böbreklerin yanında gelişen testislerin doğumdan hemen önce skrotuma yerleşmesi ile işlevşel bir hal alır (30-32)

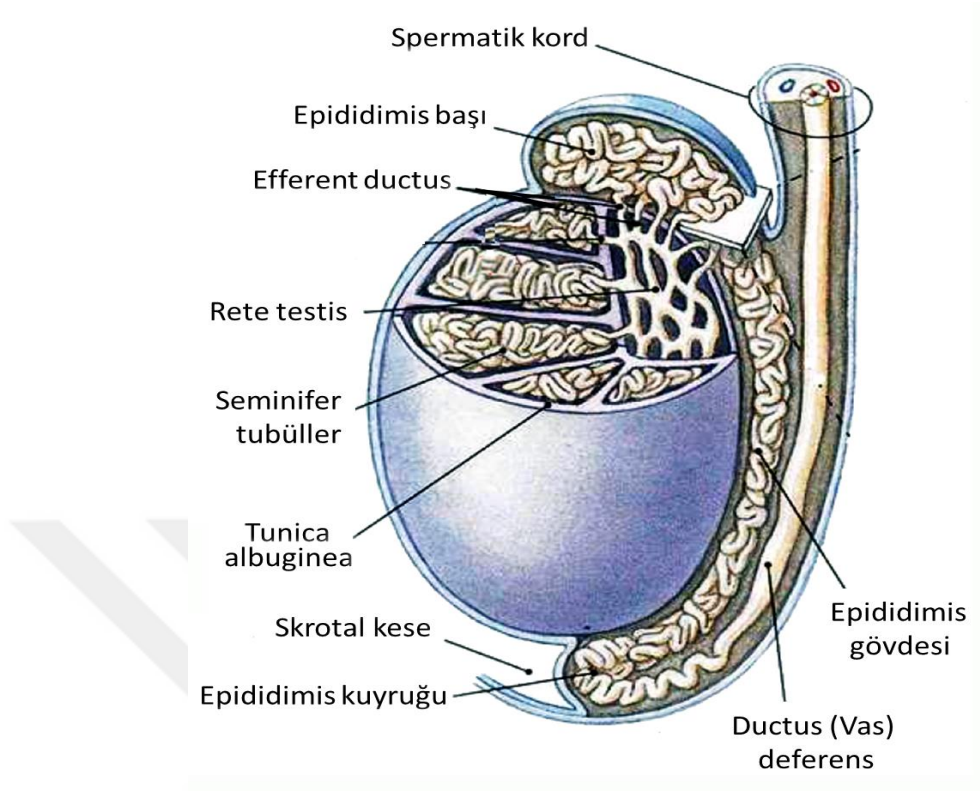
Testisler erkeğe ait üreme hücresi spermanın üretilip, olgunlaşması ve depolanmasından sorumlu organlardır. Hem ekzokrin (sperm) hem de endokrin (testesteron gibi) sekresyon yapan testisler pubertastan ölüme kadar aktif olarak kalır. Türlerle göre ağırlıkları değişiklik göstermesine rağmen, şeklen oval yapıda ve içte loblara bölünmüştür. Testisler sperm üreten yaklaşık olarak 900 sargılı seminifer tubullerden oluşmaktadır. Her testis dıştan içe doğru üç tabakayla kaplıdır.

1-Tunica vaginalis: pariyetal ve ince viseral tabakaya sahip seröz bir membrandır. Testislerin serbest hareketini sağlar. Tunica vaginalisin viseral yüzü tunica albugineya yapışıktır ve pariyetal tabakasıda skrotumun iç yüzünü kaplamaktadır.

2-Tunica albuginea: Yoğun fibröz bağ dokudan oluşan testisi saran bir kapsüldür.

3-Tunica vaskulosa: Adından da anlaşılacağı gibi kan damarlarından zengin, ağ dokusundan oluşur (30-33)

Her testis, böbrek arterinin hemen altındaki abdominal aortadan ayrılan bir testis arteri tarafından beslenir. Bu çok uzun, ince bir arterdir ve inguinal kanaldan skrotuma geçmeden önce posterior karın duvarına doğru eğim verir. Kan basıncı çok düşük ve kan akışı oldukça yavaştır. Kan, plexus pampiniformis vasıtasıyla testislerden ayrılır. Bu damarlar inguinal kanalına doğru ilerledikçe birleşirler ve testiküler toplardamarı oluştururlar. Testis sinirleri, T10 ve T11 omurilik segmentlerinden köken alırlar. Bunlar ağırlıklı olarak sempatik olmakla birlikte, bazı parasempatik lifler de içeren karışık duyu ve motor sinirlerdir. Duyusal lifler öncelikle ağrı ile ilgili iken otonomik lifler çoğunlukla vazomotor karakterde olduklarından kan akışının düzenlenmesinde görev alırlar(32)



Şekil1. Testis dokusunun anatomik görünümü (30)'den alınıp türkçeye çevrilerek eklenmiştir.

Testisin posterior yüzüne bakıldığında mediastinum köken alan septula adlı bağ doku testisin içine doğru yayıldığı ve tunica albugineaya çeşitli noktalardan bağlandığı görülür. Böylece testis bazaldan perifere doğru uzanan 200-300 adet piramidal loba ayrılmış olur (34)

Her bir lobül interlobüler bağ dokusu tarafından çevrelenmiş ve desteklenmiş, seminifer tübüller olarak bilinen genelde 4 tane tübülden oluşur. Her bir testiste yaklaşık 400 ila 900 seminifer tübül vardır. Her bir tüp, 30-70 cm uzunluğunda ve 150-300 µm çapındadır.

Seminifer tübülün duvarı üç katmandan oluşur;

- 1- Fibroelastikten bağ dokusundan oluşan dış kapsül veya tunika propria
- 2- İnce homojen bazal membran
- 3- Kompleks tabakalı epitel, iki tip hücreden oluşur:
 - Spermatojenik hücreler veya germ hücreleri
 - Sertoli hücreleri veya destekleyici hücreler (34).

Sperm üretildiği yer olan testisten ayrıldıktan sonra, üretraya ulaşmak için bir seri sperma taşıyıcı kanallardan geçer. Bunlar sırası ile Rete testis; seminifer tübüllerin içine açıldığı ince duvarlı tubüllerin oluşturduğu bir ağıdır (34). Rete testisten vas efferens olarak adlandırılan 8 ila 15 tübül ortaya çıkar. Vas efferensler birleşerek, epididimisin başını oluştururlar ve sonra kanalın şeklini oluşturmak üzere yaklaşır. Her bir testisin arka yüzünde yaklaşık 12 küçük efferent kanal bulunur ve epididimise sperm taşır. Spermilerin hareketini sağlayan silialı hücreler vardır. Epididimis spermin olgunlaşma aşamalarını geçirdiği ve depolandığı tubüler bir yapıdır. Testisin üst ucunda genişlemiş bir kafa, ortada uzun bir gövde ve alt ucunda ince bir kuyruktan oluşur. Kanal oldukça ince ve çok sargılıdır. Epididimis testis tarafından salgılanan sıvının yaklaşık % 90'ını reabsorbe eder (34).

Testisteki spermier fizyolojik olarak olgunlaşmamıştır testisten ayrıldıktan sonra epididimisin başı ve gövdesinde depolanırken olgunlaşırlar. Yirmi gün kadar bir süre sonra kuyrukları uzar. Depolanan sperm 40 ila 60 gün boyunca fertil kalır, ancak ejakulate olmayıp çok yaşlanırsa parçalanır ve epididimis tarafından absorbe edilir. Epididimis kanalı kuyrukta yukarı doğru dönerek duktus deferens (vas deferens) oluşturur. Spermatik kordon ve inguinal kanaldan geçerek pelvis boşluğuna girer. Orada, mediale döner ve idrar torbasına yaklaşır. Mesane ve üreter arasına girdikten sonra, kanal arkaya mesane doğru aşağıya döner ve terminal ampulla olarak genişler (şekil 1). (34)

3.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ

3.2.1. İnterstisyel doku (ara doku)

Testis içerisinde seminifer tubüller arasında yer alan dokudur. Bu doku içerisinde fibroblastlar, kan ve lenf damarları ve testosteron üretiminden sorumlu leydig hücreleri bulunur.

3.2.1.1. Leydig hücreleri

Leydig hücreleri en önemli erkek cinsel hormonu olan testosteronu üretir ve salgırlar. Gelişimsel, morfolojik ve işlevsel açıdan farklı hücreler ayırt edilebilir. Fötal leydig hücreleri, doğumda yeni doğan leyding hücreler haline gelir ve bundan sonra dejenere olur veya olgunlaşmamış leyding hücrelerine gerilerler. Fetal leydig hücreleri testosteron üretirler. Ayrıca olgunlaşmamış leydig hücrelerinin testosteron yerine androstan-3 α , 17 β -diol ürettiği de bildirilmiştir(35).

Yetişkin leydig hücreleri granülsüz endoplazmik retikulum ve mitokondri açısından zengindir. Diğer önemli sitoplazmik bileşenleri lipofuscin granülleri, endositoz ve lizozomal yıkımın son ürünü ve yağ damlacıkları olup testosteron sentezinin ön aşamalarının gerçekleştiği yerlerdir. Reinke'nin kristalleri olarak adlandırılan özel oluşumlar, çoğunlukla yetişkin leydig hücrelerinde bulunur. Yetişkin testisteki leyding hücrelerinin çoğalma oranı oldukça düşüktür ve lüteinleştirici hormon (LH)'den etkilenir (35).

Geç embriyonik dönemde plasentadan gonodotropinler leydig hücrelerinden kanal ve eklenti bezlerinin gelişmesi için testosteron sekresyonu yaparlar. Bu fetal intestinal hücreler 3. ve 4. aylarda aktif sonra regrese olurlar daha sonra sessizce pubertase kadar beklerler. Pubertastaki testosteron üretimi hipotalamustaki gonodotropinlerin (LH tarafından) uyarımıyla sentezlenir(30).

3.2.1.2. Makrofajlar, lenfositler ve sinir lifleri

İnterstisyel bölme leydig hücrelerinden başka makrofaj ve lenfosit gibibağışıklık sistemine ait hücreleri de içerir. Her 10-50 leydig hücre için bir makrofaj bulunmaktadır. Makrofajlar muhtemelen leydig hücrelerinin özellikle çoğalmaları, farklılaşmaları, steroid üretimi ve sitokinlerin salgılanması gibi fonksiyonlarını etkiler. Makrofajlar steroidogenez uyarıcılarını ve inhibitörlerini

salgılarla. Proinflatuar sitokinler, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit ve prostaglandinler Leydig hücre fonksiyonunu inhibe edebilir (35)

3.2.2. Seminifer Tübüller

Spermatogenesis olayı seminifer tübüller içinde gerçekleşir. Testis dokusunun yaklaşık %60'ı seminifer tübül dokusudur. Seminifer tübül içindeki germinal epitelyumda iki tip hücre vardır; Bunlar büyük, bölünmeyen, fiziksel ve metabolik destek sağlayan sertoli hücreleri ile germ veya diğer ismi ile spermatogenik hücrelerdir (34).

3.2.2.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri seminifer tubul hücreleri içinde iki katlı olarak spermatogenik hücrelerin beslenme ve bölünmesinde rol oynayan uzun kolumnar epitel hücrelerdir. Spermatogenik hattaki bütün hücrelerin dışa bakan yüzüyle sıkı ilişki içindedir ve bu hücrelerin metabolik ve fiziksel ihtiyaçlarını karşılar(34).

Sertoli hücrelerinin tabanı bazal membrana bağlanmıştır ve apikal uçları lumene uzanır. Sertoli hücreleri spermatogenik hücreler tarafından sarıldığından rutin histolojik incelemede lumene bakan kısmı belirsizdir. Her bir sertoli hücresi gelişim aşamasındaki 30-50 sperm hücresini destekler. Mikroskopik yapısı incelendiğinde granüllü endoplazmik retikulum, golgi cisimciği, birçok mitokondri ve ribozom içerir (34).

Çekirdekleri ovoid veya üçlü halka şeklinde, ökromatin yapıdadır. Bu nukleus yapısı sertoli hücrelerinin germ hücrelerine göre daha kolay tanınmasını sağlar. Bir önemli fonksiyonu da bazolateral membranla seminifer tubullere sıkıca bağlanarak kan testis bariyerini oluşturmaktır. Bu bariyer;

1. Seminifer tübüllerin korunması: Kan testis bariyeri, kandaki zehirli maddelerin seminifer tübüllere geçişini engelleyerek (proteinler, polisakaritler, sitotoksik maddeler ve galaktoz gibi orta büyüklükteki moleküller) spermatogenik hücreleri korur. Diğer taraftan spermatogenik hücreler için gerekli maddelerin (spermatogenik hücreler için başlıca besleyici maddeler, gerekli hormonlar ve su) geçişine izin verir.
2. Otoimmün rahatsızlıkların önlenmesi: Kan testis bariyeri ayrıca seminifer tübüllerden spermatolojik antijenik ürünlerin kana geçişini engelleyerek otoimmün

hastalıkların gelişimini önler. Kan testis bariyeri, özellikle travma ve viral (kabakulak vb) enfeksiyon nedeniyle zarar görür. Kan testis bariyerinin hasar görmesi sonucu spermatozoonlara ait antijenik yapılar kana geçerek immun sistemi aktive ederler. Böylece spermlere karşı sentezlenen otoantikorlar germ hücrelerini yok ederek steriliteye yol açar(34).

Sertoli hücrelerinin önemli fonksiyonları;

- 1- Gelişimin çeşitli aşamalarındaki sperm hücrelerin beslenmesi ve korunması
- 2- Spermatogenez sırasında oluşan sitoplazmik artıklarının fagositozu,
- 3-çeşitli Salgılanma:Seminifer tübüllere genital kanallar yönünde inen ve sperm nakli için kullanılan bir sıvı.

Testosteronun seminifer tübülde konsantre olmasına sağlayan ve spermatogenez için gerekli olan androjen bağlayıcı proteinin salgılanması. Cinsel steroidler, estrogenler ve testosteron. İnhibin ve aktin peptidlerinin ön hipofizdeki folikül salgılatıcı hormon (FSH) sentezini ve salımını bastırır ve etkinleştirirler(30, 33).

3.2.2.2. Spermatogenetik Hücreler

Spermatogonia adlı progenitor ve kök hücrelerin proliferasyonu pubertas ile birlikte başlar. Bunlar yaklaşık 12 µm büyüklüğünde oval hücrelerdir. Bu hücreler seminifer tübülün bazal duvarına en yakın yerleşirler ve sertoli hücreleriyle sıkı ilişkilidirler. Farklı aşamalardaki spermatogonialar şekli ve nukleusunun boyanmasına göre tanınabilir. Spermatogonialar daha koyu ve ovoid çekirdekli kök hücrelerdir, bölünüp daha solgun renkli çok hızlı bölünebilen progenitor hücrelere dönüşür (30).

Tip A spermatogonialar mitozla bölünüp çoğalarak tip B hücrelerine dönüşür. Tip B hücreleri daha yuvarlaktır ve nukleusu daha az boyanır. Daha sonra Tip B hücreler son mitotik bölünmeyle ikiye bölünür ve primer spermatosit oluşur. Sekonder spermatositleri testis kesitlerinde görmek zordur çünkü yaşam süreleri çok kısadır hemen ikinci mayoz bölünme fazına girerler. Her bir sekonder spermatositin bölünmesiyle her kromozomun kromatidleri ayrılır ve her biri 23 kromozom içeren iki haploid kromozomlu spermatid olarak adlandırılan hücreler üretilir. Birinci ve ikinci mayoz arasında DNA replikasyonu olmadığından oluşan hücreler haploiddir (30).

3.2.3. Erkek Üreme Hücrelerinin Klonal Yapısı

Spermatogoiaların mitotik bölünmesiyle oluşan kök hücreler mitozla bölünmeyen hücreler olarak kalır. Bir kısım hücrede ise sitoplazma bölünmesi tam gerçekleşmez hücreler arasında sitoplazmik bir bağlantı vardır. Bu bağlantı mayoz ve mitoz sırasında hücreler arası serbest sitoplazmik iletişimi sağlar. Spermatogenezin bitmesiyle bazı hücreler dejenere olur bazıları ise ölür. Bununla birlikte yüzlerce hücre mayoz sırasında birbirleriyle ilişkilidir. Spermatogenik hücreler arasındaki tamamen ayrılmama olayı tam anlaşılamamıştır. Fakat bu diploid genomdan üretilen sitoplazmik köprüler hücreler aracılığıyla birbirlerine madde geçişi sağlamaktadır. Sonunda hücreler tamamen ayrılır. Spermatogoninin son mitozuyla spermatid oluşumu arasındaki olaylar ve değişimler yaklaşık 2 aydır. Spermatogenik hücreler epitel içinde rastgele dağılmamışlardır. Gelişiminin farklı aşamasındaki hücre toplulukları bir bölgede beraber bulunur. Bu hücreler arası köprüler hücrelerin bölünüp farklılaşmasını koordine eder(30).

Sperm üretiminin son fazı ısıya duyarlı bir olay olup spermatidler erkek DNAsını ovuma aktaran spermatozoaya dönüşür. Bu aşamada hücre bölünmesi olmaz ve spermatogenesis sertoli hücreleri içinde gerçekleşir. Haploid kromozom sayısına sahip spermatidler (7-8µm çapında) oldukça küçüktür ve seminifer tubulin lumenine yakındırlar. Spermiyogenez akrozomun şekillenmesi, nukleusun uzaması ve yoğunlaşması, sitoplazmasının bir kısmını kaybetmesi ve kuyruk oluşumu aşamalarından oluşur. Bu sürecin sonunda olgun spermatazoa oluşur ve Sertoli hücrelerinden tubul lümenine doğru serbest bırakılırlar. Spermiyogenez 4 fazdan oluşur(30).

2.2.3.1.Golgi Fazı

Golgi fazında sitoplazmada çekirdeğe yakın bir bölgede bulunan golgi aygıtından köken alan tek membranlı küçük akrozom kesecikleri çekirdeğin etrafını sarar. Sentioller akrozomal başlığın bulunduğu yerden en uzak köşeye göç ederler ve yapısal ve fonksiyonel olarak silumlara benzeyen kuyruğun oluşumunu organize ederler (30).

3.2.3.2.Başlık (Cap) Fazı

Bu fazda akrozomal kap kondanse olmuş nukleusun yaklaşık yarısını sarar. Akrozom, spesifik olmuş lizozom içeren, hiyalüronidaz ve tripsin benzeri enzim ihtiva eden keseciklerdir. Bu enzimler oositle karşılaştığı zaman salınır ve oositle akrozom membranını birbirine bağlar ve Zona pellucidayı deler. Akrozom reaksiyonu fertilizasyonun ilk fazıdır(30).

3.2.3.3. Akrozom Fazı

Sperma başının geliştiği fazdır. Bu aşamada akrozom ve nukleus sertoli hücresine gömülüdür ama kuruk lumene doğru uzar. Nukleus uzar ve nukleozomlar protamin isimli bir peptidle kondanse olur. Mitokondriler proksimal ucun kalın ucunda ATP üretmek için yerleşirler (30).

2.2.3.4. Olgunlaşma Fazı

Spermiyogenezin bu fazında ise ihtiyaç olunmayan sitoplazma atılırve hücreler arası köprüler kopar. Lumen içerisindeki bu spermalar hareketli ya da fonksiyonel değildir (30).

2.2.4. Spermatozoon

Spermatozoonda iki kısım vardır: armut şeklinde başve uzun bir kuyruk. Başın uzunluğu yaklaşık 4 ila 5 μm , en geniş kısmı ise 3 μm 'dir. Başta çekirdek, akrozom ve kamçımsı bazal gövde olmak üzere üç yapı ayırt edilebilir.Bunlardan en önemlisi, kafanın çoğunu dolduran ve yoğunlaştırılmış, genetik olarak inaktif kromozomların bir haploid setini içeren çekirdektir.Akrozom, çekirdeğin apikal yarısını kaplayan ince bir başlık şeklindeki lizozomal oluşumdurve ovuma ulaşan spermatozoanın ovuma nüfuz etmesine yarayan enzimler içerir.Flagellumun bazal gövdesi çekirdeğin arka ucundaki girinti içine yerleşmiştir(30, 32).

Kuyrukbağlantı parçası, orta parça, ana parça ve son parça olarak adlandırılan dört bölüme ayrılmıştır.Bağlantı parçası yaklaşık 5 μm uzunluğunda sentriyol bulunduran dar bir kısımdır. Orta parça en kalın parçası olup, 5 ila 9 μm uzunluğunda ve başın yarısı kadar geniş bir silindir şeklindedir. Bu kısım flagellumdaki aksonem etrafında sıkıca sarılmış çok sayıda büyük mitokondri içerir.Sperm dişi üreme

sisteminde göç ederken kuyruk hareketleri için gereken adenoazin trifosfat (ATP) üretirler. Kuyruğun büyük bölümünü oluşturan 40 ila 45 µm uzunluğundaki ana parça destekleyici bir kılıf ile çevrelenmiş aksonemden oluşur. 4 ila 5 µm uzunluğundaki son parçası sadece aksonemdir ve spermilerin en dar kısmıdır (32).

3.3. TESTİSLERİN FONKSİYONLARI

3.3.1. Testislerin Endokrin Fonksiyonları

Testisler erkek cinsiyet hormonları yada androjenler olarak adlandırılan Testosteron, Dihidrotestosteron ve androstenedion hormonlarını üretir ve salgılarlar(34).

Testosteron diğerlerine göre büyük miktarlarda salgılanır. Bununla birlikte, dihidrotestosteron daha aktiftir. Ayrıca kadın seks hormonları olan östrojen ve progesteron da bulunur. Testislerde iki tane hormon aktivin ve inhibin salgılanmaktadır. Bununla birlikte, bu iki hormonun androjenik etkisi yoktur. Androjenler büyük miktarlarda testislerde az miktarda da adrenal korteks tarafından salgılanırlar. Testislerin interstisyel hücrelerini oluşturan Leydig hücreleri tarafından salgılanır (34).

Yenidoğan bebeklerde ve yetişkin erkeklerde Leydig hücreleri çok sayıdadır. Fakat çocukluk döneminde bu hücreler androjen üretimi açısından yetersizdir veya aktif değildir. Androjenlerin salgılanması pubertase ulaştıktan sonra gerçekleşir. Adrenal korteksin zona retikularisinden salgılanan androjenler testosteron, androstenedion ve dehidroepiandrosterondur. Adrenal androjenler küçük miktarlarda salındıkları için önemli bir fizyolojik etkisi yoktur. Anormal durumlarda adrenal androjenlerin hipersekresyonu cinsel bozukluklarla sonuçlanır(34).

3.3.1.1. Testosteron

Androjenler kolesterolden sentezlenen steroid hormonlardır. Testosteron bir C₁₉ steroiddir. Androjenler ayrıca doğrudan asetattan da sentezlenirler. Yetişkin bir erkekte plazma testosteron seviyesi 300 ila 700 ng / dL arasında değişir. Yetişkin bir kadında, testosteron seviyesi 30 ila 60 ng / dL'dir. Testosteronun üçte ikisi plazmada β-globulin yapısındaki gonadal steroid bağlayıcı globulin ile taşınır. Testosteronun geri kalan üçte biri albumin ile taşınır (34).

Birçok hedef dokuda testosteron en aktif androjen olan dehidrotestosterona dönüştürülür. Adipoz doku, hipotalamus ve karaciğer gibi bazı dokularda testosteron estradiole dönüştürülür. Testosteronun önemli bir kısmı karaciğerde indirgenerek aktif olmayan androsteron ve dehidroepiandrosteronun formlarına dönüştürülür. Bu iki madde daha sonra konjuge olur ve idrarla atılır (34).

Testosteron salgısı, fetal yaşamın 7. haftasında başlar. Fetal testisler fetal yaşamın 2. ila 4. aylarında testosteron salgılamaya başlar ve testislerden testosteron salgılanması plasenta tarafından da uyarılır (34).

3.3.1.1.1. Testosteronun Fonksiyonları

Genel olarak, testosteron erkeğe ait ayırt edici karakterlerinden sorumludur. Fetal yaşamda da: fetusta cinsiyet farklılaşması, eklenti cinsiyet organlarının gelişimi ve testislerin inişinde önemli bir rol oynar. Cinsiyet kromozomları fetüsün cinsiyetinin belirlenmesinden sorumlu iken, testosteron fetüsün cinsiyet farklılaşmasından sorumludur (34).

Fetus'un iki genital kanalı vardır: Müllerian kanal, vajina, uterus ve fallop tüpü gibi kadın aksesuar cinsiyet organların oluşumunu sağlar. Wolff kanalı, epididimis, vaz deferens ve seminal veziküller gibi erkek aksesuar cinsiyet organlarının oluşumunu sağlar. Testosteron fetusun genital sırtından intrauterin hayatının yaklaşık 7. haftasında salgılanırsa, müllerian kanal yok olur ve erkek cinsiyet organları Wolff kanalından gelişir (34).

Testosteronun yanı sıra sertoli hücreleri tarafından salınan Anti- müllerian hormon (AMH) müllerian kanalın gerilemesinden sorumludur. Testosteron, penis, skrotum ve diğer aksesuar seks organları, genital kanallar, seminal veziküller ve prostat gibi dış genital organların büyümesi için de gereklidir (34).

Testislerin inmesi; testislerin abdominal boşluktan skrotumun içine yerleşme sürecidir. Başlangıçta testisler karın boşluğunda gelişir ve doğumdan hemen önce kasık kanalından geçerek skrotuma doğru itilir. Testosteron testislerin inişi için gereklidir. Testosteron spermatogenez için de gereklidir ve sekonder cinsel karakterlerin gelişmesinden sorumludur. Erkeklerde sekonder cinsel karakterler: ergenlik sonrası kas yapısının gelişimi, kemik matrisini ve kalsiyum arttırarak kemik kalınlığının artması, omuzların genişlemesine ve pelvis üzerinde

spesifik bir etkiye sahip olması, cildin kalınlığını ve subkutan doku sağlığını artırması, vücutta erkek tipi saç dağılımına, sesin kalınlaşmasına neden olur (34).

3.4.METOTREKSAT

3.4.1 Tarihçesi

Metotreksat (MTX, 4-amino-N¹⁰-metil folik asit) ilk olarak 1940'larda folik asidin spesifik bir antagonisti olarak geliştirilmiştir(36-38). Folik asit B kompleks ailesine ait bir vitamindir. Moleküler olarak yapısı ve fonsiyonları anlaşıldıktan sonra, araştırmacılar tarafından folik asidin molekül yapısında küçük değişiklikler yapılarak elde edilen folik asit analoglarını tedavi amaçlı sentezlemeye başlamışlardır. Araştırılan ilk analog, sentetik reaksiyonda butiraldehit kullanılarak hazırlanan “ham x-metil folik asittir”.Bu molekülün 1946'da iki test organizması olan *Streptococcus faecalis* ve *Lactobacillus casei*'nin büyümesini engellediği bulunmuştur.Ayrıca, bu molekülün sıçanların büyümesini yavaşlattığı ve yine ortama katılan doğal folik asit ilavesinin büyümeyi tekrar devam ettirdiği bildirilmiştir. Bu yönü ile geliştiren analogun, folik asit analogu olmasına rağmen folik asidin hücresel fonksiyonlarını bozduğu fakat bu durumun doğal folik asit katkısı ile tersine dönderilebileceği gösterilmiştir. Fakat daha sonra X-metil folik asitin insanlar üzerinde hayvan modelleriyle aynı etkiye sahip olmadığına gözlemlenmesi üzerine ortama folik asit eklenmesiyle etkileri kolayca geri döndürülemez olan başka analoglar sentezlenmesi ihtiyacını çıkarmıştır.Bu yeni bileşiklerin ilki, 4-amino-pteroyilglutamik asittir (4-amino PGA) .Bu bileşik aminopterin olarak adlandırılmış ve ilk kez Dr. Sydney Farber tarafından lösemili çocuklarda kullanılmıştır.Fakat aminopterin önemli toksisitesinden dolayı araştırmacıları daha az toksik olan bir bileşik bulmaya yönlendirmiştir. Bu yeni bileşik, MTX olarak bilinen 4-amino-10-metil pteroyilglutamik asit, 1948'de bir kimya şirketi tarafından üretilmiştir(36).

MTX öncelikli olarak pürinlerin ve pirimidinlerin sentezini inhibe ederek malign hücrelerin çoğalmasını engellemektedir. Başlangıçta MTX bir ön ilaç olarak tasarlanmamasına rağmen emiliminden sonra aktif bir maddeye dönüştürülür.İndirgenmiş folat taşıyıcılarla hücreler tarafından alınır ve daha sonra hücreler içinde poliglutamatlara dönüştürülür(39).

Günümüzde MTX, kemoterapotik ajan olarak başta çeşitli kanser türlerinde (lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri, vb.) ve multipl skleroz, dermatomyozit, sarkoidoz, sedef hastalığı ve romatoid artrit gibi enflamasyonun neden olan rahatsızlıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir folik asit antagonistidir (40).

3.4.2.Farmakokinetik

MTX'in serumdaki yarılanma ömrü ilaç verildikten sonra 6-8 saat olup ilaç verildikten 24 saat sonra serumda bulunmaz. Absorpsiyon sonrasında MTX'in %10'u karaciğerde 7-hidroksi MTXa dönüştürülür. Hem MTX hem de metaboliti (7-OH MTX) öncelikle böbrekler tarafından küçük bir kısmı ise safra yoluyla atılır (41, 42).

MTX'in yaklaşık % 50'si taşıyıcı proteinlere bağlanır ve yüksek doku dağılımı olan bir ilaçtır. Ekstra vasküler havuzda birikir. Metotreksat ve metaboliti hücreler tarafından alındığında bir kısmı poliglütamat türevlerine metabolize olur(43). Diğer kısmı ise bağırsak bakterileri tarafından oluşturulan ve plazmada bulunan metaboliti 4-amino-4-deoksi-N-metilpteroik asite dönüştürülür. Metotreksat poliglütamatları (MTX-Glu) karaciğer ve eritrositleri de içeren dokularda uzun süre depolanır. Eritrositlerdeki MTX-Glu konsantrasyonu ilacın terapötik etkinliği ile ilişkilidir (43).

3.4.3.Farmakodinamik

Metotreksat yapısal olarak folik aside benzemektedir ve bu nedenle emiliminin ve metabolizma yollarının çoğunun aynı olduğu MTX, öncelikle indirgenmiş folat taşıyıcı ile hücrenin içine taşınır(43-45). Sirkulasyonda bir grup MTX glutamat (MTX-PG1) bulunurken, hücre içi MTX değişen miktarlarda glutamat grupları olan çoklu metabolitlerden oluşurlar. Hücrenin içine girdikten sonra ekstra glutamat kısımları folylpolyglutamate sentaz (FPGS) enzimi ile MTX poliglütamatlarına (MTX-PG'ler) dönüştürülür(46).

Hücrenin dışına atılabilmesi için MTX-PG'ler, γ -glutamil hidrolaz (GGH) enzimi ile monoglütamat formuna dönüştürür. Monoglütamat formdaki MTX hücre dışına ATP bağımlı ABC ailesi tarafından taşınırlar. Alınım, atılım, poliglütamasyon ve dekonjügasyon arasındaki denge, çeşitli MTX-PG'lerin zincir uzunluklarının

(MTX-PG2-7'ye kadar) farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu MTX-PG'lerin konsantrasyonu ve dağılımı, MTX'in dozu, uygulama yolu ve yaş gibi birçok faktöre bağlıdır(47-49). Bağlanan glutamat moleküllerinin sayısına bağlı olarak (polyglutamation) molekülün büyüklüğü ve anyonik özelliğinin artması MTX tedavisi için önemlidir. MTX poliglutamat'landıktan sonra molekül büyüklüğünün artması hücre dışına pasif difüzyonla çıkmasını engeller. Eklenen glutamat zincir uzunluğuna göre hücre içinde tek zincir için (MTX-PG1), ABCC1'den ABCC4'e kadar olan taşıyıcılarla aktif olarak hücrenin dışına pompalanırken, iki veya üç zincir için (MTX-PG2 ve MTX-PG3) ABCC5 ve ABCG2 aktif taşıyıcıların kullanıldığı bildirilmiştir. Dört veya daha fazla zincirin (MTX-PG4-7) taşınmasıyla ilgili henüz hiçbir kanıt yoktur. Zincir sayısının artması zaman içinde hücrede MTX-PG'lerin biriktirilmesiyle sonuçlanır. Ayrıca MTX'in poliglütamatlanmış biçimlerinin doğal MTX ile karşılaştırıldığında hedef enzimlere karşı daha yüksek afiniteye sahip olduğu ve MTX'in etkinliğinin poliglütamasyon seviyeleri ile arttığı düşünülmektedir (47).

3.4.4.Etki Mekanizması

Metotreksat ve MTX-PG'ler Dhfr ve Thfr dönüştüren kilit enzim olan Dhfr'nin aktivitesini bloke eder. Metotreksat ayrıca timidilat sentazı da (TS) güçlü bir şekilde inhibe eder (4). Özellikle hücre içi sitosolik NADP bağımlı dehidrogenazlar NADP koenzimini inhibe etmesi ile hücre içinde kullanılabilir NADPH miktarının azalmasına neden olur. Bu durum direkt NADPH koenzimini kullanan glutation redüktaz mekanizmasını etkiler (50). MTX'in antioksidan defansta önemli rol alan CAT, GPx ve SOD gibi enzimlerin aktivitesinde önemli azalmalara neden olduğu bildirilmiştir. Antioksidan sistem ile Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretilmesi arasındaki denge bozulunca MTX dengenin ROS lehine kaymasına neden olmaktadır. Zaten hücreler için MTX'in sitotoksik etkilerinin artan ROS'a karşı cevap veremeyen antioksidan mekanizmaya bağlı olduğu gösterilmiştir(51). Bir çalışmada MTX'in metiyonin sentezi, katalaz, GPx ve SOD gibi antioksidan enzimlerde azalmaya ve MTX'le tedavi olan hastaların beyin omurilik sıvısında S-Adenosil Metioninin (SAM) azalmasına neden olduğu bildirilmektedir. MTX'in neden olduğu SAM eksikliğinin, ROS'un artmasından sorumlu olduğu vurgulanmıştır (51). Ayrıca çalışmalarda MTX'in

oksidatif stresin, hücre içinde DNA hasarı ve membran lipitlerini oksitleyerek ve/veya apoptozisle ilgili gen ve proteinlerin gen ekspresyonlarını arttırarak hücrelerin ölmesinden sorumlu olduğu ifade edilmektedir (52). Yine MTX'in dolaylı olarak poliamin üreten enzimleri de inhibe etmesi sonucu poliamin üretiminin azaldığı ve bu durumun hücre içi ROS seviyelerinin artmasına yol açtığı ifade edilmiştir (53).

3.4.5. Toksik etkiler

MTX'in olumsuz yan etkileri halsizlik, mide bulantısı, kusma, diyare, baş ağrısı, hafif alopesi ve ateştir. Düşük doz terapisi siroz içeren farklı bir hepatotoksiste, benzer şekilde uzun süreli uygulanmasıda anemiye neden olur. Böbrek hasarı yüksek doz uygulanmasının sık görülen bir komplikasyonudur. Bununla birlikte, MTX'in yüksek dozda (lösemide olduğu gibi) veya uzun süreli kullanımı ilerleyici fibrozise ve siroza yol açabilecek hepatotoksisteye neden olabilir. Metotreksat, çok düşük dozlarda sürekli devam eden tedavilerde de karaciğer, böbrek, solunum ve üreme sistemi üzerine toksik etkileri bulunmaktadır (54).

Böbrek Üzerine Etkisi: Yüksek doz MTX kullanımıyla oluşan akut tubuler nekroza bağlı akut böbrek yetmezliği oranı nadirdir (%2-4) fakat ciddi ve kaygı vericidir. Bu toksiste MTX'in yüksek düzeyde uzun süre kullanımından dolayı böbrek tubullerinde MTX veya metabolitlerinin çökmesine bağlı olarak böbrek klirensinin engellenmesine veya azalmasına neden olur. MTX aynı zamanda doğrudan tübül epitellerine toksin etkisi gösterebilir ve afferent arteriolün vazokonstriksiyonuna neden olur (55-57).

MTX ve metabolitleri asit idrarda nispeten çözünmezler fakat idrarın pH'sındaki artışa bağlı olarak MTX ve metabolitlerinin daha fazla çözünmesine neden olur. Bu nedenle MTX infüzyonu öncesinde esnasında ve sonrasında böbrek fonksiyonlarının izlenmesi önerilir. Metotreksatın renal toksisitesini azaltmak amacıyla idrarı alkalileştirme, folik asit ilavesi veya güçlü hidrasyon denenmiştir (55-57).

Buna rağmen çoğu zaman yine de böbrek hasarı meydana gelir. Bazı vakalarda folinik asit desteği veya MTX'in kimyasal antidotu olan lökovorinle kurtarma tedavisi yapılarak oluşan hasarda azalma gözlenmiştir. Renal hasar sonucu MTX'in böbrek

eliminasyonu geciktikçe vücutta kalma süresi uzar, diğer organlara olan toksik etkisi de artar (55-58).

Gastro İntestinal Sistem Üzerine Toksik Etkisi; MTX çeşitli gastro-intestinal bozuklukları indükleyebilir. Hastalarda genellikle karın ağrısı, kusma ve ishal mevcuttur. Bu etkiler yüksek ya da düşük MTX dozları ile ortaya çıkabilir. Oluşan intestinal hasar ve enterokolit, hastalarda ağrı, oral alım azalması, istahsızlık, ishal, dehidrasyon, bunlara eşlik eden elektrolit dengesizliği, malabsorbsiyon, malnutrisyon ve kilo kaybına neden olabilir. MTX'e bağlı ince barsak hasarında oksidatif stresin, özellikle nötrofil infiltrasyonunu artırarak etki ettiği gösterilmiştir Bununla birlikte, epitelyal proliferasyon ve enterosit fonksiyonu azalmasına ve mukozal bariyerin bozulmasına bağlı olarak bazen ölüme kadar ilerleyebilen barsak kaynaklı sepsis riskini artabilir (59-61).

Nörotoksisitesi; MTX akut, subakut veya kronik nörotoksiteye neden olabilir. Bu toksisite esas olarak MTX'in intravenöz ve intratekal uygulanmasından sonra gözlemlenir (62). Toksisite mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir, ancak birçok hipotez bu nörotoksiteyi proteinler, lipidler ve miyelin oluşumu için önemli olan transmetilasyon tepkimeleriyle MTX'in etkileşmesi şeklinde açıklarlar (63). Ayrıca MTX beyin omurilik sıvısındaki metionin ve S-adenosil metiyonin oranını düşürerek S-adenosil homosistein ve homosistein seviyelerinide yükseltir. Yüksek homosistein oranlarının MTX nörotoksisitesinin vasküler olayından sorumlu olabileceği gösterilmiştir (64).

En sık görülen akut nörolojik bulgu: lökoensefalopatidir. Bu yan etki uykusuzluk, kafa karışıklığı, ajitasyon, nöbet ve koma gibi belirtilere göre klinik olarak yada sadece manyetik rezonans incelemeyele subklinik olarak teşhis edilir (65). Baş ağrısı, bulantı, kusma ve aseptik menenjit, MTX'in intratekal uygulanmasından sonra da görülür. Bu semptomlar MTX'in akut nörotoksisitesinin bir başka yönünü temsil eder. Genellikle son 12 ile 72 saat arasında şiddetli değildirler ve ilacın kesilmesiyle birlikte ortadan kaybolur (66, 67).

Parapleji, serebellar disfonksiyon ve nöbet MTX'in subakut nörotoksisitesi olarak bildirilmiştir ve MTX uygulamasından birkaç hafta sonra ortaya çıkmaya

başlar. Kronik nörotoksisite MTX tedavisinden sonraki yıllarda bile görülebilir (56, 60, 66).

Solunum Sistemi Üzerine Etkisi; Pnömoni, MTX düşük doz kullanımına bağlı olarak en ciddi fakat nadir görülen yan etkilerden biridir. Prevelansı % 1'dir. Pnömoninin mekanizması MTX'a bağlı aktive olan T hücrelerinin aracılık ettiği aşırı duyarlılık reaksiyonudur(60). Aslında, MTX inflamatuvar hücrelerin birikerek alveolit oluşmasına sebep olan tip2 alveoler hücreler tarafından bir sitokin salımına neden olur (68). MTX ayrıca akciğer fibroblastlarını uyarabilir ve epitelyal hücrelerde eozinofillerin alımına neden olduğu gösterilmiştir(69).

Ayrıca akciğer fibrozunun patogenezinde nötrofillerin rol oynadığı da gösterilmiştir (70). Klinik olarak MTX tedavisinin başlangıcından sonra bir yıldan fazla sürmesi ve MTX kesildikten sonraki birkaç hafta boyunca da olsa semptomlar ortaya çıkabilir (71). Öksürük en sık görülen semptomudur. Ateş, halsizlik, nefes darlığı da görülebilir. Periferik eozinofilinin hastaların üçte birinde görüldüğü bildirilmiştir (72).

Hematolojik Toksisite; Hematolojik toksisite MTX'ın yüksek dozda kullanımına bağlı olarak yaygın görülen ciddi bir komplikasyondur(73). Bu komplikasyonda trombositopeniyi takiben hızlı ilerleyen bir lökoneutropeni izler(56). Lökopeni bir ile üç hafta arasında devam ederken kemik iliğinin iyileşmesi genellikle yaklaşık 3 hafta içinde gözlemlenir. MTX düşük dozda kullanımına bağlı trombositopeni, megaloblastik anemi, lökopeni ve pansitopeni gibi hematolojik toksisite riski azdır (74). MTX'ın pansitopeni patogenezi üzerine etkisi belirsizdir. Pansitopeni akut veya kronik olabilir ve bir alerji benzeri tepki olarak düşünülmüştür (75).

Erkek Üreme Sistemi Üzerine Toksik Etkileri: Kemoterapotik ilaçların çoklu organ sistemlerindeki akut toksik etkileri bilinmektedir. Metotreksat malign tümörler ve non-neoplastik hastalıklar (özellikle romatoid artrit) için kemoterapötik amaçlı kullanılan folik asit antagonistidir. Kalıcı azoospermi ve infertilite kemoterapötik ilaçların erkeklerde yan etkileri olarak kaydedilmiştir. Birçok çalışmada MTX uygulamasını takiben testisin seminifer tübüllerinde hasar (vakuolizasyon), sperm sayısında azalma ve spermde DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. Oksidatif stresin, MTX ile

oluşturulan testiküler hasar patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Testiküler seminifer tübüllerde atrofi ve spermatositlerde apoptozun ROS'taki bir artışla bağlantılı olabileceği kanıtlanmıştır(10-12, 76, 77).

Buna ek olarak, MTX hasarlı oogeneze ve spermatogeneze neden olur ve fertiliteye zarar verir (78).MTX'in sperm sayısını azalttığı ve anormal baş yapısına sahip spermelerin sıklığını artırdığı bildirilmiştir. Sperm baş anomalilerinin muhtemelen DNA bütünlüğünün bozulmasıyla meydana geldiği (79)ve spermatogenez ve sperm hücrelerinin farklı gelişim evrelerindeki eliminasyon sürecinde oluşan hasara bağlı sperm sayısını azalttığı bildirilmiştir(80). Başka bir çalışmada MTX'in terapötik dozunun testiste histopatolojik değişikliklerin oluşmasına ve fertilité oranının düşmesineneden olduğunu bu durumun MTX kullanımından oluşan seminifer tübül dejenerasyonundan kaynaklanmış olduğunu belirtmişlerdir(81). Metotreksat kullanımının atrofik seminifer tübüller içerisinde çok çekirdekli dev hücreler, germ hücre dejenerasyonu ve artmış interstisyel doku boşlukları oluşturduğu buna ek olarak spermatogenez ve testosteron üretiminde önemli rol oynayan tirozin fosforilasyonunu azalttığı (StAR protein azalması) gösterilmiştir(8).

Ayrıca MTX'la oluşturulan hasara bağlı seminifer tübüllerinde disorganizasyon, vakuolizasyon gibi morfolojik değişiklikler ile spermatogonia ve spermatid sayısında azalmaya sebep olduğu kaydedilmiştir. Düşük dozda uzun süreli MTX kullanımına bağlı olarak primer ve sekonder spermatositlerin,spermatid boyutunun önemli derecede değiştiği, fakat Sertoli hücrelerinde önemli farklılıklar görülmediği bildirilmiştir(82).MTX'in serum testosteron konsantrasyonu, spermatozoaların sayı, motilite ve yaşama kabiliyetinde de belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir(12).

Dagguli ve ark. MTX uygulamasına bağlı testis hasarının gelişmesinde oksidatif stresin (TOS, OSI ve MDA seviyelerinin artması) önemini belirtmişlerdir(17). Yuluğ ve ark. MTX kullanımının Johnson'ın testis biyopsi skoru (JTBS) anlamlı şekilde düşürdüğü, apoptotik indeksi ise testis ve epididimde arttırdığını vurgulamışlardır(14).Diğer bir çalışmada seminifer tübül epitelinin

incelmesi ve spermatogonial hücrelerde azalma gibi histopatolojik bulgulara ek olarak elektron mikroskopik bulgularda da benzer hasarlar tespit edilmiştir(83).

Maremanda ve ark. MTX ile tedavi edilen sıçanların testislerinde tübüler atrofi ve TUNEL pozitif hücre sayısının arttığını (germ hücrelerde DNA hasarı) göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada MTX verilen grupta apoptoz belirteçleri olan Bax protein miktarının arttığı, Bcl-2'nin (antiapoptoz) ise azaldığı belirtilmiştir (84). Ayrıca MTX'in tümör nekroz faktör- α (TNF- α) seviyesinin ve nükleer faktör- κ B ve siklooksijenaz-2 (NF- κ B, COX-2) ekspresyonunu arttırdığını, serum testosteron seviyesini ise düşürdüğü belirtilmiştir(13). Başka bir çalışmada sıçanlarda MTX uygulamasına bağlı olarak interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), üreme hormonları (FSH, LH ve testosteron) ve antioksidanların (GST, SOD ve CAT) serum seviyelerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir(9). Ayrıca Saad ve ark. MTX grubundaki sıçanlarda GST, SOD, steroidojenez ilişkili genler, IFN- γ , Bcl-2 ve NF κ B'nin mRNA ekspresyonunun azaldığını, BAX ekspresyonu ve caspase-9'un immünoreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir (9).

Yine Sheikhbahaei ve ark. farelerde MTX'in neden olduğu germ hücre apoptozisine karşı timokinonun koruyucu etkilerinin incelendiği çalışmada MTX grubunda germ hücre dejenerasyonunda ve apoptotik indekste anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir(85). Bunlara ek olarak p53, kaspaz-8, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, Bax/Bcl-2 oranının mRNA ifadesinde anlamlı bir artış olduğunu fakat Bcl-2 ifadesinde bir azalma olduğunu ifade etmişlerdir (85).

3.5. SİLİMARİN

Silimarin bilimsel adı *Silybum marianum* olan ve *Cardus marianus* Compositae / Asteraceae ailesi üyesi olarak bilinen süt devedikeninden elde edilen bir polifenolik flavonoiddir. Silimarin (SLM) tohumları hepatit, siroz ve ikterus gibi bir dizi karaciğer ve safra kesesi rahatsızlığını tedavi etmek için 2000 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. SLM karaciğer hastalığının tedavisinde kullanılan en eski bitkilerden biridir (86).

Silybum marianum Amerika Birleşik Devletleri'nin doğusu ile güney Amerika, Kuzey Amerika, güney ve batı Avrupa da yetiştirilmektedir. Büyük mor çiçekli başları olan bitki kumlu topraklarda ve kayalıklarda yetişir (87, 88).

İlk olarak m.ö. 4. yüzyılın başlarında tıbbi bitki olarak kullanıldığı Theophrastus tarafından bildirilmiştir. Birinci yüzyılda Roma ordusuna hizmet eden bir Yunan doktoru olan Dioscorides tarafından devedikenini adı verilmiştir. SLM ilk kez Avrupa'da sebze olarak yetiştirilmiş, dikensiz yaprakları salata ve ıspanak olarak kullanılıp, kök ve çiçekleri de tüketilmiştir. Silimarin 30 ila 200 cm boyuna kadar büyüyebilir ve genel olarak konik bir şekle sahiptir. Maksimum taban çapı yaklaşık 160 cm'dir (86, 89).

3.5.1. Silimarin Kimyasal Yapısı

Silimarin ekstratı, bitkinin yaklaşık % 4-6'sını oluşturan tohumlarından hazırlanır. Bitkinin aktif ekstraktının yaklaşık %70-80'i SLM içerirken, polimerik ve oksitlenmiş polifenolik ve kimyasal olarak tanımlanmamış fraksiyonun % 20-30'u flavonolignanlardan oluşan bir karışımdır. Kullanılan çoğu preparatta maksimum biyolojik aktivite gösteren başlıca bileşenlerin % 90'ını silybin veya silibinin oluşturur. Silymarin'in ana bileşeni olan silybinin, 2 diastereomer A ve B'nin (1: 1 oranı) bir karışımdır. SLM'nin diğer bileşenleri; izosilibin, dehidrosilibin, silikristin, sililyan ve taksifolinde esasen *Silybum marianum*'un tohumlarında bulunur. Bitkinin potansiyel olarak diğer aktif bileşenleri silybonol, miristik, oleik, palmitik ve stearik asitler ve betain hidroklorürdür (87, 90).

3.5.2. Silimarin Farmakokinetik Özellikleri

Silimarin suda çözünmez ve genellikle standart (%70-80 silimarin içeren) kapsüller halinde verilir. Oral uygulamadan sonra emilimi oldukça düşüktür, sıçan safrasındaki oranı %2-3 arasında değişir. Hem hayvanlarda hem de insanlarda maksimum plazma konsantrasyonuna 4-6 saat içinde ulaşır (22, 91, 92).

SLM esas olarak safrayla, az miktarda da idrarla atılır. Böbrek klirensi yaklaşık dakikada 30 mLdir. Eliminasyon yarılanma ömrü 6 ila 8 saat arasında değişir (71). Bununla birlikte, 200 mg/kg SLM veya saflaştırılmış *S. marianum* özütünün farelerde oral uygulanmasından 90 dakika sonra plazma düzeyi 500 mg/L olarak bildirilmiştir (22, 91, 92).

Silibinin ve SLM'nin diğer bileşenleri karaciğerde hızla sülfat ve glukuronik asit ile konjuge edilir. Konjugatlar plazma ve safra içine geçerler, verildikleri toplam dozun yaklaşık %80'ine tekabül eden miktarlarda bulunurlar. Silibinin oral (%2-5) veya intravenöz (%8) uygulamayı takiben 48 saat boyunca idrarda minimal miktarlarda atılır (22, 91, 92).

Barsak emilimi, karaciğerde konjugasyon, safra atılımı, bağırsak florasında hidroliz ve bağırsakta geri alım gibi bulgular enterohepatik dolaşımının varlığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, sıçanda işaretli silibinin kullanılmasını takiben 20 mg/kg'lık bir dozun bağırsakta emiliminin yaklaşık %35'lik bir miktarda olduğu gösterilmiştir. Plazmadaki maksimum radyoaktivite alımından 30 dakika sonra görülmüştür (22, 91, 92).

Bununla birlikte SLM biyoyararlanımını sınırlayan dört ana neden vardır; geniş faz II metabolizmasına uğraması, bağırsak epitel hücreleri arasından geçişinin düşük olması, suda çözünürlüğünün az, safra ve idrarda atılımının hızlı olması. Bundan dolayı SLM biyoyararlanımını artırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar: transdermal veya sürekli ilaç salıveren formülasyonları, nanopartiküller, lipozomlar, kendi kendine mikroemülsifiye ilaç veren sistemler ve polimerik miseller geliştirilen bazı formlarıdır (22, 91, 92).

3.5.3. Silimarin Toksik Etkisi

SLM kullanımına bağılı ürtiker, bulantı, baş ağırsı, eklem ağırsı, kaşıntı ve ishal gibi hafif gastrointestinal rahatsızlıklar ve alerjik reaksiyonlar bildirilmiştir. SLM akut toksisitesi intravenöz infüzyondan sonra fareler, sıçanlar, tavşanlar ve köpeklerde çalışılmıştır. Letal doz (LD50) değerleri farelerde 400 mg/kg, sıçanlarda 385 mg/kg ve tavşanlarda ve köpeklerde 140 mg/kg olarak rapor edilmiştir. Ancak bu değerler infüzyon hızına bağılı oldukları için yaklaşık değerlerdir (21, 22, 91, 92).

Sıçanlarda SLM'nin akut, subakut ve kronik toksisitesi çok düşüktür. Sıçanlarda SLM'nin yavaş infüzyon ile 2g/kg uygulanabildiği kaydedilmiştir. Oral uygulamadan sonra 10 g/kg kadar tolere edilebilmektedir. Akut zehirlenme vakalarında kardiyovasküler yetmezliğe bağılı ölüm görülebilir. Ayrıca SLM'nin teratojenik ve embriyotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (22, 91, 92).

3.5.4.1. Silimarin Diğer Etkileri

Silimarin' in koruyucu etkilerini başlıca, steroid yapısında olmasından dolayı hücre içinde hem RNA hem de protein sentezini uyararak hücrelerin yenilenmesi, hücre membran stabilitesini arttıracak/değiştirerek zararlı maddelerin hücre içine alımının engellenmesi, serbest radikal süpürücü etkisiyle ROS nötralize etmesi, hücre içi glutatyon seviyesini artırıp, lipit peroksidasyonu azaltması şeklinde gerçekleştirildiği bildirilmiştir (22)

Antioksidan  zelliğini SOD, glutatyon, CAT ve GSHPx aktivitelerini arttıracak, demir ile bağlanıp hücrelerdeki glutatyon redüksiyonu'nu azaltarak gösterdiği ifade edilmektedir (23). Bunun dışında yapılan güncel çalışmalarda, SLM'in antioksidan etkilerinin, antioksidan enzimlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu uyararak (SOD, GSH-Px, CAT gibi) gerçekleştirdiğini göstermektedir (22). Benzer şekilde antiapoptotik etkilerini hücre içerisinde p53-bağamlı yolağı (Bcl-2/Bax, cytochrome C salınması, Apaf-1) ve caspase-3 üzerinden gösterdiği ifade edilmiştir (24).

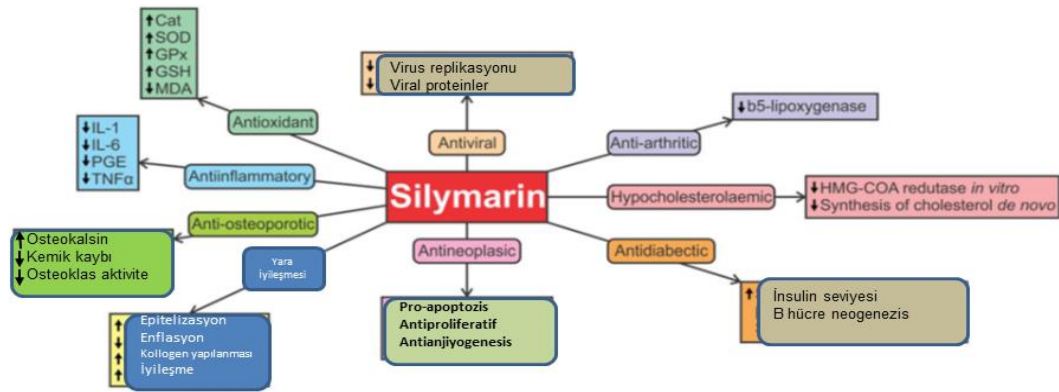
Östrojenik bir etkiye sahip olan SLM'nin hem uterus kalınlığı ve endometrial hücrelerin boyunun uzaması üzerine olumlu etki yaptığı gözlenmiştir (93). NF- B

aktivasyonu ve hücre içi lokalizasyonu değiştirerekten T-hücrelerinde aktivasyon ve proliferasyonu baskılayarak immun-süpresif etki gösterdiği bildirilmiştir (94).

SLM'nin HbA1c ve kan glukoz seviyesini azalttığı, bu etkiyi hücrel glutasyonu ve antioksidan enzimleri artırıcı ve membran stabilize edici özelliği ile düzenlediği ifade edilmiştir (95).

Silymarin beyinde bazı nörotransmitterlerin konsatrasyonunu artırdığı bilinmektedir. Bir çalışmada zorla yüzme testi uygulanan farelerde..i.v./i.m./i.p. olarak uygulanan SLMin fare immobilizasyonu üzerine olumlu etkilerin olduğu bu yönü ile de antidepresan etki gösterdiği ifade edilmiştir (22).

Lökotrien ve prostaglandin sentezinin inhibisyonu, mast hücre stabilizasyonu, nötrofil göçünün inhibisyonu, IL-2, IL-4, IL-10 ve TNF gibi inflamatuvar sitokinlerin baskılanması ve Kupffer hücre inhibisyonu gibi SLMin antiinflamatuvar aktivitesini gösteren için birçok mekanizma bildirilmiştir. Silimarin, Kupffer hücresinde lökotrien oluşumuna müdahale ederek, hepatik yıldız görünümlü hücre aktivasyonunun fibrojeneze dönüşümünü engellediği belirtilmiştir (96). Düşük dozda uygulanan SLMin farelerde T-lenfositlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. TNF, IL-1 β ve IL-6'nın mRNA ekspresyonları doza bağlı olarak artmıştır. Silymarinin immünomodülatör aktivitesinin olduğu bu çalışmalarda açıkça gösterilmiştir (96).



Şekil 2. Silimarinin genel özellikleri

3.5.5. Metotreksat Hasarına Karşı Silimarin Kullanılmış Çalışmalar

Kandemir ve ark. MTX ile oluşturulan nefrotoksitesine karşı SLM'nin korucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında SLM'nin antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri nedeniyle böbrek hasarına karşı koruyucu olabileceğini ifade etmişlerdir (97). Yine bezer şekilde Dabak ve Kocaman SLM'nin apozis önleyerek sıçan böbreklerinde MTX'a karşı koruyucu bir etki oluşturduğunu vurgulamışlardır (28).

Metotreksat tarafından oluşturulan gastrointestinal hasara karşı SLM'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı diğerk bir çalışmada ise SLM'nin antioksidanların glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA)düzeyini azalatarak gastrointestinal sistemde epitel tabakada dejenerasyon, nekroz, deskuamasyon ve ödem gibi bulgularının şiddetini azalttığını tespit etmişlerdir (27).

Qufi ve ark (2014) uzun süreli MTX kullanımının testis üzerine toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada SLM bileşenlerinden silibinin'in testiste canlı/ölü spermatozoa oranı ve testis dokusunda çeşitli histolojik parametleri olumlu yönde etkilediğini ifade etmişlerdir (29).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

İnkübatör (Nüve Incubator EN 120, TÜRKİYE)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich Universal 320R ALMANYA)

Su Banyoları (VWR International, ALMANYA)

PZR Thermo Cycler (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycle)

Real Time PCR Sistemi (Rotor-Gene Q, Qiagen, ALMANYA)

Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000c)

Otomatik Pipet Seti (0,2-2, 2-20, 20-200, 100-1000 Eppendorf, ABD)

Mini Santrifüjler (VWR International, ALMANYA)

UV-Transluminatör (VWR International, ALMANYA)

Vorteks (Vorteks Genie 2)

Hassas Tartı (Shimadzu TXB62L, Precisa XB220A)

Azot Tankı (GoldenPro 6 lt)

-20°C Dondurucu (Arçelik)

-80°C Dondurucu (Arçelik)

Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 564)

Mikrotom (Leica RM2125 RTS)

Karıştırıcı (Biosan Orbital Shaker PSU-10i)

Homojenizatör (SilentCrusher, Heidolph, Almanya)

Hormon Tayini (Hitachi cobas 8000, Roche, ALMANYA)

TAS, TOS ölçümü (Auto-analyzer, Selectra, Merck, HOLLANDA)

MDA, CAT, SOD ölçümü (Biochrom Anthos Zenyth 200rt microplate reader, İNGİLTERE)

Görüntüleme sistemi (Nikon 80i, JAPONYA)

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metotreksat (flakon 50 mg/5 ml Koçak, Türkiye

Silimarin (Sigma-Aldrich Sigma S0292-50G)

Bouin's solusyonu (VMR Prolobo Chemicals UN3265)

ABC kiti (Vectastain PK-6100)

Hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich SZBB2210V)

Ethanol (Sigma-Aldrich 34870)

Xylenes (Sigma-Aldrich 16446)

Methanol (VWR prolobo chemicals UN1230)

TRIzol® Reagent (Invitrogen Life Technologies Inc.)

RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Fermentas, ABD)

RNase-free DNase I, (Promega)

Maxima™ SYBR qPCR Master Mix (2X) for Real-time PCR Fermentas Life Sciences)

4.1.3. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DUSAM) temin edilen 300±50 gram ağırlığında 46 adet erişkin erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlar ortam şartları otomatik ayarlanan odalarda (12/12 aydınlık/karanlık, sıcaklık 22 °C, nem % 45-50) barındırıldı. Çalışmada kullanılan sıçanlar ticari yem (Elazığ Yem Sanayi) ve su ile ad libitum beslendi. Bu çalışma Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK)'nun 25.01.2018 tarih ve 2017/20 nolu etik kurul onayı ile gerçekleştirildi.

4.2. Yöntem

4.2.1. DeneySEL Farmakolojik İncelemeler

Çalışmamızda kullanılan SLM dimethyl sulfoxide (DMSO) içinde çözdürüldü. İlaç uygulamaları her gün aynı saatte gerçekleştirildi. Metotreksat bir kez, SLM ise aynı

saatte ve 24 saat arayla 7 kez intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Silimarinin ve MTX'in ip enjeksiyonları arasında 1 saat beklenildi. Tüm hayvanlar rastgele olacak şekilde altı gruba ayrıldı.

Grup (1) Kontrol Grubu (n:7)

Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca günde bir doz DMSO i.p olarak uygulandı.

Grup (2) Metotreksat grubu (n:8, MTX (1.Gün))

Bu gruptakısıçanlara sadece çalışmanın birinci günü tek doz MTX (20 mg/kg, ip, uygulandı (10, 11, 17).

Grup (3) Metotreksat+Silimarin (n:8, MTX (1.Gün)+SLM)

Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın birinci gün tek doz MTX (20 mg/kg, ip) ve 7 gün boyunca günde bir kez SLM (100 mg/kg, ip) uygulandı.

Grup (4) Silimarin grubu (n:7, SLM)

Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca günde bir kez SLM (100 mg/kg, ip) uygulandı (27, 97, 98).

Grup (5) Metotreksat grubu (n:8, MTX (7.Gün))

Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın 7. günü tek doz MTX (20 mg/kg, ip) uygulandı.

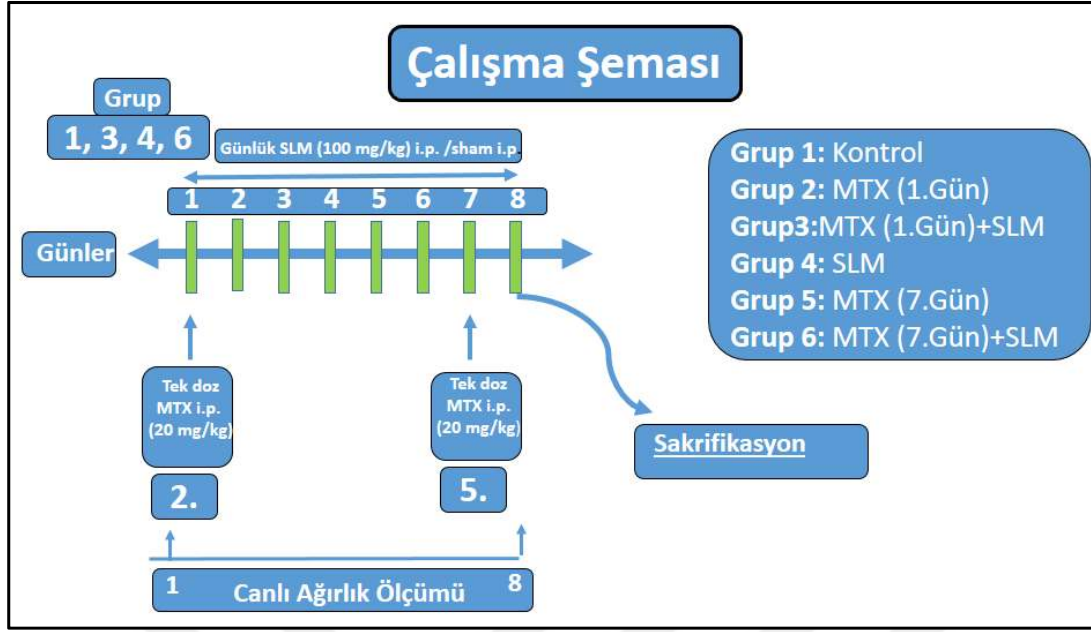
Grup (6) Metotreksat+Silimarin grubu (n:8, MTX (7.Gün)+SLM)

Bu gruptakısıçanlara çalışmanın 7. günüMTX (20 mg/kg, ip) ve 7 gün boyunca günde bir kez SLM (100 mg/kg, ip) uygulandı.

Tüm hayvanların canlı ağırlıkları deneyin başında ve anestezi öncesi hassas terazi ile tartıldı. Kullanılan ilaçların parenteral enjeksiyon hacmi aşağıdaki formülle hesaplandı (99). Silimarin DMSO (%100) içerisinde çözündürüldü ve kullanılıncaya kadar karanlık ve soğuk ortamda muhafaza edildi (94, 100, 101).

$$\text{Enjeksiyon hacmi} = \frac{\text{Hayvanın canlı ağırlığı (kg)} \times \text{hayvana verilecek doz (mg/kg)}}{\text{İlacın konsantrasyonu (mg/ml)}}$$

Deney sonunda (8. Gün) tüm sıçanlar etik kurallara uygun olarak genel anestezi altında [ketamin 50mg/ml (%10'luk) ve ksilazin 10mg/ml (%2'lik)] sakrifiye edildi (6, 17). Anestezi altında median hattın yapılan insizyonla toraks açılıp intrakardiyak yolla kanları steril serum tüplerine alındı. Daha sonra testis dokuları çıkarıldı ve analizlere kadar -80 °C'de saklandı(Şekil 3).



Şekil 3. Deney protokolü

4.2.2. Testis Ağırlıklarının Ölçümü ve Testis Ağırlık İndeksinin (TAİ) Hesaplanması

Her bir hayvanın testisi çevre dokularından temizlenerek (Shimadzu (TXB62L)) hassas terazi ile tartıldı. Aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlıkları toplamının deneyin son günü ölçülen vücut ağırlığına oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak TAİ değerleri belirlendi(102);

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

4.2.3. Biyokimyasal İncelemeler

4.2.3.1. Serum Alanin Aminotransferaz (ALT), Serum Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Testosteron Seviyesinin Ölçülmesi

Kan örnekleri 3500 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen serumlar eppendorf tüplere alınarak -80 °C’de saklandı. Serum aspartat aminotransferaz (AST – SGOT), alanin aminotransferaz (ALT – SGPT) ve testosteron düzeyleri otoanalizatör cihazı (COBAS 8000 HITACHI) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm öncesinde referans değeri kullanılarak kalibre edildi.

4.2.3.2. Testis Dokusundan Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Ölçülmesi

4.2.3.2.1. Total Antioksidan Seviyesi (TAS), Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'nin Belirlenmesi

Testis dokusundan 1 gr'lık örnekler alınarak -80 °C'de saklandı. Doku örnekleri homojenizatör ile soğuk fosfat buffer saline (0.1 M; pH 7.4) içerisinde homojenize edildi. Homojenizatlar 5000 g'de 5 dakika +4 C'de santrifüj edilerek süpernatantlar godelere otanalizör cihazına (Selectra, HOLLANDA) yüklendi ve Erel tarafından geliştirilen Rel Assay Total Oksidan ve Antioksidan Status Test Kiti (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti. Gaziantep, Türkiye) ile ölçüldü (103, 104).

Oksidatif Stres İndeksi değeri ise TAS ve TOS değerleri kullanılarak aşağıdaki formülle hesaplandı: OSI (arbitrary unit) = TOS (μol H₂O₂ equivalent/L) / TAS (μol Trolox equivalent/L)(105).

4.2.3.2.2 Malondialdehit (MDA), Katalaz (CAT) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçümü

Dokulardaki MDA, CAT ve SOD ölçümleri için yukarıda belirtilen şekilde elde edilen süpernatantlar kullanıldı. MDA, CAT ve SOD seviyeleri sıçanlar için spesifik olarak üretilen monoklonal antikorlar ELISA sistemi ile (E0869Ra, E0168Ra, E0156Ra, Bioassay Tecnology Laboratories, Güney kore) ölçüldü. MDA, CAT ve SOD ölçümleri için aşağıdaki kit prosedürü kullanıldı.

Önceden monoklonal antikorla kaplanmış olan ELISA plakası kuyucuklarına süpernatant ilave edildi.

1. Standart olarak 6 kuyucuğa 24ng/ml, 12ng/ml, 6ng/ml, 3ng/ml, 1.5ng/ml, 0.75ng/ml şeklindeki standart ilave edildi.
2. Plaka 60 dakika 37°C'de ağzı kapalı bir şekilde inkübe edildi.
3. Daha sonra kuyucuklar ELISA yıkayıcıda solisyonu ile 5 defa yıkandı.
4. Kuyucuklara A ve B solisyonları damlatılarak 10 dakika 37°C'de ağzı kapalı bir şekilde inkübe edildi.
5. Stop solisyonu ilave edilen kuyucuklar 30 dakika sonra ELISA okuyucuda 450 mm de okundu.
6. Sonuçlar Intra-Assay: CV<8% , Inter-Assay: CV<10% olacak şekilde CAT için ng/gr, MDA için nmol/gr ve SOD için U/gr olarak belirlendi.

4.2.4. Moleküler İncelemeler

4.2.4.1. Testis Dokusunda Antioksidan, Anti/ProApoptotik Ve Steroidogenezis ile İlgili Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

4.2.4.1.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu amacıyla -80 °C'de muhafaza edilen testis dokularından her hayvanda eşit olacak şekilde yaklaşık 50 mg doku örneği alındı ve 800 µL solüsyon trizol (TRIzol Reagent-Invitrogen, USA) içerisinde homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizatlar başka bir mikrofüj tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl kloroform konularak tüpler vortekslendi. 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra +4 C de 12,700 g'de 15 dk santrifüj edildi.

Üstteki sulu fazdan yaklaşık 500 ml sarsmadan alınarak başka bir tüpe aktarıldı, üzerine 500 ml izopropanol eklendi ve oda ısısında 10dk bekletildikten sonra +4 C 12,700g'de 10 dk santrifüj edildi. Dibe çöken RNA peleti üzerindeki izopropanollü süpernatant döküldü. Peletler üç kez etil alkolde (-20°C; % 70lik, % 70lik ve %95lik) yıkama yapıldı. Her defasında +4 °C 77000 devirde 5dk 3er kez santrifüjlendi ve sıvılar boşaltıldı. Elde edilen RNA peleti 37 °C'de kurutuldu ve nükleaz içermeyen 100 µl H₂O içerisinde 65 C'de 5 dk bekletilerek çözündürüldü. Total RNA miktarı nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000c) kullanılarak belirlendi.

Total RNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla nanodrop cihazının okuyucu bölümüne önce 2 µl dietilpirokarbonatlı (DEPC) su (ddH₂O) daha sonra da cihazın okuma yüzeyine 1µl RNA örneği steril pipet ucu ile damlatılarak ölçümler yapıldı. Örneklerin RNA miktarları ng/µl şeklinde kaydedildi. Total RNA konsantrasyonları belirlenen örnekler cDNA yapımında kullanıldı. Elde edilen örnekler diğer analizler için -80°C'de saklandı.

4.2.4.1.2. cDNA sentezi

Total RNA'dan tek zincirli cDNA üretilmesi için ticari kit [(RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Fermentas, ABD)] kullanıldı. Daha sonra Total RNA'dan 2µg/20µl alınarak üzerine 1 µl oligo-dT + 1 µl random hexamer ilave edildi (Random hexamer ile oligodt miks solüsyon yapıp RNA'ya ilave edildi). Miks solüsyon örnek

sayısının bir fazlası olacak şekilde hazırlandı (5x Reaksiyon tamponu 4 µl, 1 µl RiboLock RNase İnhibitör, 1 µl Reverse Aid Transcriptase, 2 µl 10 µM dNTP miks). Elde edilen miks solüsyondan 8 µl her kuyucuğa konuldu. Hafifçe karıştırıldı ve santrifüj edildi.

4.2.4.1.3. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PZR)

Çalışmada apoptozis ile ilgili genlerden B-cell lymphoma 2 (BCL2), BCL2 Associated X (BAX), Caspase-activated DNase (CAD) araştırıldı. Anti-oksidan enzim genler zinc-superoxide dismutase (Zn_SOD), magnesium-superoxide dismutase (Mg-SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase 1 (GPx1) ve steroidogenezis yolağı genler (androgen-binding protein (ABP), Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)) araştırılmıştır. Kontrol (house keeping gene) olarak glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ve Beta –Actin (B-act) genleri kullanılmıştır. Boya olarak çift iplikçikli DNA'ya bağlanabilen SyberGreen (Maxima™ SYBR qPCR Master Mix (2X) for Real-time PCR Fermentas Life Sciences) kullanıldı. PZR reaksiyonu cDNA ile birlikte hızlı reaksiyon tüpünde total hacim 10 µl [5 µl, Primer 0,1 µl, su 3,9 µl RNase Free, DNase Free(RNase-free DNase I, (Promega)) template 1 µl (cDNA)] numune sayısının bir fazlası olacak şekilde miks solüsyon hazırlandı. Kontrol yapıldıktan sonra Real Time PZR'a dikkatlice yerleştirildi. Reaksiyon ısı profili; +95°C 10 dakika ön denatürasyon, 40 siklus 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olacak şekilde ayarlandı. Melting Curve (erime eğrisi) analizi için 95°C'de 15 saniye, 60°C'ye 1 dakika ısı profili ayarlandı. Hedef genlerin yükseltgenmesi amacıyla Real-Time qPZR cihazı kullanıldı. Elde edilen eşik döngüsü (Ct) değerleri herbir gen için ayrı ayrı kayıt edildi. Real time PZR analizi için veri hazırlama;

Elde edilen Ct değerlerinin normalizasyonunda Livak ve Schmittgen (2001) tarafından belirtilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanıldı (106).

$$\Delta Ct 1 = CT (hedef gen -uygulama grubu) - CT (referans gen - uygulama grubu)$$

$$\Delta Ct 2 = CT (hedef gen - kontrol) - Ct (referans gen - kontrol)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct 1 (uygulama grubu) - \Delta Ct 2 (kontrol grubu)$$

Bu formüle göre; GAPDH, β -actin genlerinin Ct değerlerin geometrik ortalaması alındı. Çalışmada kullanılan hedef genlerin (B-cell lymphoma 2 (BCL2), BCL2 Associated X (BAX), Caspase-activated DNase (CAD), zinc-superoxide dismutase (Zn_SOD), magnesium-superoxide dismutase (Mg-SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase 1 (GPx1) ve androgen-binding protein (ABP), Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) Ct değerleri belirlendi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre kat değişimi şeklinde elde edilen verilerin aritmetik ortalaması, standart hatası belirlendi. Elde edilen değerlerin Microsoft Excel programında grafikleri hazırlandı.

Tablo 1. Sıçan Primerleri ve Referans (Hausekeeping) Gen Listesi

StAR	Forward	CTGCTAGACCAGCCCATGGAC
	Reverse	TGATTCCTTGACATTTGGGTTC
ABP	Forward	ATGTGAAGCCTGGGTACCTG
	Reverse	GTGAACCCCAAGCAGTTGAT
Bcl-2	Forward	TGAGTACCTGAACCGGCATCT
	Reverse	GCATCCCAGCTCCGTTAT
BAX	Forward	GGATGCGTCCACCAAGAAG
	Reverse	GGAGGAAGTCCAGTGTCCAGCC
CAD	Forward	TTTAACGAGCCACATGCCGGG
	Reverse	CAGCTGTATCTCAGGTAGCCA
CAT	Forward	ATTGCCGTCCGATTCTCC
	Reverse	CCAGTTACCATCTTCAGTGTAG
Mg-SOD	Forward	GCTCTAATCACGACCCACT
	Reverse	CATTCTCCCAGTTGATTACATTC
Zn-SOD	Forward	GAGCAGAAGGCAAGCGGTGAA
	Reverse	CCACATTGCCAGTTCTC
GPx1	Forward	CTCTCCGCGGTGGCACAGT
	Reverse	CCACCACCGGGTCGGACATAC
B-actin	Forward	GCCAGAAAAGCCTCTAATCCACCTCC
	Reverse	GCTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT
GAPDH	Forward	ATGGAGAAGGCTGGGGCTCACCT
	Reverse	AGCCCTTCCACGATGCCAAAGTTGT

4.2.4.2. Testis Dokusundan Pro-Caspase-3 Protein Miktarının Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

4.2.4.2.1. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu için 100 mg testis doku protein lizis solusyonu (Thermo Proteo JETTM Mammalian Cell Lysis Reagent, ABD) içinde bir homojenizatör(Heidolph homogenizers,SilentCrusher, Almanya) yardımı ile homojenize edildi. Homojenizat

14,000 g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantayı bir tüpe aktarıldı ve içine proteaz inhibitör konkteil ilave edilerek -80 C'de muhafaza edildi.

4.2.4.2.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları sepektrofometrede ölçülüp toplam 40 microgram/ μ l olacak şekilde total protein yükleme tamponu olan 2x lammeli tampon (gliserol+b-merkapto etenol+brom creasol blue) içinde (toplam 10 μ l) 5 dk 65 C'de bekletildi. Daha sonra SDS-PAGE için hazır jel (Biorad) transfer edildi. Testis protein örnekleri poliakril amid jeline (SDS-PAGE) 80 V'de 30 dakika ve 120 V' de 1 saat yürütüldü.

4.2.4.2.3. Protein transferi ve blotlama

Poliakril amid jelde ayrıştırılan protein bantları (nitroselluloz membrana (BioRad)) Trans-BlotR Turbo™ Transfer sistemi (BioRad) kullanılarak aktarıldı. Bu işlem transfer tamponu yardımıyla (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 4 ml %10'luk SDS 1 litre içinde) 1,0 Ave 25 volt'da 30 dk süreyle uygulandı. PVDF membranı 1x TBS-T (10xTBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl, 1 ml Tween-20, 950 ml dH₂O, PH 7,6) solüsyonunda 3 kez 10'er dakika yıkandıktan sonra %5'lik yağsız süt (BioRad, Non Fat Dry Milk, ABD) (5 gr yağsız süt tozu, 50 ml TBS-T) solüsyonu içinde 55 rpm ajitasyonda yaklaşık 2 saat boyunca blotlandı.

4.2.4.2.4. Protein immüno blotlama ve görüntüleme

Birincil antikorlar Pro-Caspase-3 ve housekeeping antikor (β-Actin, son konsantrasyonu 1:1000 (1 ug/ml) ve ikincil antikorlar donkey anti-rabbit IgG 1:10000 (0,04 ug/ml) oranında blotlama solüsyonunda (%5'lik yağsız sütte) sulandırıldı. PVDF membranı 1x TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve 1 ug/ml birincil antikor solüsyonunda 50 rpm ajitasyonda gece boyunca +4 C'de inkübe edildi. Ertesi gün birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılarak membran 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandı. Blotlanan membranlar 0,1 ug/ml konsantrasyonlu ikincil antikor solüsyonu içinde 2 saat boyunca 50 rpm ajitasyonda ve oda ısısında inkübe edildi. Hedef proteinin saptanması için BioRad Clarity Western Blot Substrat kemilüminesans (Peroksidaz, Luminol ensahnsır 170-5060, ABD) solüsyonu kullanıldı. İkincil antikor solüsyonu

uzaklaştırıldıktan sonra membranlar 3 kez 10'ar dakika 1x TBS-T solüsyonu içinde yıkandı ve substrat solüsyonu (1.8 : 1.8 ml) ile ajitasyonda oda ısısında 5 dakika boyunca muamele edildi. Membranlar tarayıcı cihaz (Licor C-DiGit® Blot Scanner, ABD) ile görüntülenerek dijital ortamda kaydedildi.

4.2.5. Histopatolojik Değerlendirmeler

Bouin solusyonunda 18 saat tespit edilen dokular küçültülerek kasetlere alındı ve musluk suyunda 16 saat yıkandıktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. % 70 alkolde 1 saat
2. %80'lik alkolde 1 saat
3. %90'lık alkolde 1 saat
4. %96'lık alkolde (I ve II) 30'ar dk
5. % 100'lük alkolde bir gece
6. Ksilol (I ve II) 30'ar dk bekletildi.

Yarısı ksilol (46-48 °C) parafinde 20 dk, yumuşak parafinde (46-48 °C) 20 dk ve sert parafinde (56-58 °C) 20 dk boyunca etüvde bekletildi ve dokular parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Doku örneği kesitleri sıcak su banyosunda (48 °C) açılması sağlanarak poly-L-lysinli lamlara alındı.

Deparafinizasyon Aşaması: Poly-L-lysinli lamlara alınan kesitler sırasıyla %60, %70, %80, %90 ve %96'lık etanol (ETOH)'de 1 saat bekletildi. Daha sonra kesitler saf alkolde inkübe edildi ve arkasından yarım saat boyunca ksilen ile muamele edildi. Slaytlar etüvde 60 dk 60 °C'de bekletilerek deparafinize edildi.

Hematoksilen-Eosin Boyaması: Deparafinize slaytlar 3 kez 10 dk süreyle ksilende bekletildi. Slaytlar 3'er kez %100'lük, %95'lik ve %75'lik ETOH içinde (20-40 kez slaytlar batırılıp çıkarıldı) bekletildi ve 30-50 defa musluk suyuna daldırıldı. Hematoksilen boyamasında 5 dk bekletildi ve tekrar 30-50 defa musluk suyuna daha sonrada %95'lik ETOH e (15-20 defa) daldırıldı. Eosin boyasında 10 dk bekletildi. 2 kez %95'lik ve 3 kezde %100'lük ETOH içinde tekrar bekletilerek dokuların suyu alındı. Daha sonra 3 defa daha ksilende bekletildikten sonra (30-50 defa) slaytlara entelan damlatılıp lamel yapıştırıldı.

4.2.5.1. Histopatolojik inceleme

Testis doku kesitleri Hematoksilen-Eosin ile boyanarak dijital kameralı (NİKON 80i) ışık mikroskopuyla değerlendirildi. Mikroskopta X100'lük büyütmede germinal epitel tabakasının düzenli olup olmadığına, spermatogenesis faaliyetlerin aşamasına ve seminifer tübül çaplarına bakıldı.

4.2.5.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

4.2.5.2.1. Pro-Caspase-3 Proteininin Dokuda Gösterilmesi

Dokular çalkalayıcıda sırasıyla; %25 ve %50'lik ETOH içinde 15'er dk %75'lik ETOH ile 35 dk yıkandı. Arkasından %100'lük ETOH ile yıkama yapıldı. Tekrar %100 ETOH ile 30 dakika 25°C'de karıştırıcıda yıkama işlemi yapıldı. Bundan sonra tüpler +4°C'deki karıştırıcıya alınarak iki günde bir %100'lük ETOH ile yıkaması yapıldı. Ertesi gün plastik kaset içerisinde 20 dk boyunca 25°C'de %100 ETOH içerisinde etüvde bekletildi.

Daha sonra %100'lük Xylene dolu beherin ağzı alüminyum folyo ile kaplanarak etüvde 25°C'de 45 dk boyunca tutuldu. Kasetler parafin içine konularak %100 parafinle 65°C'de bir gece inkübe edildi. Parafin her 15 dk'da bir karıştırıldı.

Parafin içerisine gömülen dokulardan mikrorotary mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, doku kırışıklıklarını önlemek için 45°C'deki su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra poly-lysinli slaytlara alındı ve kurutuldu. Daha sonra slaytlar İHK aşamasına kadar (kaset içinde) saklandı. Lamlar, doku kırışıklıklarını kaldırmak ve doku yapışmasını artırmak için İHK aşamasından önce 65°C de 5 dk inkübe edildi.

Lamları deparafinize etmek için; her biri 3dk olacak şekilde sırasıyla ksilen, %100'lük ETOH, %75'lik ETOH ve %50'lik ETOH 2'şer kez uygulandı. Lamlar tespit solüsyonunda (90 birim %100 Methanol ile 10 birim %33'luk Hidrojen Peroksit) 25 °C'de 10 dk boyunca çalkalandı.

Antijen geri kazanım işlemi (Antijen retrieval) için lamlar %2'lik sitrik asit çözeltisi içine daldırıldı. Üzeri streç filmle kapatılan cam kaplar mikrodalgada fırında 20 dakika tutuldu. Daha sonra lamın doku dışında kalan kısmı kağıt mendille silindi ve dokunun etrafı hidrofobik kalemle çizildi böylece sıvının dışarı dağılması bariyer oluşturularak engellendi.

Üzerine % 1'lik Tris-Buffered Saline Tween (TBSTw) damlatıldı ve 25 C'de 5 dk çalkalandı. TBSTw mikropipetle çekildi ve üzerine önceden hazırlanılmış %10'luk blok RGBT (Roche Blocking Reagent) solüsyonunu ilave edilerek 25°C'de 1 saat boyunca çalkalandı. RGBT solüsyonu (10 ml %1'lik), keçi serumu (0,5 ml %5'lik), BSA (Sığır serum albümin; 0,1 g % 1'lik), 1 ml bloklama reaktifi ve 8,5 ml TBSTw ile karıştırılarak hazırlandı.

Çalkalama işleminden sonra slayt üzerindeki sıvı alındı ve tekrar TBSTw damlatılarak tekrar çalkalandı. Slayt üzerindeki TBSTw alındı, üzerine Avidin solüsyonunu damlatılarak 25°C'de 15 dakika boyunca çalkalandı. Slaytlar TBSTw ile tekrar yıkandı ve hazır Biotin solüsyonunu damlatılarak 25°C'de 15 dk boyunca çalkalandı. Temizleme işlemi tekrarlandı. Pro-Caspase-3 antikoruna katılmış RGBT (1:100 oranında) ile +4°C'de bir gece boyunca çalkalanarak bekletildi.

Slaytlar TBSTw ile 25°C'de 5'er dk süre ile 8 kez yıkandı. Dokuların 3,3' diaminobenzidine (DAB) ile boyanması için RGBT (1:250 oranda dilue edilmiş) içine biotin işaretli sekonder antikor eklendi ve 25°C'de 1 saat çalkalandı. Bu arada da avidin biotin kompleksi (ABC Kompleks) hazırlandı. Her bir lam için 100 ml TBSTw, 0.8 µl Reagent A, 0.8 ul Reagent B'den oluşan bir karışım hazırlandı. Bu ABC kompleks solusyonda 25°C'de 45 dk boyunca inkube edildikten sonra lam üzerinde sekonder antikorların temizlenmesi için TBSTw ile 25°C'de 5 dk 7 kez çalkalandı. Bu işlemler sırasında DAB solüsyonu kit protokolüne göre hazırlandı ve lamlara damlatıldı. DAB solusyonunda 1-10 dk arasında bekletildikten sonra 5dk boyunca dH₂O ile yıkandı. Slaytlar hücre çekirdeklerinin boyanması için Hematoksilen boyasına (15 sn) daldırıldı. Preperatlar ışık mikroskopuyla incelendi ve görüntüleri kayıt edildi.

4.2.6. İstatistiksel Analiz

Deneklere ait verilerin normal dağılıma uygunlukları ve varyanslarının homojenliği test edildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin logaritması alınarak dönüştürme işlemi yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanıldı. Grupların kendi aralarında karşılaştırmasında Tukey testi kullanıldı. Ayrıca sonuçlara Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Grup ortalamaları ortalama $\pm$ Standart Hata (SEM) şeklinde sunuldu ve gruplar arasındaki farklılığın önemi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Gruplar arası farklılıklar tablo ve şekiller üzerinde farklı harfler ile gösterildi. Sıçanların deney başı ve deney sonu canlı ağırlıkları ise tekrarlı örneklerde varyans analizi ile karşılaştırıldı. Verilerin analizinde SPSS istatistik programı kullanıldı (17.0).

5. BULGULAR

5.1. Klinik Bulgular

Çalışma süresince kontrol grubunda herhangi bir klinik bulguya rastlanmamıştır. İlaç uygulamalarının 3.gününde hem MTX ve hemde SLM uygulanan gruplardan MTX (1.Gün)'de 5 hayvanda ve MTX (1.Gün)+SLM'de 2 hayvanda diyare görüldü. Diyare bir gün sonra durdu ve hayvanların genel durumlarının iyileştiği kaydedildi. Ayrıca çalışmanın 5. gününde MTX (1.Gün)+ SLM grubunda bir adet ve SLM grubunda ise iki adet sıçanın öldüğü görüldü.

5.2. Canlı Ağırlıkların Değerlendirilmesi

Kontrol grubundaki sıçanların deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

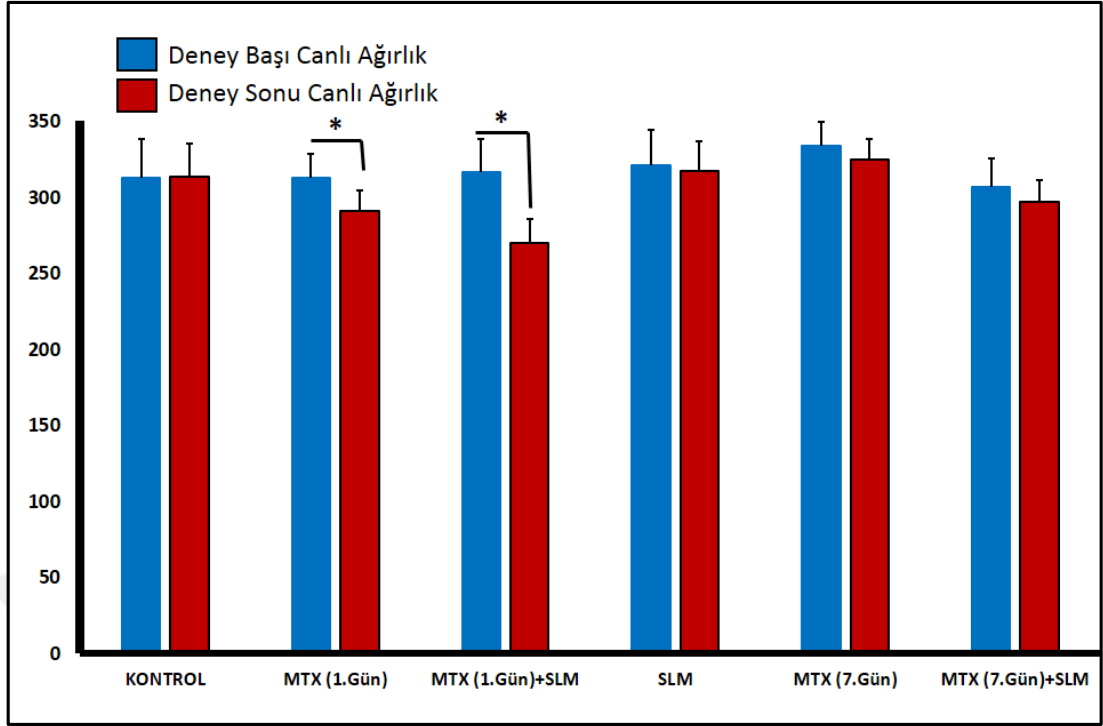
Metotreksat (MTX (1.Gün)) grubundaki sıçanların deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları arasında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$).

Metotreksat+Silimarin uygulanan (MTX (1.Gün)+SLM) sıçanlarda deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları arasında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$).

Silimarin uygulanan gruptaki sıçanların (SLM) deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Metotreksat uygulanan gruptaki sıçanların (MTX (7.Gün)) deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Metotreksat+Silimarin uygulanan grupta (MTX (7.Gün)+SLM) deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$, Şekil 4).



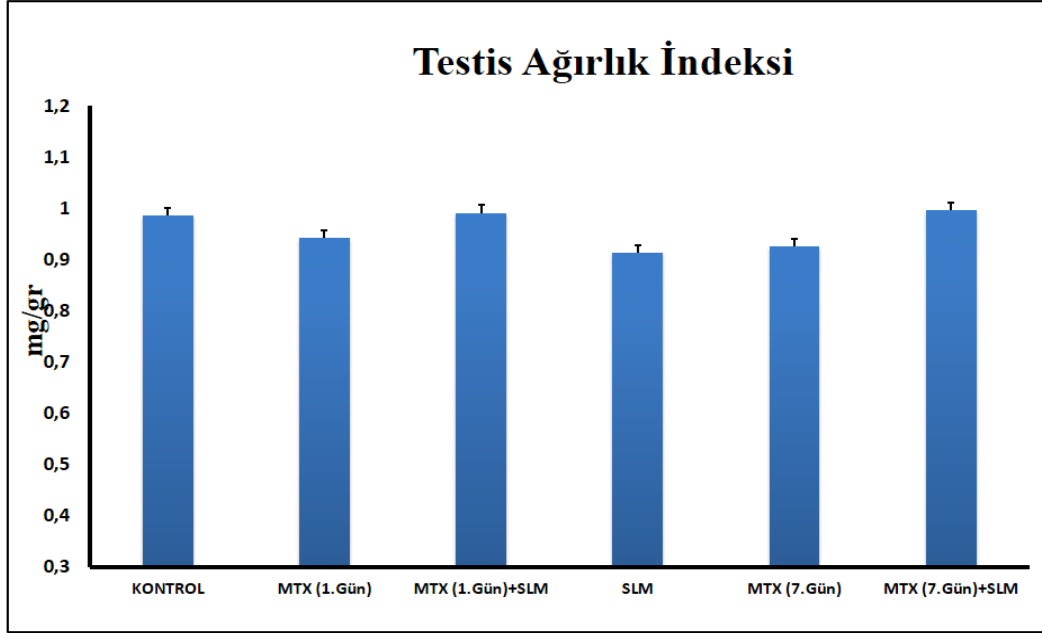
Şekil 4. Deney başı ve deney sonu sıçanların canlı ağırlık değişimi.* $p<0.05$ deney öncesi değerlerle karşılaştırıldığında. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

Tablo 2. Deney başı ve sonunda gruptaki canlı ağırlık değişimlerini gösteren tablo. Ortalama $\pm$ SEM değerini belirtmektedir. İstatistiksel hesaplamalarda tekrarlı örneklerde varyans analizi kullanıldı. Aynı sütunda farklı harf (^{a,b}) taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

GRUPLAR	Kontrol	MTX (1.Gün)	MTX (1.Gün)+SLM	SLM	MTX (7.Gün)	MTX (7.Gün)+SLM
Deney Başı Canlı Ağırlık(gr)	312,57±25,49	312,50±15,77 ^a	316,25±21,75 ^a	320,71±23,86	333,75±15,66	306,88±18,58
Deney Sonu Canlı Ağırlık(gr)	313,71±21,75	290,75±13,54 ^b	270,25±15,36 ^b	317,40±19,71	324,50±13,71	296,75±14,75

5.3. Testis Ağırlık İndeksi

Gruplar arasında testis ağırlık indeksi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$, Şekil 5).



Şekil 5. Testis ağırlık indeksi değerleri. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n:8).

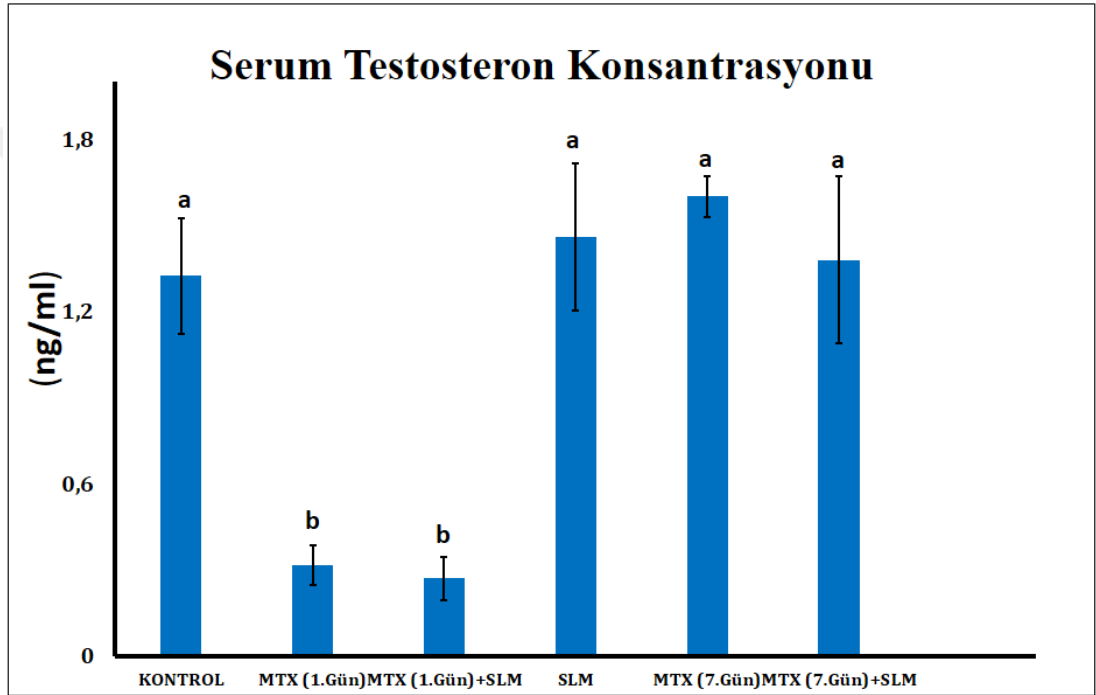
Tablo 3. Testis ağırlık indeksi değerleri. Ortalama $\pm$ SEM değerini belirtmektedir. İstatistiksel hesaplamalarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı.

Gruplar	Testis ağırlık indeksi(gr)
Kontrol	0,98±0,10
MTX (1.Gün)	0,94±0,08
MTX (1.Gün)+SLM	0,99±0,10
SLM	0,91±0,08
MTX (7.Gün)	0,92±0,08
MTX (7.Gün)+SLM	0,99±0,09

5.4. Serum Biyokimya Değerleri

5.4.1. Serum Testosteron Konsantrasyonu

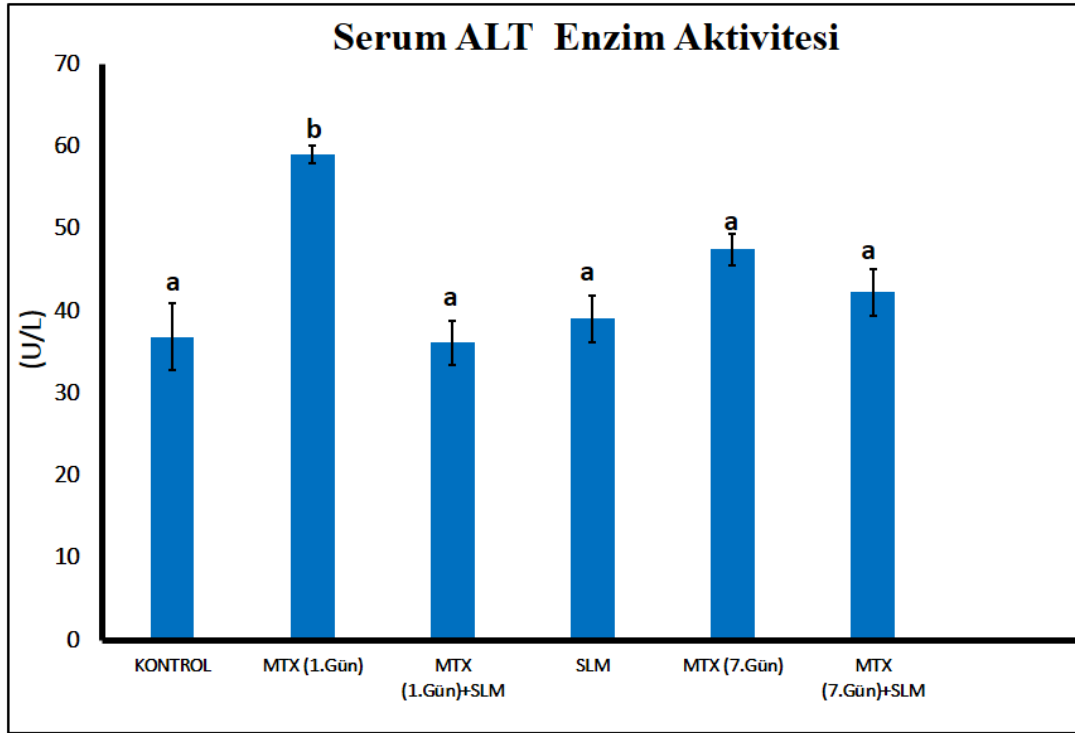
Serum testosteron konsantrasyonu bakımından gruplar arasındaki yapılan ikili karşılaştırmalar da hem MTX (1.Gün) hem de MTX (1.Gün)+SLM grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 6).



Şekil 6. Serum testosteron değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.4.2. Serum Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesi

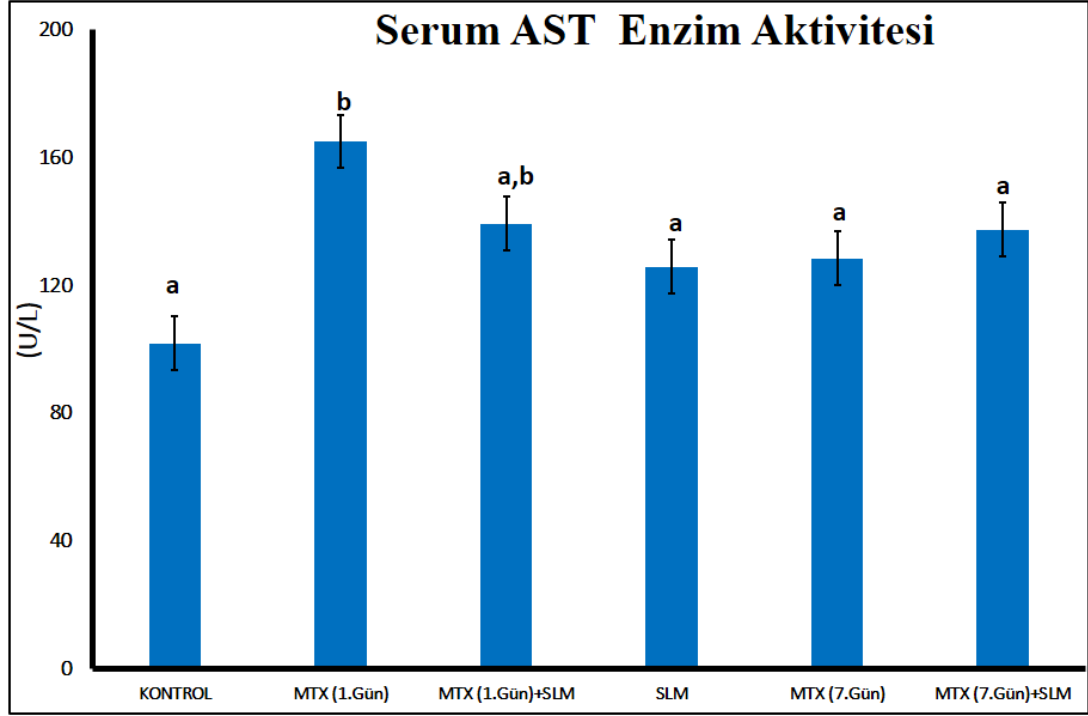
MTX (1.Gün) grubundaki ALT enzim aktivitesinin kontrol ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM grupları ile kontrol grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir ($p>0.05$, Şekil 7).



Şekil 7. Serum ALT değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir($p<0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.4.3. Serum Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesi

Gruplar arasında serum AST değerlerine bakıldığında kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). MTX (1.Gün)+SLM, MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+ SLM grupları ile kontrol grubu kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$, Şekil 8).



Şekil 8. Serum AST değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p<0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

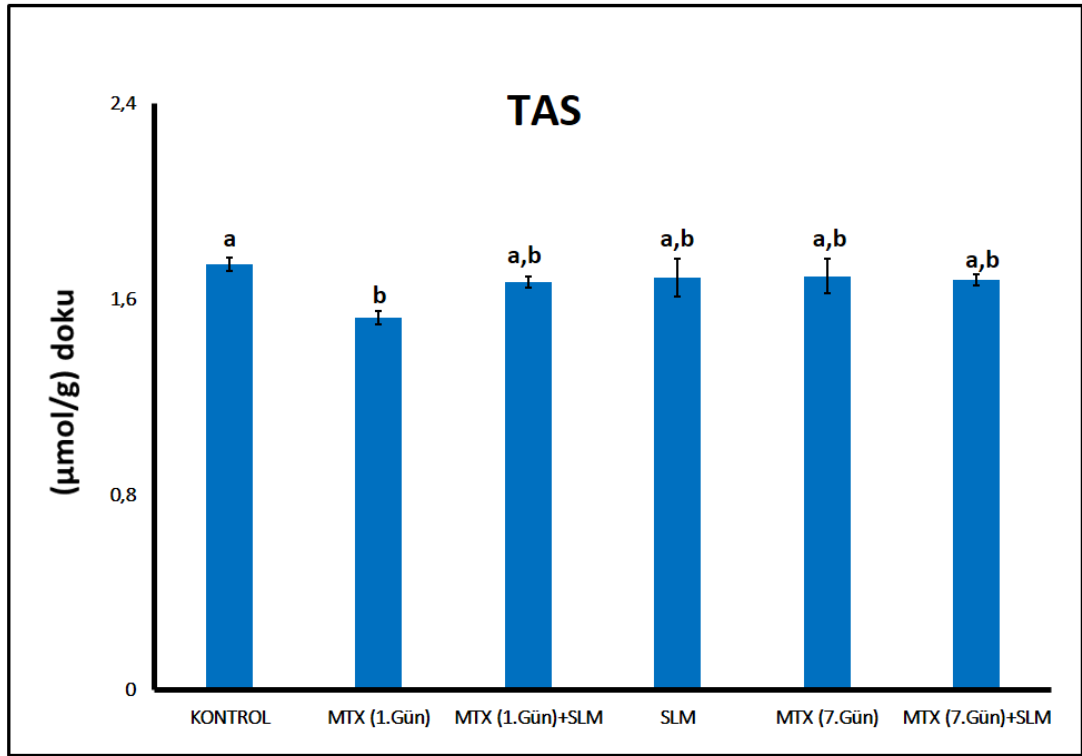
Tablo 4. Serum ALT, AST Aktiviteleri ve Testosteron Seviyesi. Ortalama $\pm$ SEM değerini belirtmektedir. Aynı satırda farklı harf (^{a,b}) taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). İstatistiksel hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı.

Gruplar	Kontrol	MTX (1.Gün)	MTX (1.Gün)+ SLM	SLM	MTX (7.Gün)	MTX (7.Gün)+ SLM
ALT (U/L)	36,85 $\pm$ 4,04 ^a	59,02 $\pm$ 1,09 ^b	36,11 $\pm$ 2,72 ^a	39,02 $\pm$ 2,83 ^a	47,45 $\pm$ 1,91 ^a	42,3 $\pm$ 2,83 ^a
AST (U/L)	101,77 $\pm$ 8,27 ^a	164,88 $\pm$ 11,24 ^b	139,24 $\pm$ 24,01 ^{a,b}	125,7 $\pm$ 5,35 ^a	128,33 $\pm$ 9,00 ^a	137,24 $\pm$ 8,93 ^a
Testosteron (ng/mL)	1,32 $\pm$ 0,20 ^a	0,31 $\pm$ 0,06 ^b	0,27 $\pm$ 0,07 ^b	1,46 $\pm$ 0,25 ^a	1,6 $\pm$ 0,07 ^a	1,37 $\pm$ 0,29 ^a

5.5. Testis Dokusundaki TAS, TOS, OSI, MDA, CAT, SOD Değerleri

5.5.1. Testis Dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

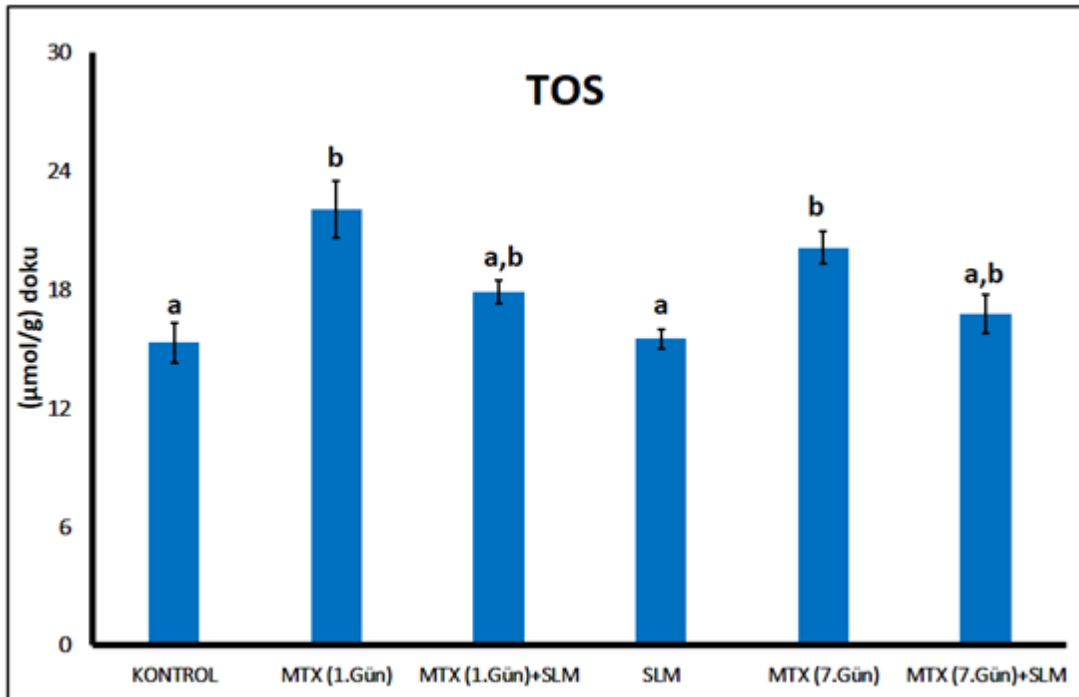
Total antioksidan seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece MTX (1.Gün) grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı ($p < 0.05$); MTX (1.Gün) + SLM, MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+ SLM gruplarında ise sayısal olarak azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$, Şekil 9).



Şekil 9. Testis dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS) değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

5.5.2. Total Oksidan Seviyesi(TOS)

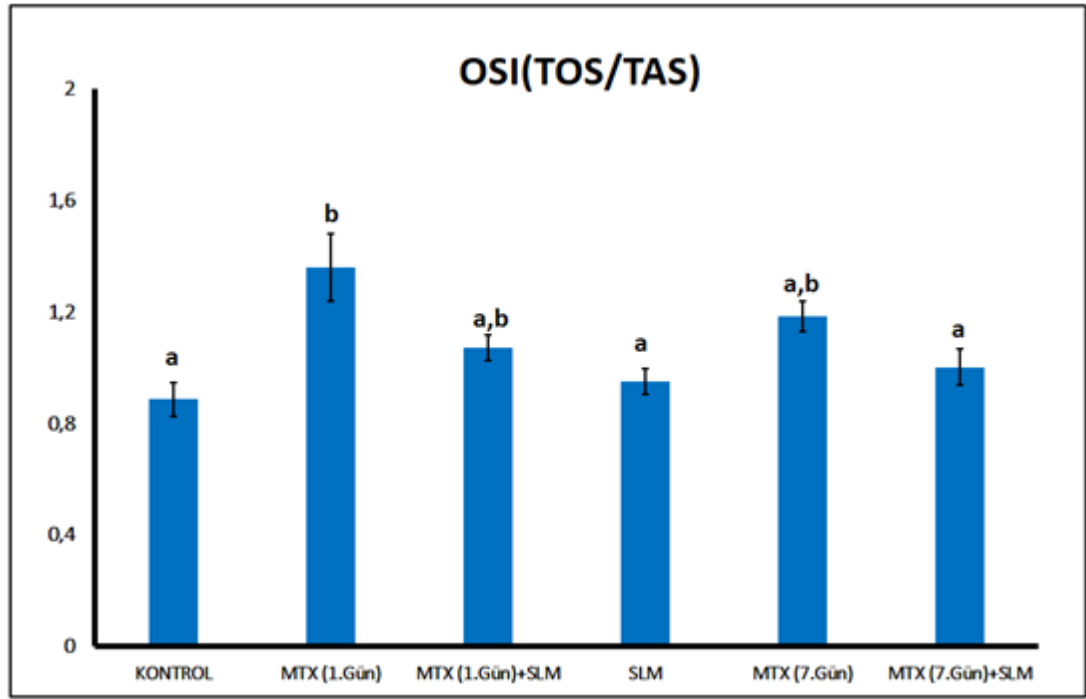
Total oksidan seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında MTX (1.Gün) ve MTX (7.Gün) gruplarında önemli ölçüde arttığı ($p < 0.05$); MTX (1.Gün) + SLM ve MTX (7.Gün)+ SLM grubunda ise sayısal olarak artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$, Şekil 10).



Şekil 10. Testis dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.5.3. Testis Dokusunda Oksidatif Stres İndeksi (OSI: TOS / TAS)

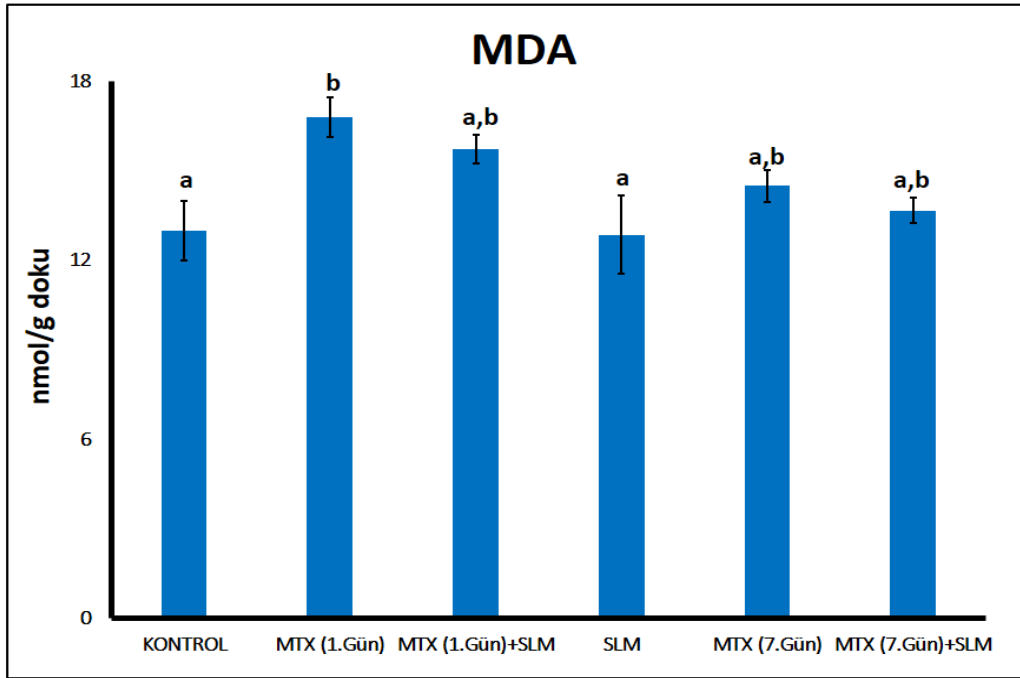
Oksidatif stres indeksi kontrol grubu ile kıyaslandığında MTX (1.Gün) ve MTX (7.Gün) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). MTX (1.Gün) + SLM ve MTX (7.Gün) + SLM grubunda ise kontrol grubuna göre sayısal olarak artmasına rağmen OSI seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 11).



Şekil 11. Testis dokusu Oksidatif Stres İndeksi (OSI) [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

5.5.4. Testis Dokusu Malondialdehit (MDA)Seviyesi

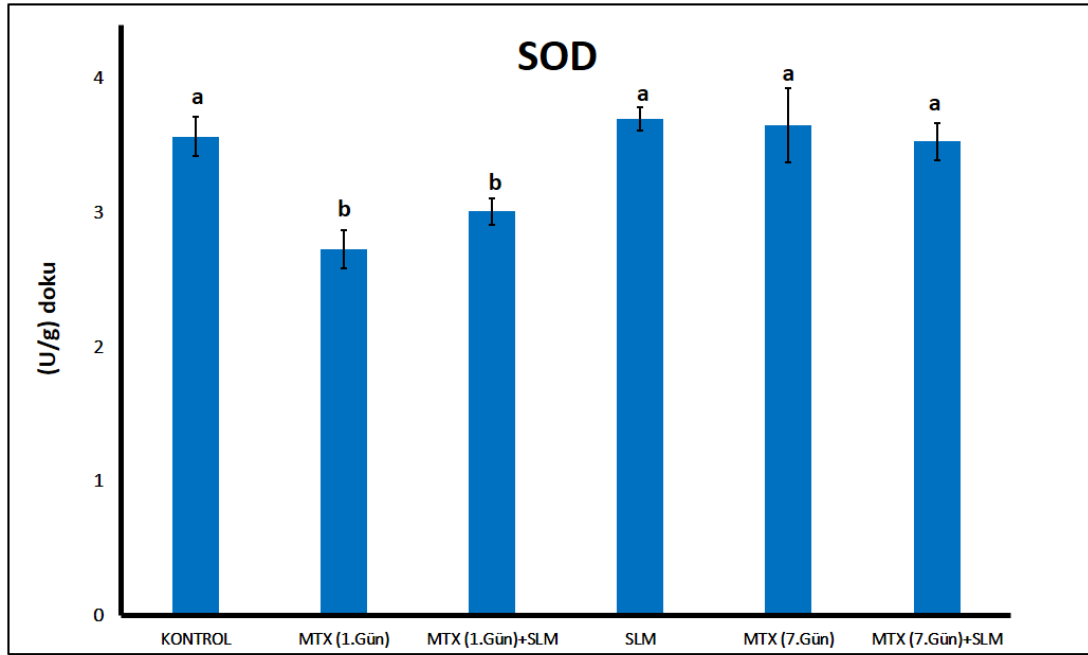
Malondialdehit seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece MTX (1.Gün) grubunda anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.05$). MTX (1.Gün) + SLM, MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+ SLM gruplarındaki MDA seviyesi kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$, Şekil 12).



Şekil 12. Testis dokusu Malondialdehit (MDA) değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.5.5. Testis Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD)Seviyesi

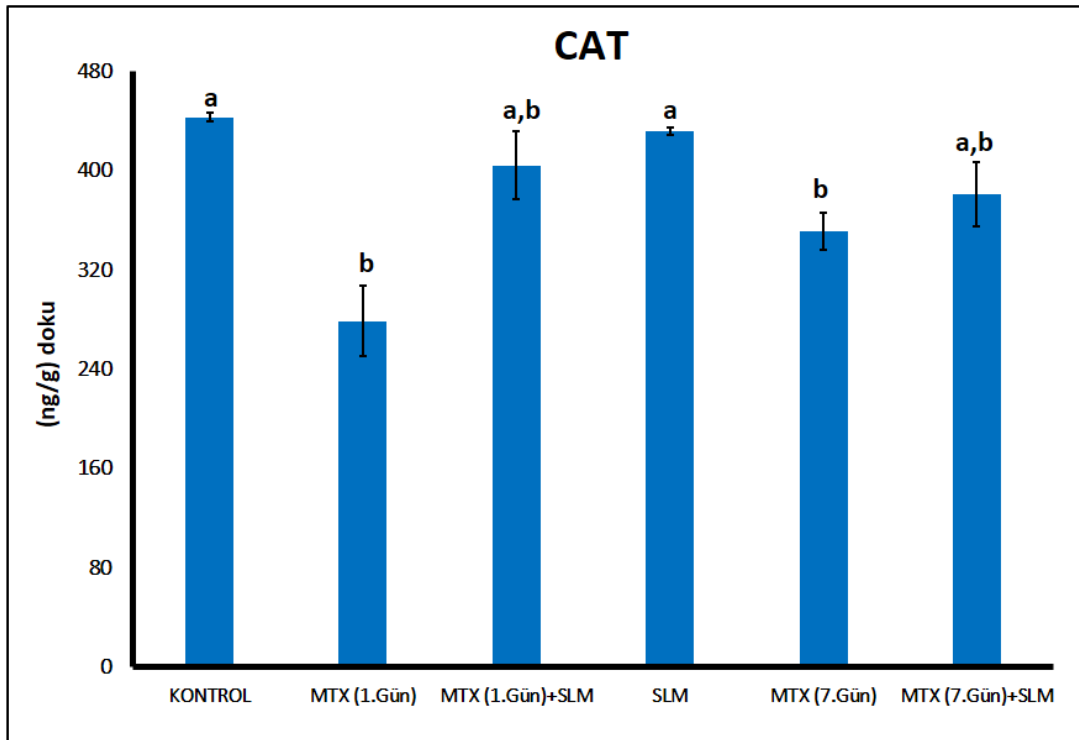
Süperoksit dismutaz seviyesinin değişimi elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu ile kıyaslandığında MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün) + SLM grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$). Diğer gruplar ise kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 13).



Şekil 13. Testis dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.5.6. Testis Dokusu Katalaz (CAT) Seviyesi

Kontrol grubu ile kıyaslandığında MTX (1.Gün) ve MTX (7.Gün) grubunda CAT seviyesinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). MTX (1.Gün) + SLM ve MTX (7.Gün)+ SLM gruplarında ise kontrol grubuna göre sayısal olarak katalaz seviyesi azalmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$, Şekil 14).



Şekil 14. Testis dokusu katalaz (CAT) değerleri [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

Tablo 5. Testis dokusunda bazı oksidan ve antioksidan parametreleri. Ortalama $\pm$ SEM değerini belirtmektedir. Aynı satırda farklı harf (^{a,b,c}) taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). İstatistiksel hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı.

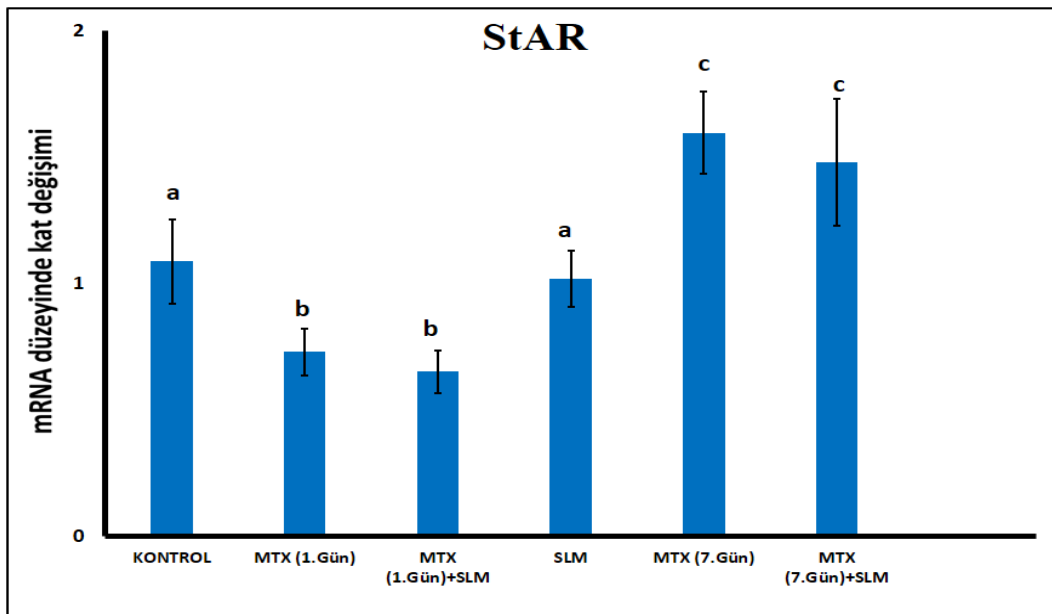
Gruplar	Kontrol	MTX (1.Gün)	MTX (1.Gün)+ SLM	SLM	1G MTX	MTX (7.Gün)+ SLM
CAT (ng/g)	443,00 $\pm$ 3,73 ^a	278,40 $\pm$ 28,31 ^b	403,89 $\pm$ 27,40 ^a	431,47 $\pm$ 3,24 ^a	351,28 $\pm$ 14,87 ^b	381,19 $\pm$ 26,01 ^{a,b}
MDA (ng/g)	12,98 $\pm$ 0,99 ^a	16,80 $\pm$ 0,66 ^b	15,74 $\pm$ 0,48 ^{a,b}	12,85 $\pm$ 1,31 ^a	14,49 $\pm$ 0,53 ^{a,b}	13,67 $\pm$ 0,43 ^{a,b}
SOD (U/g)	3,57 $\pm$ 0,15 ^a	2,73 $\pm$ 0,14 ^b	3,01 $\pm$ 0,10 ^b	3,70 $\pm$ 0,09 ^a	3,65 $\pm$ 0,28 ^a	3,53 $\pm$ 0,14 ^a
TAS (mmol/g)	1,74 $\pm$ 0,03 ^a	1,52 $\pm$ 0,03 ^b	1,67 $\pm$ 0,02 ^{a,b}	1,69 $\pm$ 0,08 ^{a,b}	1,69 $\pm$ 0,07 ^{a,b}	1,68 $\pm$ 0,02 ^{a,b}
TOS (μ mol/g)	15,34 $\pm$ 1,01 ^a	22,09 $\pm$ 1,44 ^b	17,88 $\pm$ 0,59 ^{a,b}	15,51 $\pm$ 0,49 ^a	20,14 $\pm$ 0,82 ^b	16,78 $\pm$ 0,98 ^{a,b}
OSI(TOS/TAS)	0,886 $\pm$ 0,062 ^a	1,358 $\pm$ 0,121 ^b	1,73 $\pm$ 0,047 ^{a,b}	0,952 $\pm$ 0,045 ^a	1,183 $\pm$ 0,054 ^{a,b}	1,02 $\pm$ 0,064 ^a

5.6. Moleküler Bulgular

5.6.1 Steroidogenezis, Apoptozis ve Antioksidanlar ile İlgili Genlerin mRNA Düzeyindeki RT-PZR Analizleri

5.6.1.1. Testis Dokusu Steroidogenezis Akut Düzenleyici Protein (StAR) Gen Ekspresyonu

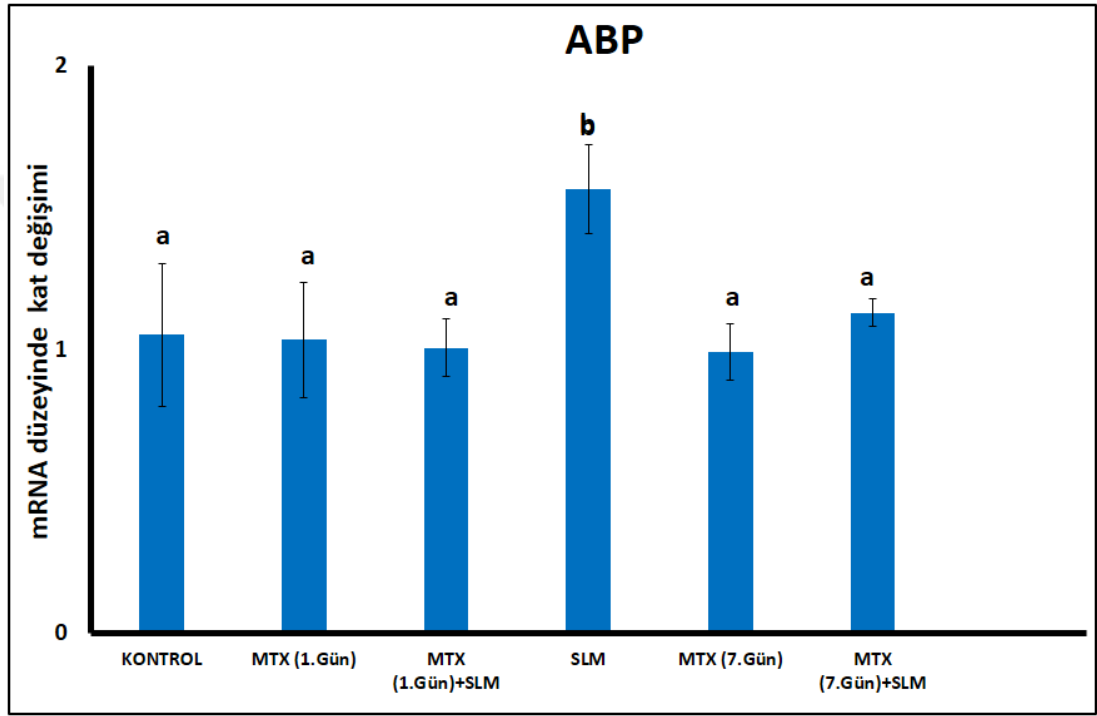
Stereogenesis yolunda önemli bir taşıyıcı protein olan StAR'ın gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre hem MTX (1.Gün) hem de MTX (1.Gün)+SLM de StAR ekspresyonun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$). SLM grubunda ise StAR ekspresyonu kontrol grubuna göre benzerdir. Diğer gruplar kontrol grubuna ile kıyaslandığında MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM uygulamasının StAR mRNA ekspresyonunun anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$, Şekil 15).



Şekil 15. Testis dokusunda steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b, c farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

5.6.1.2. Testis Dokusu Androjen Bağlayıcı Protein(ABP) Gen Ekspresyonu

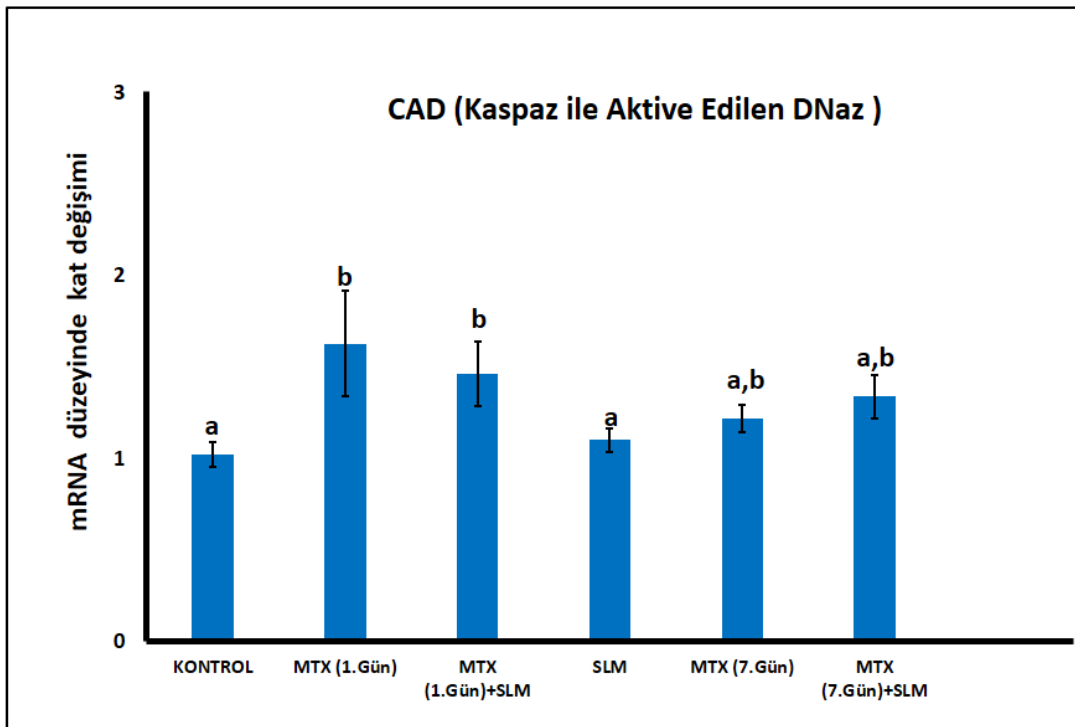
Sertoli hücrelerinde testosteron bağlanmasından sorumlu önemli bir glikoprotein olan ABP'nin gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre sadece SLM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma görülürken, diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$, Şekil 16).



Şekil 16. Testis dokusunda androjen bağlayıcı proteinin (ABP)mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

5.6.1.3. Kaspaz ile Aktive Edilen DNaz (CAD) Gen Ekspresyonu

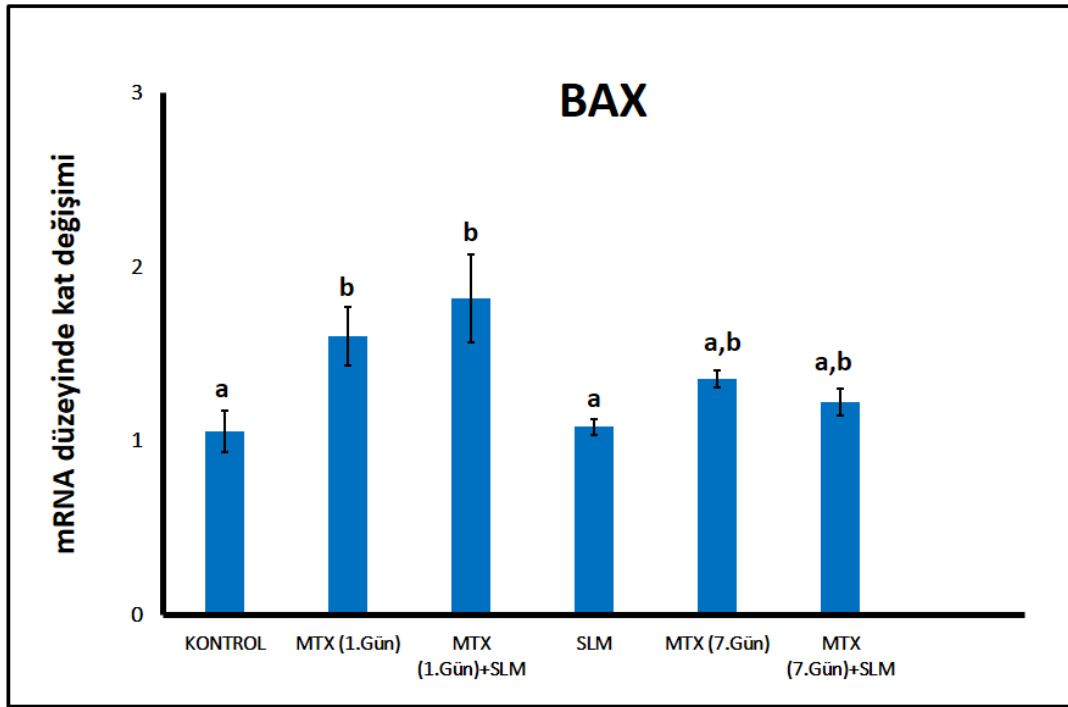
Caspase-activated DNase (CAD) gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün) + SLM gruplarında CAD gen ifadesinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM gruplarında kontrol grubuna göre gen ifadesinde artış gözlenmesine rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 17).



Şekil 17.. Testis dokusunda Caspase-activated DNase (CAD) mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.6.1.4. Testis Dokusunda Bcl-2 İlişkili X (BAX) Gen Ekspresyonu

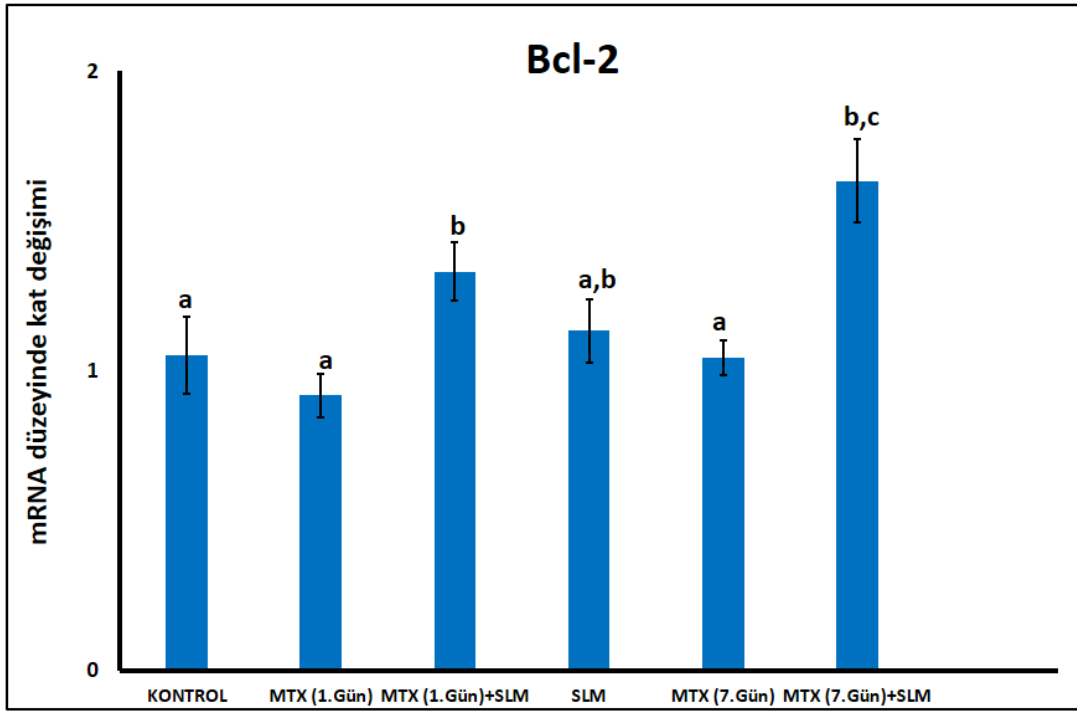
Pro-apoptotik bir protein olan BAX'ın gen ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün) + SLM gruplarında anlamlı artış görülmüştür ($p < 0.05$). MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM gruplarında ise kontrol grubuna göre gen ifadesinde artış gözlenmesine rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 18).



Şekil 18. Testis dokusu Bcl-2 ilişkili X'in (BAX) mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.6.1.5. Testis dokusu Bcl-2 Gen Ekspresyonu

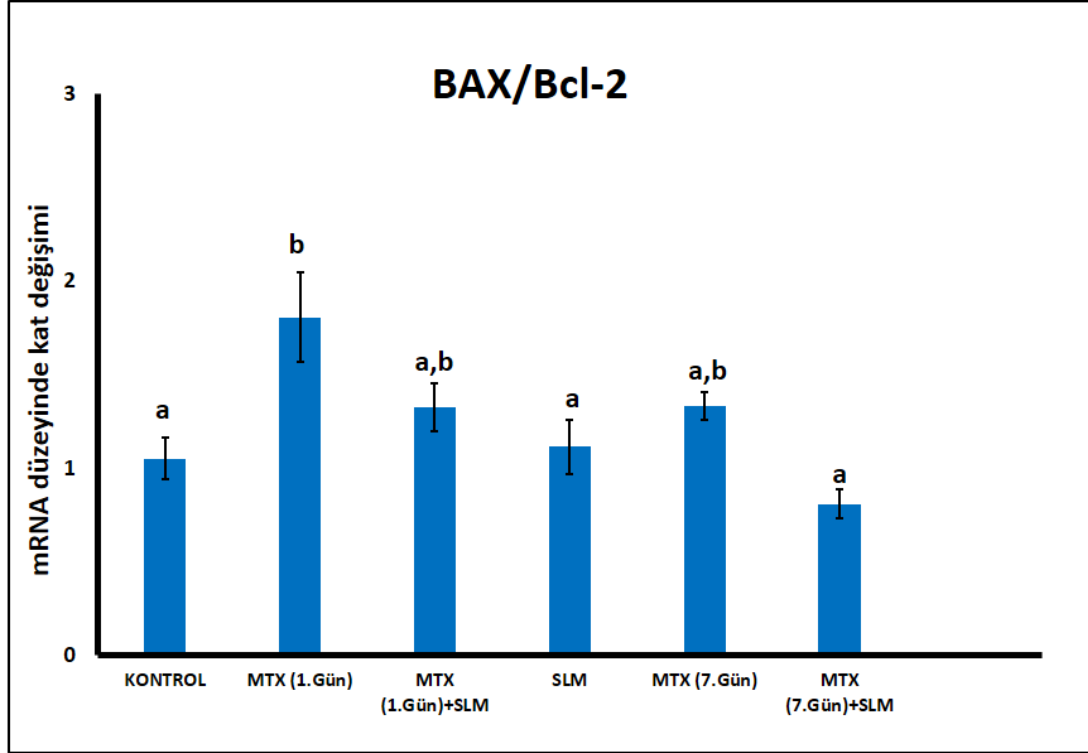
Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) + SLM ve MTX (7.Gün)+SLM gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0.05$). Kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) grubunda sayısal olarak Bcl-2 gen ekspresyonu azalmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 19).



Şekil 19. Testis dokusu Bcl-2 mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b, c farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.6.1.6. Testis Dokusu Bax/Bcl-2 Gen Ekspresyon Oranı

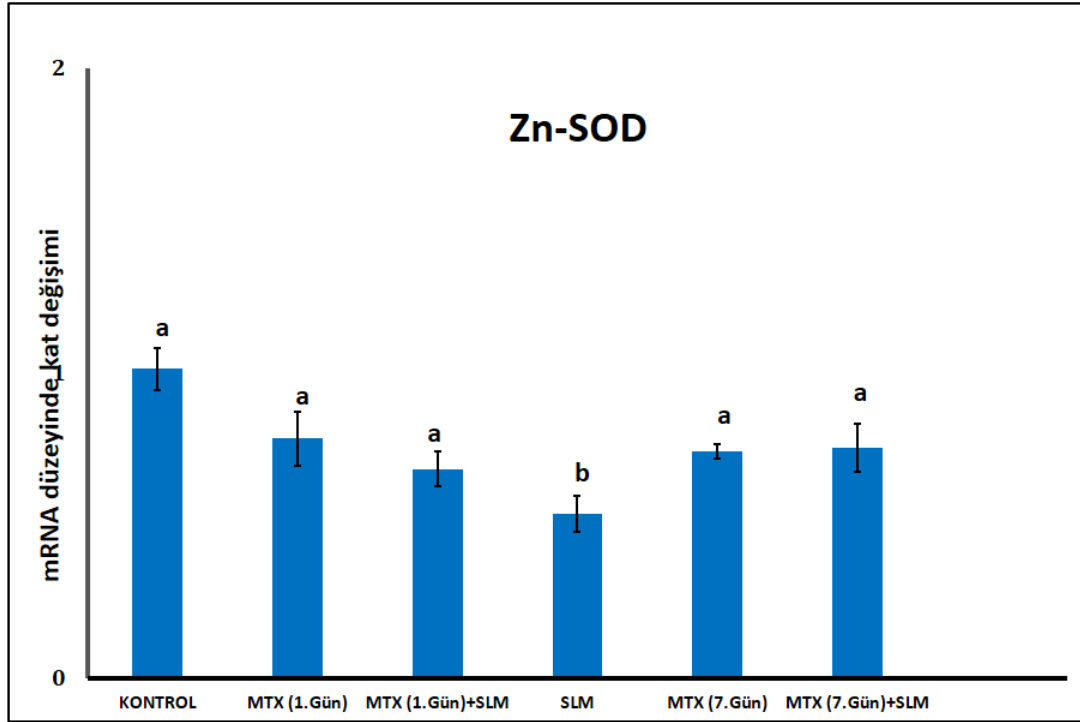
Apoptozis belirteci Bax ve Antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) grubunda anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0.05$). Kontrol grubuna göre diğer MTX uygulanan gruplarda sayısal artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$, Şekil 20).



Şekil 20. Testis dokusu Bax/Bcl-2 gen ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.6.1.7. Testis dokusu Çinko-Süperoksit Dismutaz (Zn-SOD) Gen Ekspresyonu

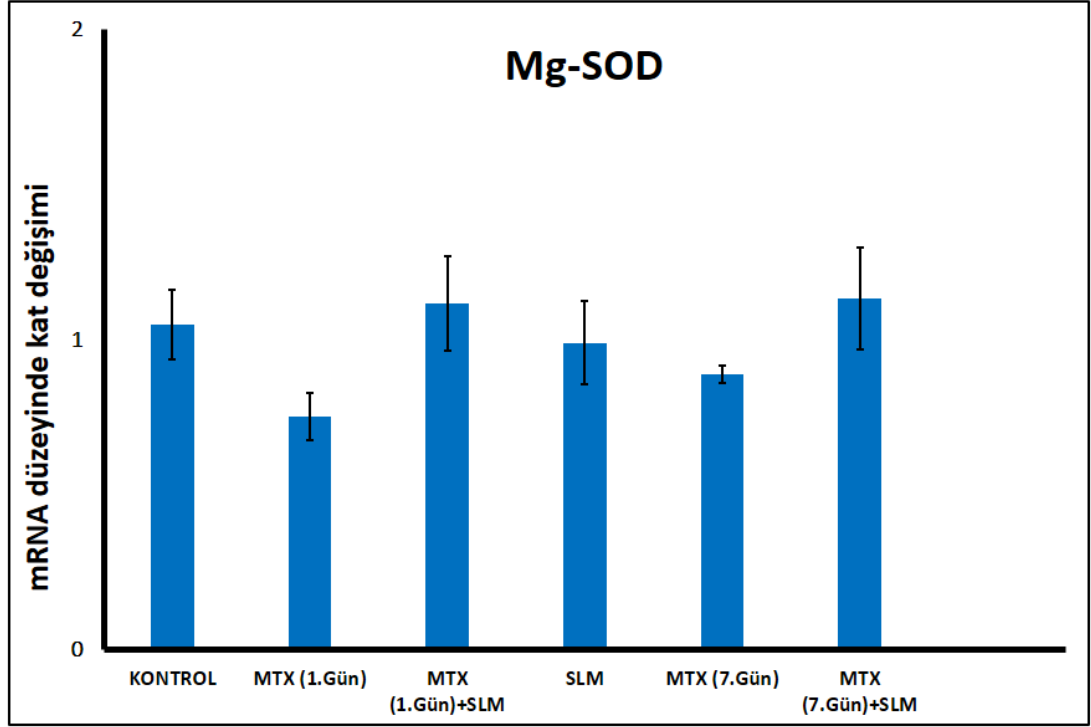
Antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimi olan Zn-SOD'ın gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre SLM grubunda anlamlı bir azalma görülürken ($p < 0.05$); SLM grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında diğer gruplardaki azalmanın SLM grubuna göre anlamsız olduğu görülmüştür ($p > 0.05$, Şekil 21).



Şekil 21. Testis dokusu Çinko-süperoksit dismutaz (Zn_SOD) mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.6.1.8. Testis dokusu Magnezyum-Süperoksit Dismutaz (Mg-SOD) gen ekspresyonu

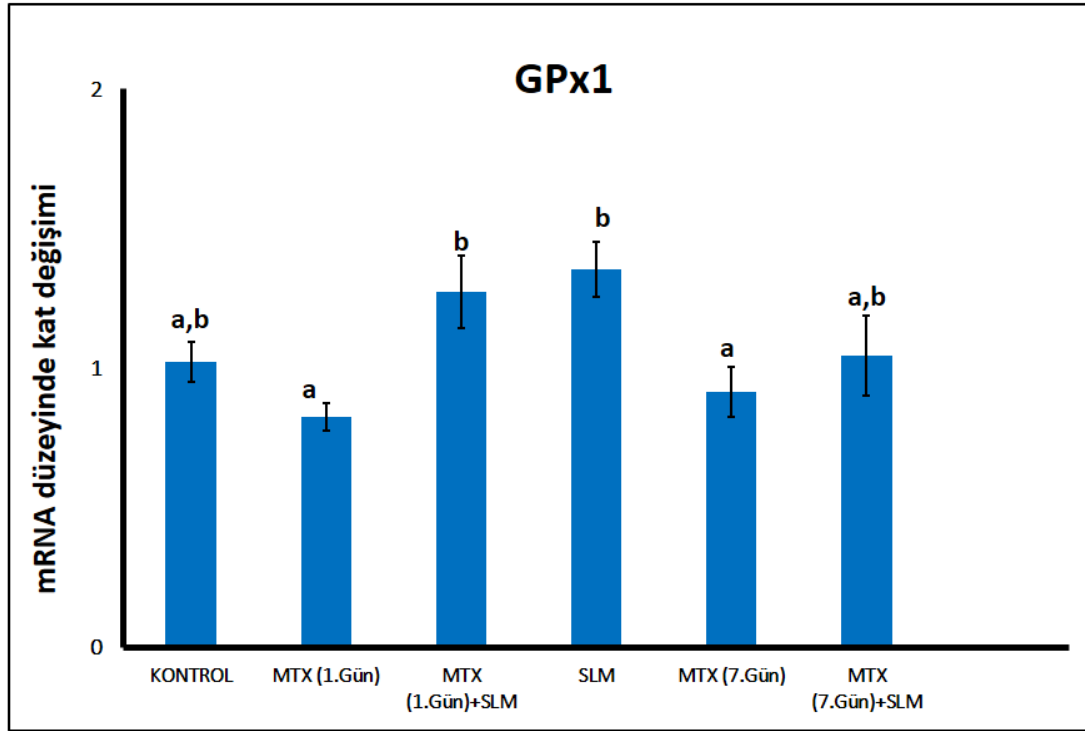
Antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimi olan Mg-SOD'un gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) ve MTX (7.Gün) gruplarında sayısal olarak azalma olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$, Şekil 22).



Şekil 22. Testis dokusu Magnezyum-süperoksit dismutaz (Mg_SOD) mRNA ekspresyonu. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8). .

5.6.1.9. Testis dokusu Glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) Gen Ekspresyonu

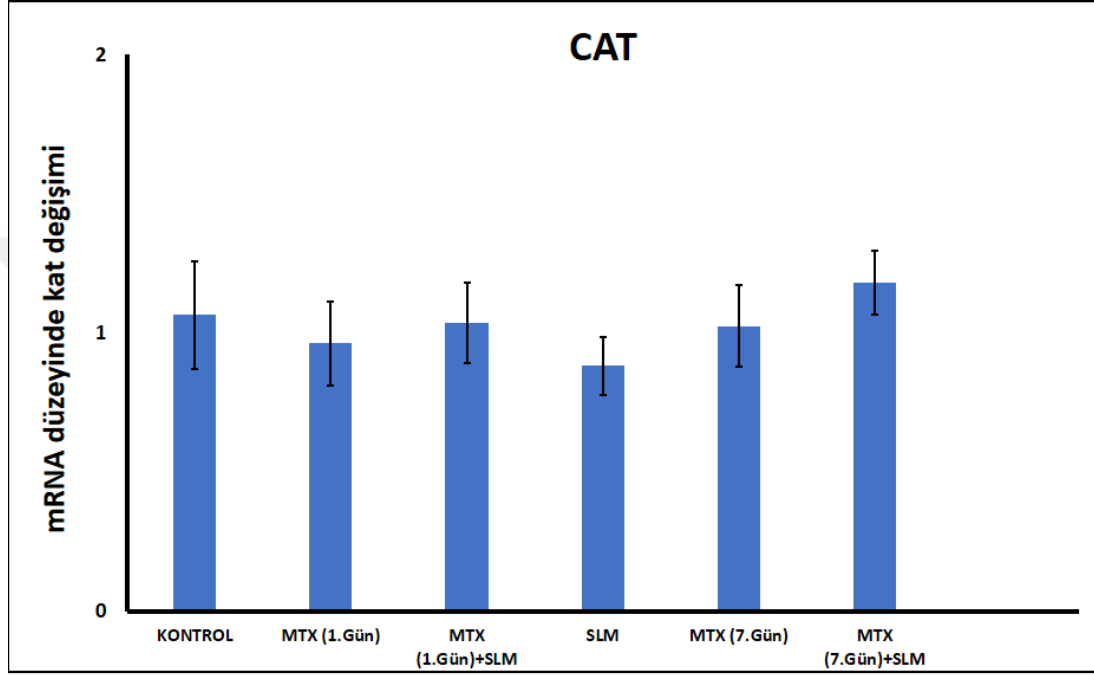
Antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimi olan GPx1'in gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde MTX (1.Gün)+SLM ve SLM gruplarının MTX (1.Gün) grubuyla kıyaslandığında anlamlı artış bir olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Diğer gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında ise benzer olduğu görülmüştür ($p > 0.05$, Şekil 23).



Şekil 23. Testis dokusu Glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) mRNA ekspresyonu [Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandı ve a, b farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)]. Kontrol: kontrol grubu ($n=7$), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu ($n=8$), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=6$). SLM: silimarin grubu ($n=5$), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu ($n=8$) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu ($n=8$).

5.6.1.10. Testis Dokusu Katalaz (CAT) Gen Ekspresyonu

Antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimi olan CAT'ın gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde ise gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir ($p>0.05$, Şekil 24).



Şekil 24. Testis dokusu Katalaz (CAT) mRNA ekspresyonu. Kontrol: kontrol grubu (n=7), MTX (1.Gün): 1.gün metotreksat grubu (n=8), MTX (1.Gün)+SLM: 1.gün metotreksat+silimarin grubu (n=6). SLM: silimarin grubu (n=5), MTX (7.Gün): 7.gün metotreksat grubu (n=8) ve MTX (7.Gün)+SLM: 7.gün metotreksat+silimarin grubu (n=8).

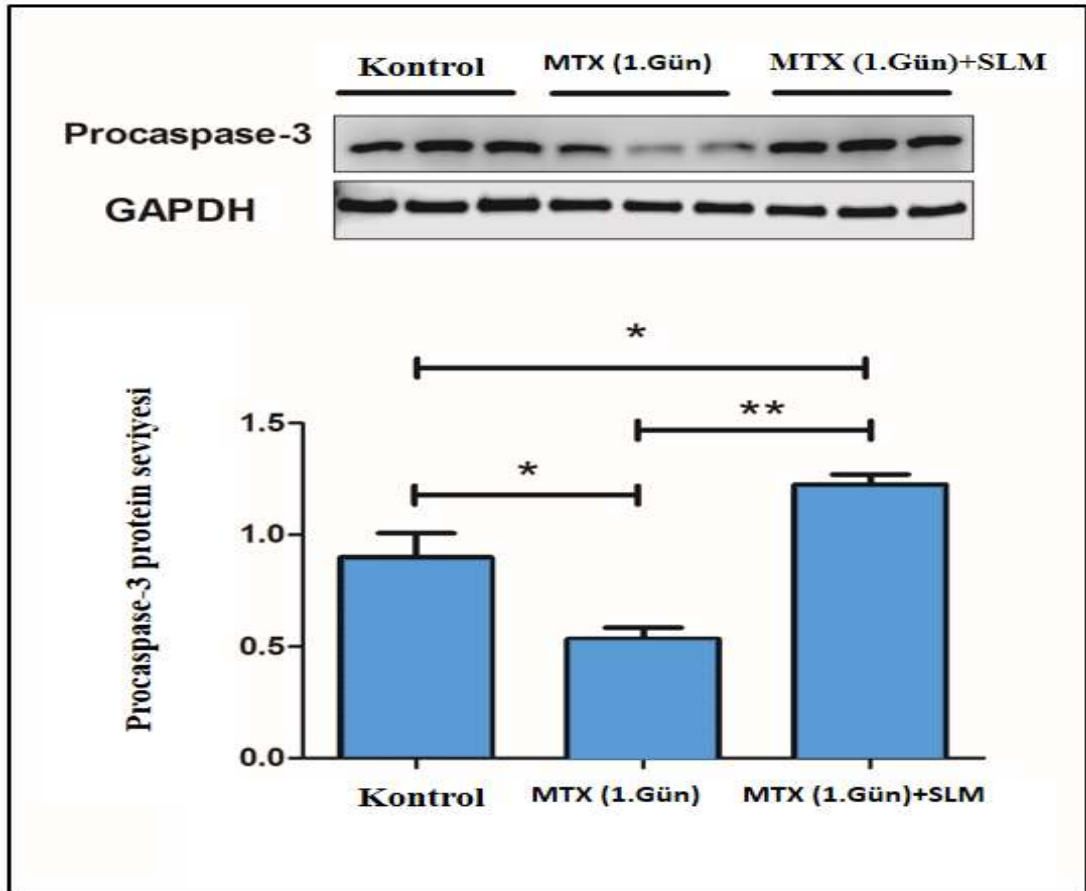
Tablo 6. Steroidogenezis, Apoptozis ve Antioksidan ile ilgili genlerin mRNA düzeyindeki RT-PZR analiz sonuçları. Ortalama $\pm$ SEM değerini belirtmektedir. Aynı satırda farklı harf (^{a,b,c}) taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). İstatistiksel hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı.

GRUPLAR GENLER	Kontrol	MTX (1.Gün)	MTX (1.Gün)+SLM	SLM	MTX (7.Gün)	MTX (7.Gün)+SLM
StAR	1,08 $\pm$ 0,16 ^a	0,72 $\pm$ 0,09 ^b	0,65 $\pm$ 0,08 ^b	1,01 $\pm$ 0,11 ^a	1,59 $\pm$ 0,16 ^c	1,47 $\pm$ 0,25 ^c
ABP	1,05 $\pm$ 0,25 ^a	1,03 $\pm$ 0,20 ^a	1,00 $\pm$ 0,10 ^a	1,56 $\pm$ 0,15 ^b	0,98 $\pm$ 0,09 ^a	1,12 $\pm$ 0,04 ^a
BAX	1,05 $\pm$ 0,11 ^a	1,60 $\pm$ 0,16 ^b	1,81 $\pm$ 0,25 ^b	1,08 $\pm$ 0,04 ^a	1,35 $\pm$ 0,14 ^a	1,22 $\pm$ 0,17 ^a
Bcl-2	1,05 $\pm$ 0,12 ^a	0,91 $\pm$ 0,07 ^a	1,33 $\pm$ 0,09 ^b	1,13 $\pm$ 0,10 ^{a,b}	1,04 $\pm$ 0,05 ^a	1,63 $\pm$ 0,13 ^{b,c}
Bax/Bcl-2	1,05 $\pm$ 0,11 ^a	1,80 $\pm$ 0,24 ^b	1,32 $\pm$ 0,13 ^{a,b}	1,11 $\pm$ 0,15 ^a	1,32 $\pm$ 0,7 ^{a,b}	0,80 $\pm$ 0,8 ^a
CAD	1,01 $\pm$ 0,06 ^a	1,62 $\pm$ 0,28 ^b	1,46 $\pm$ 0,17 ^b	1,09 $\pm$ 0,06 ^a	1,21 $\pm$ 0,07 ^{a,b}	1,33 $\pm$ 0,11 ^{a,b}
CAT	1,06 $\pm$ 0,19	0,96 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,14	1,18 $\pm$ 0,11
Mg-SOD	1,04 $\pm$ 0,11	0,75 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,16
GPx1	1,02 $\pm$ 0,07 ^{a,c}	0,82 $\pm$ 0,05 ^a	1,27 $\pm$ 0,12 ^{b,c}	1,35 $\pm$ 0,09 ^{b,c}	0,91 $\pm$ 0,09 ^{a,c}	1,04 $\pm$ 0,14 ^{a,c}
Zn-SOD	1,01 $\pm$ 0,06 ^a	0,78 $\pm$ 0,08 ^a	0,68 $\pm$ 0,05 ^a	0,53 $\pm$ 0,05 ^b	0,74 $\pm$ 0,02 ^a	0,75 $\pm$ 0,07 ^a

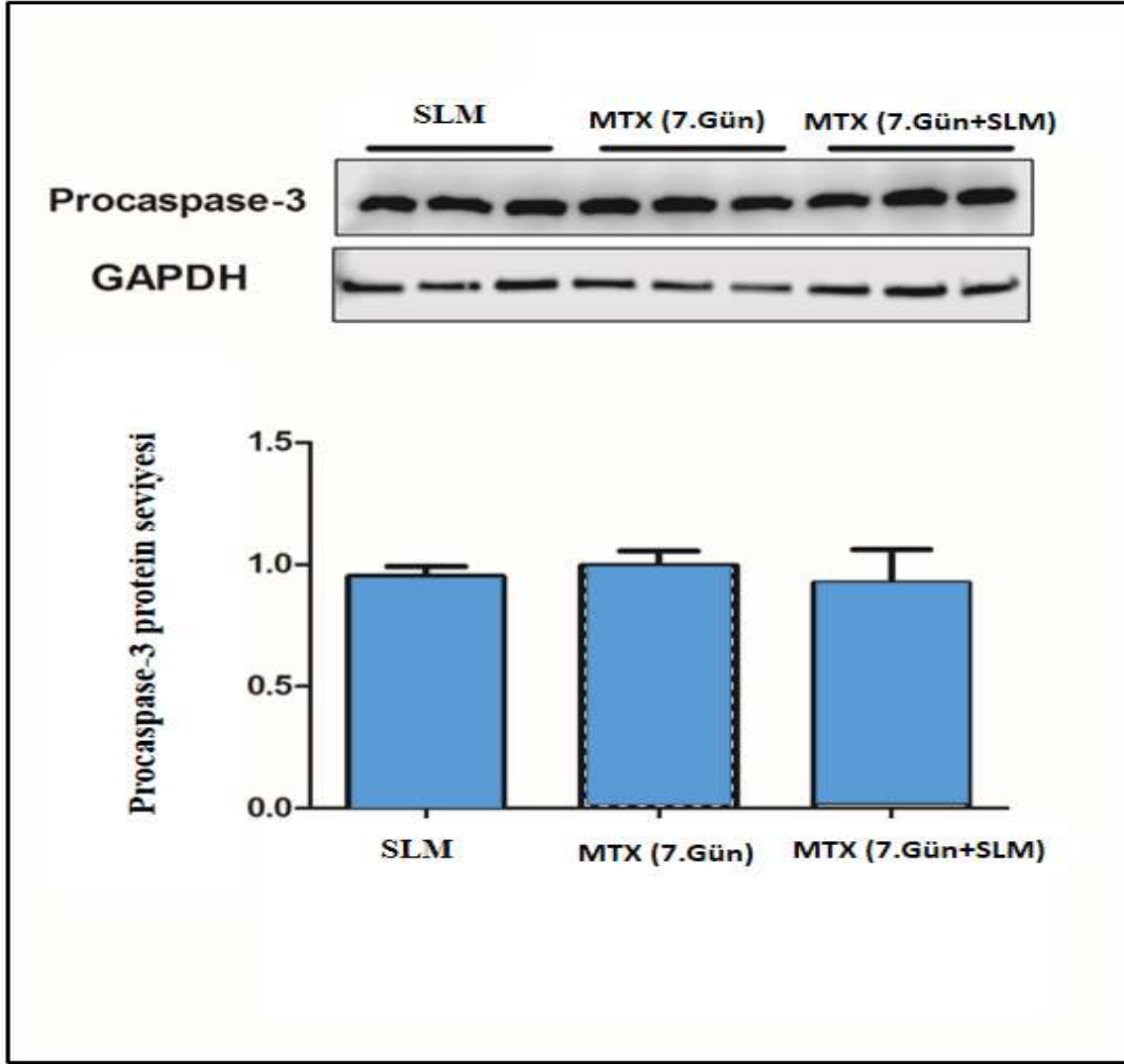
5.6.2. Pro-Caspase-3 Protein Miktarının Değerlendirilmesi

Pro-Caspase-3 protein seviyesinin gruplar arası farklılıklarının belirlenmesi için membran üzerinde her bir gruba ait protein bantlarının alanı Image Studio™ Lite (version 5.0) ile ölçülerek protein miktarı belirlendi. Housekeeping (gruplar arasında değişmediği düşünülen) olarak GAPDH proteini kullanıldı. Grupların Pro-Caspase-3 proteinleri housekeeping proteine bölünerek protein miktarları belirlendi.

Buna göre; Pro-Caspase-3 protein seviyesi kontrol grubuna göre MTX (1.Gün) grubunda önemli düzeyde azalmasına rağmen, MTX (1.Gün)+SLM grubunda anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0,05$). MTX (1.Gün) grubu ile MTX (1.Gün)+SLM arasındaki fark ise çok daha anlamlı görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 25). Pro-Caspase-3 protein seviyesi açısından değerlendirildiğinde SLM, MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM gruplarında ise anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$, Şekil 25.)



Şekil 25. Testis doku gruplar Pro-Caspase-3 protein değişim miktarı. *Kontrole göre, **MTX (1.Gün) grubuna göre karşılaştırıldı($p<0,05$).



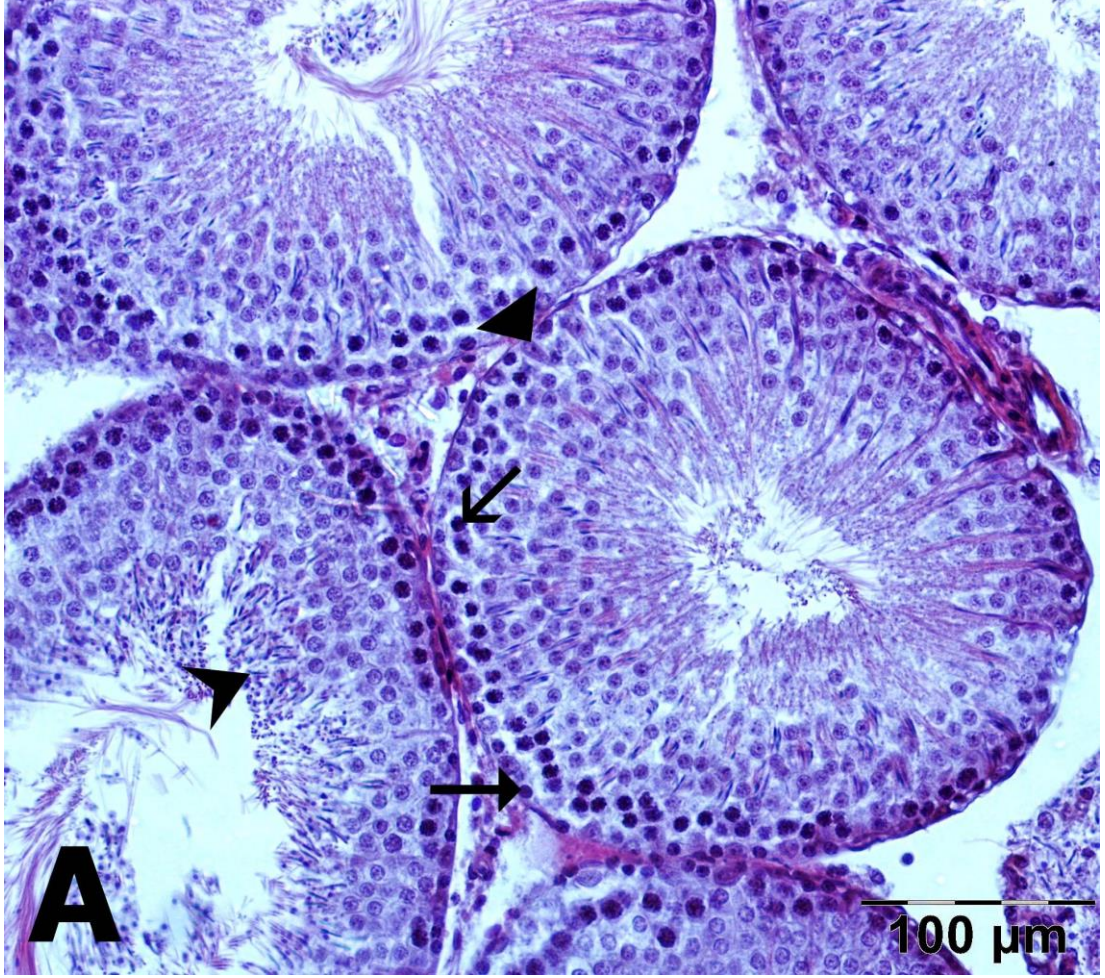
Şekil 25 (devam). Testis doku gruplar Pro-Caspase-3 protein değişim miktarı.

*Kontrole göre, **MTX (1.Gün) grubuna göre karşılaştırıldı($p<0,05$).

5.7. Histopatolojik Değerlendirme

5.7.1. Testis Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi

Kontrol: Kontrol grubundaki sıçanların testis dokuları incelendiğinde seminifer tubul ve epitel hücrelerinin normal yapıda olduğu; farklı gelişim evrelerinde olan spermatid ve spermatositlerin bulunduğu gözlemlendi. (Resim 1)



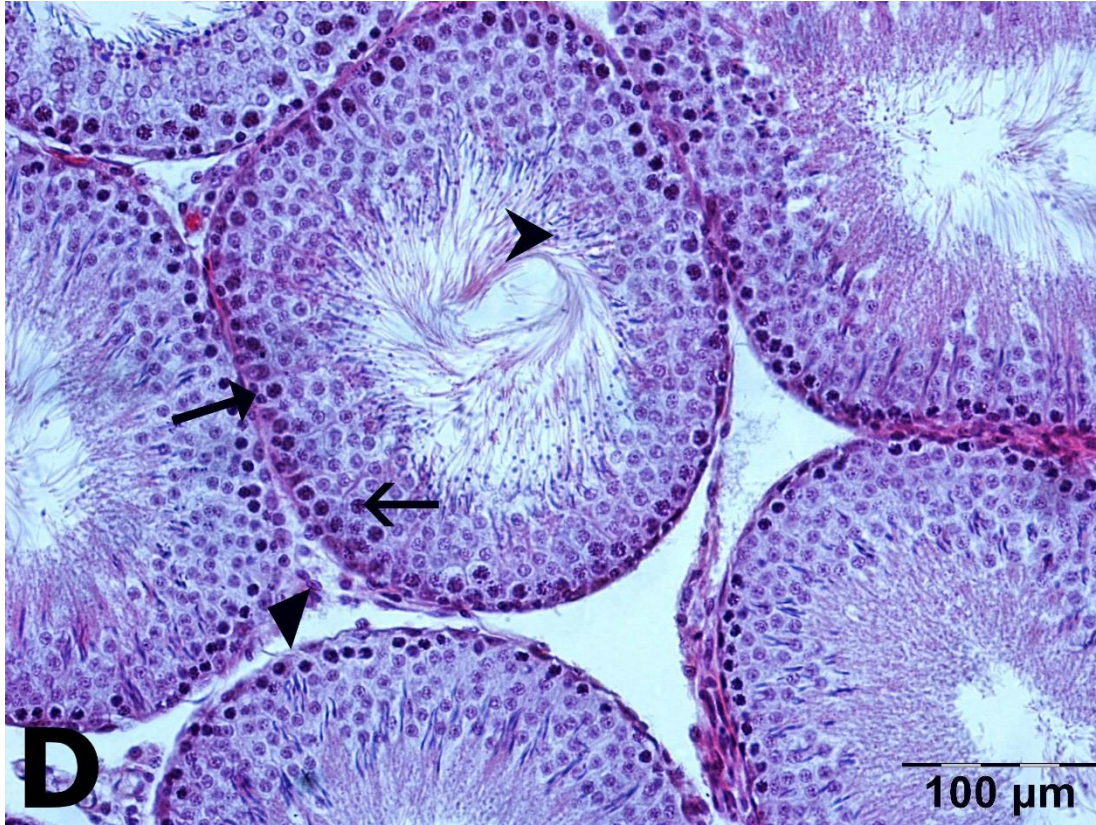
Resim 1. Kontrol grubuna ait testis kesiti, siyah üçgen: sertoli hücresi, kalın siyah ok: spermatosit, ince siyah ok: spermatagonium, siyah ok başı: spermatid, H&E, X20. Ölçek çubuğu: 100 µm.

MTX (1.Gün) grubu:Seminifer tubul çaplarının arttığı, lümenin genişlediği ve içerisinde farklı gelişim evrelerinde dökülmüş olan spermatid ve spermatositlerin bulunduğu tespit edildi. Epitelde deorganizasyon, lümene doğru itilme, seminifer tubullerin duvarında hafif şiddette vakuolleşme ve lümende yer yer kistik genişleme gözlendi. Küçük çaplı seminifer tubullerde ise organizasyonun kısmen korunmuş olduğu görüldü. (Resim 2)



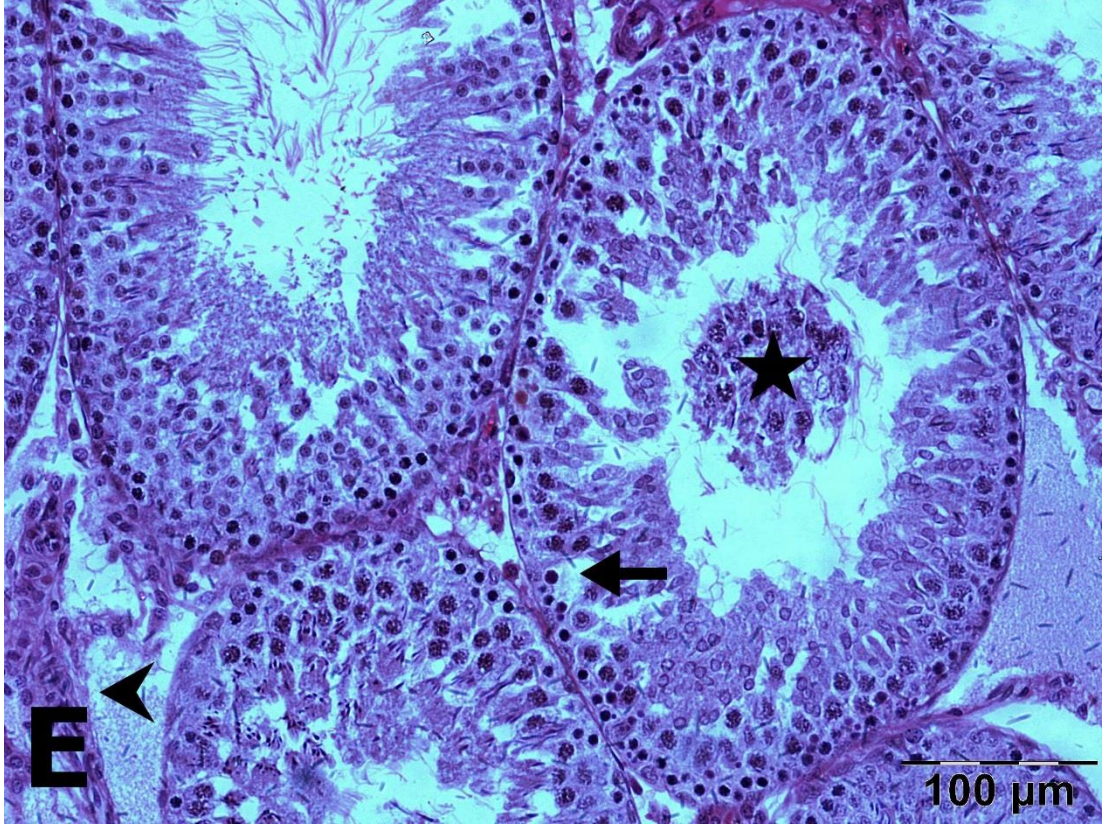
Resim 2. MTX (1.Gün) grubuna ait testis kesiti, siyah ok: vakuol, siyah yıldış: lümende dökülmüş farklı evrelerde hücreler, siyah ok başı: intersitisyel dem, H&E, X20. Ölçek ubuğu: 100 μm.

SLM grubu: Seminifer tubuller genel olarak homojen boyutlarda olup tubul çaplarında artma veya azalma gözlenmedi. Birkaç seminifer tubulün lümeninde farklı gelişim evrelerinde olan dökülmüş spermatid ve spermatozit görüldü.Epitelde organizasyon büyük oranda korunmuş olduğu görüldü.(Resim 4)



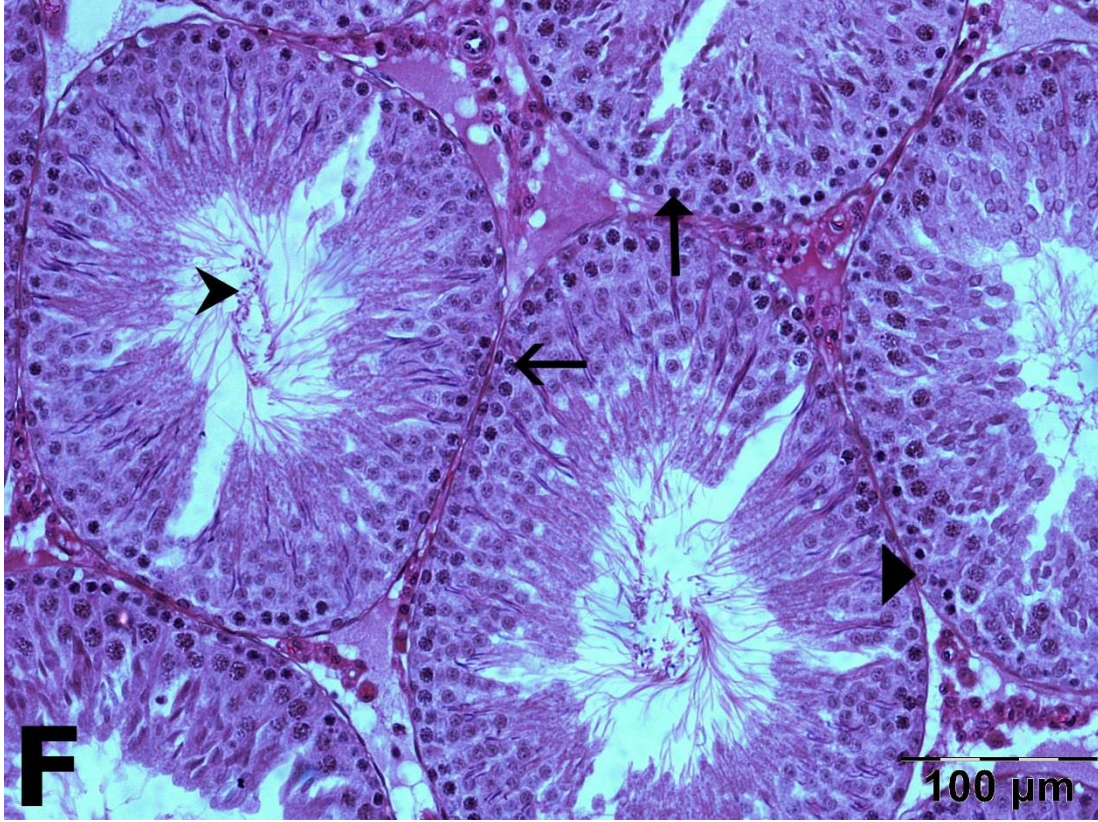
Resim 4. SLM grubuna ait testis kesiti, siyah üçgen: sertoli hücresi, kalın siyah ok: spermatozit, ince siyah ok: spermatogonium, siyah ok başı: spermatid, H&E, X20. Ölçek ubuğu: 100 μm.

MTX (7.Gün) grubu: Seminifer tubul çapında hafif şiddette artış gözlemlendi. Çok sayıda seminifer tubulün lümeninde dökülmüş farklı gelişim evrelerinde olan spermatid ve spermatosite rastlandı. Epitelde orta şiddette deorganizasyon, lümene doğru itilme, seminifer tubullerin duvarında orta şiddette vakuolleşme görüldü. (Resim 5)



Resim 5. MTX (7.Gün) grubuna ait testis kesiti, siyah ok: vakuol, siyah yıldız: lümene dökülmüş farklı evrelerde hücreler, siyah ok başı: intersitisyel ödem, H&E, X20. Ölçek çubuğu: 100 µm.

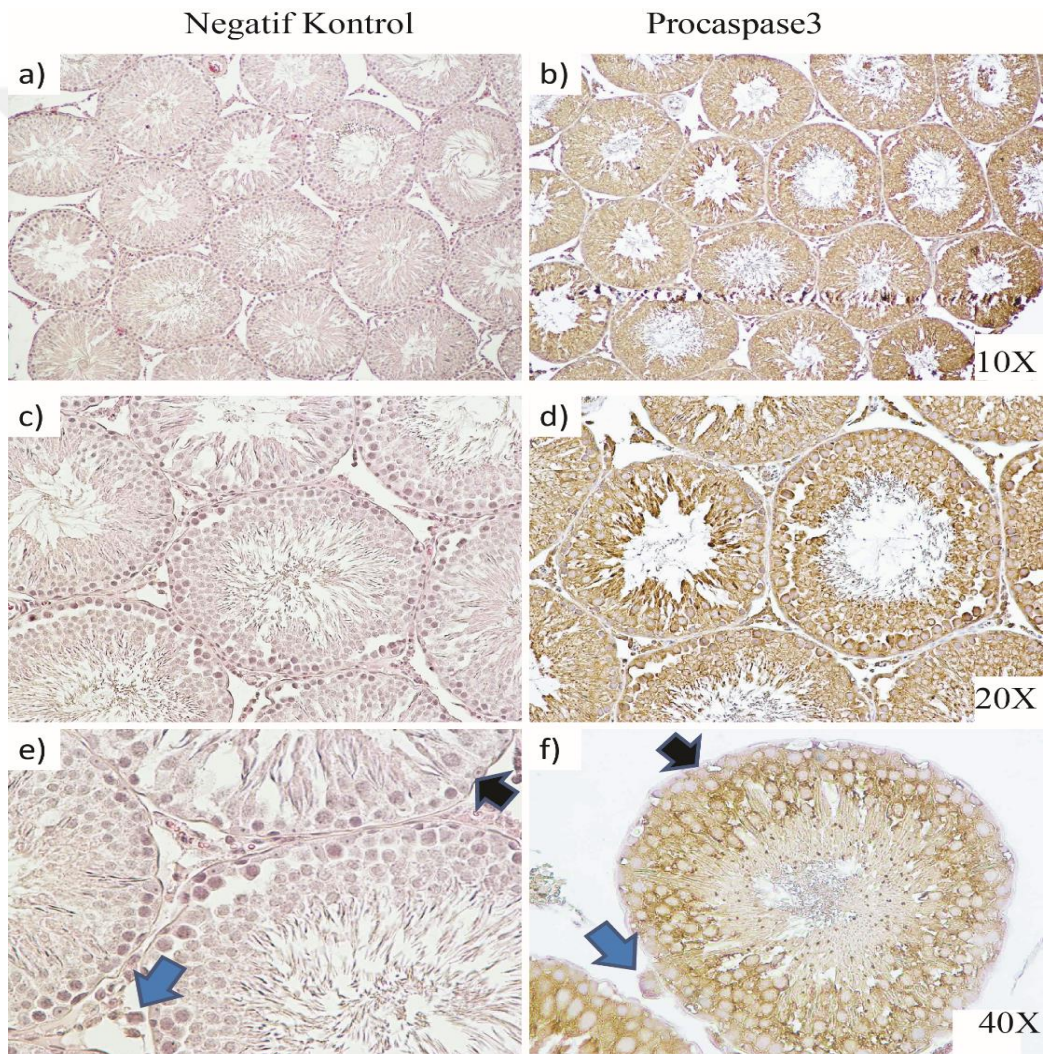
MTX (7.Gün)+SLM grubu: Seminifer tubuller genel olarak normal boyutlara sahipti. Birkaç seminifer tubulün lümeninde farklı gelişim evrelerindeki dökülmüş spermatid ve spermatosit bulunmaktaydı. Epitelde organizasyon genel olarak korunmuş olduğu görüldü. (Resim 6)



Resim 6. MTX (7.Gün)+SLM grubuna ait testis kesiti: siyah üçgen: sertoli hücresi, kalın siyah ok: spermatosit, ince siyah ok: spermatagonium, siyah ok başı: spermatid, H&E, X20. Ölçek çubuğu: 100 µm.

5.7.2. Pro-Caspase-3 Proteinin Testis Dokusunda Yerinin Gösterilmesi

Pro-Caspase-3 proteinini eksprese eden hücrelerin belirlenmesi için immunohistokimya yöntemi kullanılmıştır. Western blot sonuçlarına göre yüksek miktarda Pro-Caspase-3 proteinini eksprese eden MTX (1.Gün)+SLM grubuna ait örneklerde Pro-Caspase-3 proteininin hücrelerdeki lokalizasyonu gösterilmiştir. Buna göre; Pro-Caspase-3 proteininin özellikle interstisyel dokudaki leyding hücrelerinde (mavi ok), sertoli (siyah ok) ve germ hücrelerinde (spermatozoid) olduğu tespit edilmiştir. (Resim 7).



Resim 7. Negatif kontrol (a, c, e) MTX (1.Gün)+SLM grubuna ait (b, d, f) Pro-Caspase-3 proteininin hücrelerdeki yerini gösteren örnek resimdir. Büyütmeler 100X, 200X ve 400X tir.

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda, 1. ve 7. günlerde uygulanan MTX'in oluşturduğu testis hasarına karşı SLM'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda MTX ve SLM'nin sakrifikasyon sonrası serum biyokimya değerleri (AST, ALT ve Testosteron) , testis dokusunda oksidan/antioksidan enzim aktiviteleri (MDA, CAT, SOD, TAS, TOS, OSI), testis dokusu antioksidan (Zn-SOD, Mg-SOD, CAT, GPx-1), sterodiogenezis (StAR, ABP) ve apoptozis (BAX, Bcl-2, CAD) mekanizmasında rol oynadığı bilinen genlerin ekspresyonuna etkileri, Pro-Caspase-3 protein seviyesi/hücre içi lokalizasyonu ve testiste oluşturduğu histopatolojik bulgular değerlendirilmiştir. Metotreksat ve/veya SLM uygulamasının testis dokusundaki etkileri başlıklar halinde tartışılmıştır.

Klinik Bulgular, Canlı Ağırlık ve Testis Ağırlık İndeksi

Kemoterapi, kanser tedavisinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bununla birlikte kemoterapi kullanımının doku ve organlarda önemli toksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (107). Metotreksat (MTX) bir folat antagonisti olup, çeşitli neoplastik ve otoimmün hastalıkların tedavisinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır. MTX'ın özellikle hızla çoğalan hücrelerde ciddi toksik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (108). Hızla çoğalan bağırsak hücreleri de MTX kaynaklı toksisitenin bir hedefidir ve bağırsak kriptlerinde yaptığı hasarlar (ince bağırsakta villöz atrofi ve kript ablasyonunu) nedeniyle malabsorpsiyona neden olduğu gösterilmiştir (109). Aynı zamanda MTX, epitelyal proliferasyonu ve enterosit fonksiyonunu inhibe ederek mukozal bariyeri bozar ve sepsis riskini artırır. MTX uygulaması sonrası ince barsaktaki kript hücrelerindeki en şiddetli mukoza hasarının ortalama 72 saat sonra izlendiği gösterilmiştir (110). Ayrıca MTX tedavisi sırasında bulantı, kusma, diyare, stomatit, gastrointestinal ülserasyon ve mukozit gibi yan etkiler görülebilmektedir (111). Sunulan çalışmamızda da MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün)+SLM gruplarında uygulamanın 3. gününde sıçanlarda diyare gözlenmiş bir gün sonra ise iyileşmeler kaydedilmiştir. Ayrıca MTX uygulanan grupta [MTX (1.Gün), 5 hayvanda diyare gözlenmiş ve 2 gün sonra iyileşme kaydedilmiştir] diyare MTX (1.Gün)+SLM (sadece iki hayvanda gözlenmiştir ve bir gün sonra iyileşme kaydedilmiştir) grubuna göre daha

şiddetli olduğu gözlenmiştir. Bu durumun MTX'in neden olduğu gastrointestinal hasarın SLM tarafından hafifletilmesi olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızda MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün)+SLM grupların sakrifikasyon günü canlı ağırlıklarının deney başı canlı ağırlıklarına göre anlamlı olarak azaldığı kaydedilmiştir($p<0,05$). Bu durumun yukarıda ifade edilen 72 saatten sonra görülen diyare ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bir günlük MTX etkisinin incelendiği MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM gruplarında canlı ağırlık azalmasının görülmemesi de bu görüşü desteklemektedir($p>0,05$). Çalışmamıza benzer olarak MTX (20mg/kg) uygulanan fare ve sıçanlarda canlı ağırlıklarının kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli ölçüde azalmış olduğu birçok çalışmada da kaydedilmiştir (10, 11, 13, 19, 112). Bu çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda MTX kullanımının sıçanlarda canlı ağırlıkta azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda vücut ağırlıklarında azalmaya paralel olarak testis ağırlıklarının azaldığı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak testis ağırlık indeksi (TAİ) değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir($p>0,05$). Çalışmamıza uyumlu olarak MTX'in (20 mg/kg) neden olduğu testis hasarına karşı kurkuminin koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada da TAİ ortalamalarının gruplar arasında değişmediği bildirilmiştir (113).Bizim verilerimizle uyumlu olarak yapılan çalışmalarda TAİ değerlerinde değişiklik olmadığı gösterilmiştir (10, 11, 13). Testis ağırlık indeksi toplam testis ağırlığının vücut ağırlığına oranına göre hesaplamasından dolayı çalışmamızda 7 günlük MTX etkisinin TAİ'ni değiştirmedeği şeklinde değerlendirilmiştir.

Serum Biyokimya Değerleri

AST ve ALT

Metotreksat karaciğerde ciddi toksik etkileri olan bir ajandır (114). Metotreksat karaciğerde metabolize edildiğinden oluşturduğu inflamasyon ve hasara bağlı olarak karaciğer enzimlerinin aktivitesinde artmaya sebep olmaktadır (115). Hepatik hasarın derecesi ile doğru orantılı olarak plazma transaminaz (ALT, AST) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (116). Çalışmamızda serum ALT değerleri sadece MTX (1.Gün) grubunda anlamlı bir artış göstermiştir($p<0,05$). Karaciğer üzerine MTX'in

toksitesinin araştırıldığı çalışmalarda benzer şekilde MTX verilen grupta ALT seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçların ALT'nin hücre hasarına bağlı olarak sitoplazmadan kan dolaşımına salınması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (116, 117). Çalışmamızda MTX (1.Gün)+SLM verilen grubun ALT değerlerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olmaması SLM'nin bu toksisiteye karşı koruyucu olduğunu kanıtı olarak kabul edilmektedir. Kalemci ve ark.(2015) benzer şekilde 10mg/kg dozunda MTX kullanımına bağlı akciğer hasarı üzerine silibininin (SLM etkin aktif bileşeni) etkisinin araştırıldığı çalışmada ALT seviyesi MTX grubunda yüksek iken, MTX ve silibinin beraber verildiği grupta ALT aktivitesinin anlamlı olarak düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu durumu silibinin MTX ile ilişkili doku hasarını azalttığı şeklinde değerlendirilmiştir (118).

Çalışmamızda ALT bulgularına benzer olarak serum AST düzeyi sadece MTX (1.Gün) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür($p<0.05$). Yapılan diğer çalışmada sıçanlarda MTX (20mg/kg/ip) uygulanan gruplarda karaciğer hasarına bağlı olarak hem ALT hem de AST düzeylerinin belirgin derecede yükseldiği gösterilmiştir (119). MTX (1.Gün)+SLM grubunda ise AST değerinin kontrol grubu ile benzer olması SLM'nin MTX hasarına karşı koruyucu olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bizim verilerimizle uyumlu olarak Kalemci ve ark. (2015)'nin MTX kullanılan grupta serum AST seviyesinin arttığını, MTX ile birlikte silibinin kullanılan grupta ise anlamlı bir artış olmadığını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada MTX ile oluşturulan karaciğer fibrosisine karşı SLM verilen grupta AST ve ALT değerlerinde anlamlı bir azalma kaydedilmiştir (120). Ayrıca çalışmamızda MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+ SLM gruplarında ise AST seviyesindeki artış kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir($p>0.05$) .

Yukarıda da ifade edildiği üzere MTX'in karaciğerde oluşturduğu hasarın anlaşılması için AST ve ALT değerlerin önemli birer belirteç olduğu bilinmektedir (116). Buna bağlı olarakta çalışmamızda MTX kullanımının karaciğer hasarı sonucu AST ve ALT'nin aktivitelerini arttığı ve SLM kullanımına bağlı olarakta bu hasarın azaldığı görülmüştür (97, 121, 122). Ayrıca bu sonuçlar kullanılan MTX'in sadece testis üzerine değil diğer sistemler üzerine de toksik etkilerinin olduğunu bildiren araştırma bulgularıyla da uyumludur (40, 50, 54, 57, 65, 71, 97, 118, 122, 123).

Testosteron Konsantrasyonu

Testiste spermatogenezden sorumlu bir androjen olan testosteron erkek fertilitesi için gereklidir (124). Testosteron testiste interstisyel alanda yer alan leydig hücrelerinin lüteinleştirici hormon tarafından uyarılmasıyla salgılanır. Eksikliğinde spermatogenezin devam etmediği ve sertoli hücrelerinin fonksiyonlarını azalttığı belirtilmiştir (125). Yapılan çalışmalarda oksidatif hasarın interstisyel hücrelerin (leydig hücrelerinin) işlevini bozarak steroidogenezi azalttığını bildirmişlerdir (126). Bununla beraber kemoterapinin sitotoksik etkisinin leydig hücre işlev bozukluğuna doğrudan ve dolaylı olarak hasar verebildiği (127) ve kemoterapide yaygın olarak kullanılan MTX'in de gonadlarda sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (10). Çalışmamızda MTX ve SLM uygulamalarının testosteron konsantrasyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. Testosteron konsantrasyonu MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün)+SLM gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca bu verimizle uyumlu olarak leydig hücrelerinin fonksiyonel bir belirteci olan StAR gen ekspresyonunun da MTX uygulamasına bağlı olarak azalmış olması leydig hücre hasarından dolayı testosteron üretiminin azaldığı şeklinde değerlendirilmiştir. Metotreksat uygulaması sonucu StAR protein ekspresyondaki düşüşe paralel olarak testosteron konsantrasyonunda azaldığı daha önce yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (8). Leydig hücrelerinde steroid hormon sentezinin düzenlenmesinde rol oynayan HSP-70 ekspresyonunun MTX hasarına bağlı olarak azalmasının testosteron sentezi bozukluğuna yol açtığı bildirilmiştir (84, 128). Çalışmamıza benzer olarak yedi günlük MTX kullanımının serum testosteron konsantrasyonunu azalttığı ifade edilmiştir (9). Ayrıca Badri ve ark. (2000) MTX (3 mg/kg, i.m.) uygulanan tüm gruplarda süreye bağlı (4 ve 8 hafta boyunca) bir şekilde serum testosteron seviyesinde belirgin bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir (129). Benzer olarak Nouri ve ark. (2009) çalışmalarında MTX'ın (1 mg/kg) 28. gündeki testosteron konsantrasyonun 14. güne göre daha da azaldığını belirtmişlerdir (12). Tüm bu verilerle uyumlu olarak çalışmamızda 1 günlük MTX etkisine kıyasla 7 günlük MTX etkisinin testosteron konsantrasyonu önemli ölçüde azaltması süreye ilişkili olarak MTX'ın kümülatif (MTX poliglutamatların hücre içi birikmesi) etki göstermesiyle açıklanabilir.

Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik olarak ise uzun süreli MTX uygulamasına bağlı testis dokusunda seminifer tübüllerde daralma, interstisiyel ödem, sertoli hücreleri ve spermatogonia arasında açıklıklar, çok sayıda sitoplazmik boşluk, germ hücrelerinde şiddetli derecede vakuol oluşumu, spermatogonia hiperkroması, dev hücre oluşumu gibi bulgular rapor edilmiştir (10, 82). Çalışmamızda MTX (1. Gün) ve MTX (1.gün)+SLM gruplarında MTX kullanımına bağlı olarak seminifer tubul çaplarının arttığı, lümenin genişlediği, epitelde deorganizasyon, lümene doğru itilme, seminifer tubullerin duvarında hafif şiddette vakuolleşme ve lümende yer yer kistik genişleme gözlenmiştir. Çalışmamızda kaydedilen tüm bu histopatolojik değişimlerin hafif olduğu yukarıda sayılan hasarlara göre özellikle çalışma süresinin az olmasından (7 gün) dolayı şiddetli değişimlerin görülmediği düşünülmektedir. Ayrıca MTX'a bağlı hasarların özellikle tekrarlayan MTX uygulamalarından dolayı daha çok arttığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (8, 10-12, 81).

Testis Doku TAS, TOS, OSI, MDA, CAT ve SOD değerleri

Metotreksatın oksidatif stresi artırarak doku ve organlarda fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir (54). Oksidatif strese bağlı vücutta hasar oluşan önemli organlardan biri testistir (19). Testiste MTX kullanımına bağlı spermatogenezis aşamalarının bozulduğu, sertoli ve leydig hücrelerinde hasarın meydana geldiği, testosteron üretiminin azaldığı gösterilmiştir (10, 77). Metotreksata bağlı oluşan bu hasarın önlenmesi/azaltılması için günümüzde antioksidan özelliğe sahip çeşitli maddeler kullanılmaktadır (14, 16, 17, 19, 85, 130, 131). Bu maddelerden biri de güçlü antioksidan özelliğe sahip olan SLM'dir (21, 132). Metotreksat ile indüklenen testis hasarında (1 ve 7 günlük etkisine bağlı) SLM'nin koruyucu etkinliği tam bilinmemektedir. Bu nedenle MTX'ın testiste neden olduğu oksidatif hasarın ve SLM'nin koruyucu özelliklerinin belirlenmesi için çalışmamızda testis dokusundan alınan örneklerde oksidatif hasar ve antioksidan etkinliğin doğrudan veya dolaylı olarak göstergesi olan bazı parametreler (SOD, MDA, CAT, TAS, TOS ve OSI) değerlendirilmiştir.

Total antioksidan seviyesi (TAS) enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların toplam etkinliğini, total oksidan seviyesi (TOS) ise toplam oksidanları ifade etmektedir. TAS vücutta oluşan oksidatif strese karşı temel savunma mekanizması bileşenlerinin toplamı olup antioksidan aktivitesini belirlemek için yararlı bir yöntemdir (133). Farklı antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi ile kıyaslandığında TAS henüz tanımlanmamış veya ölçülemeyen antioksidanların etkilerini de içerdiğinden vücuttaki total antioksidan düzeyini belirleyen ideal bir ölçüm yöntemidir (134). Vucutta TOS veya TAS değerlerinin değişmesi tek başına vücuttaki oksidan ve antioksidan dengesi hakkında bilgi vermediği belirtilmiştir(104). Total oksidan aktivitesinin total antioksidan aktivitesine oranı olan oksidatif stres indeksi (OSI) toksik hasara karşı vucudun verdiği cevabın anlaşılması açısından klinik olarak çok daha önemli olduğu bildirilmiştir (135-138). Çalışmamızda da serbest oksijen radikalleri üzerinden testislerde hasara neden olduğu bilinen MTX'in ve antioksidan olarak etki gösteren SLM'in doku TAS, TOS ve OSI seviyesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 7 günlük MTX'in (MTX 1. Gün) hem TOS seviyesinde hem de OSI oranında anlamlı olarak artışa TAS seviyesinde ise anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir($p<0.05$). Ayrıca MTX'in bir günlük etkisinin de (MTX 7.gün) TOS seviyesi ve OSI oranının kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı görülmüştür($p<0.05$). Bizim çalışmamıza benzer olarak daha önce yapılan çalışmalarda MTX (20mg/kg) verilen sıçanlarda bir hafta içerisinde gözlenen TOS seviyesi ve OSI oranında artış ile TAS'deki azalmanın testiste oluşan oksidatif hasara bağlı olduğu bildirilmiştir (139). Bu durumun MTX'in doku ve organlarda ROS türlerini arttırarak ve antioksidan savunma sitemini zayıflatarak hasara neden olduğu bulgusuyla uyumlu olduğu ifade edilmiştir (139). Çalışmamızda SLM uygulamalarının (MTX 1. Gün+ SLM) TOS ve OSI değerlerini anlamlı olarak azalttığı ve TAS değerlerini ise artırdığı görülmüştür($p<0.05$) . Benzer şekilde MTX ile indüklenen testis hasarına karşı antioksidan özelliği olan alfa lipoik asit (139), carvakrol (17) ve erdostein (140) maddelerinin TOS ve OSI değerlerini azalttığı buna karşılık TAS değerlerini artırdığı rapor edilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakıldığında SLM 'nin MTX ile indüklenen testis hasarına karşı koruyucu bir etki sağladığı söylenebilir. Bununla beraber başka bir çalışmada SLM uygulamasından

sonra total antioksidan kapasitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığının gösterilmesi verilerimizi desteklemektedir (141).

Lipidler vücutta reaktif oksijen türlerinden (ROS) etkilenen en önemli biyolojik moleküllerdir (142). Testis hücrelerinin (spermatoza vb) hücre membranlarının çoklu doymamış yağ asitleri bakımından oldukça zengin olmasından dolayı lipid peroksidasyona çok duyarlıdır (143). Çeşitli dokularda MTX uygulamasına bağlı olarak lipid peroksidasyon olduğu bildirilmiştir (122). Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonun oldukça toksik bir son ürünüdür ve hücrede oksidatif strese bağlı oluşan lipid peroksidasyonun iyi bir göstergesidir (144). Bu nedenle çalışmamızda testis dokusunda MDA düzeyinin MTX ve SLM uygulamalarından nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sadece MTX (MTX (1.Gün)) uygulanan grupta testis dokusu MDA düzeyinde anlamlı bir artış kaydedilmiştir ($p<0.05$). Diğer gruplarda anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Fakat çalışmamızda MTX ile birlikte SLM uygulanan grupta (MTX (1. Gün)+ SLM, istatistiksel anlamlılığı yakalayamasa da) MDA düzeyindeki azalma SLM 'nin antioksidan etkisi ile açıklanabilir çünkü sadece SLM verilen grubun testis doku MDA değerleri kontrol grubuyla benzerdir. Bizim çalışmamızla benzer olarak MTX kullanımının testis MDA düzeyini arttırdığı yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (9, 14, 17, 128, 145). Bununla beraber Oktar ve ark. (2010) tarafından 10mg/kg dozda MTX uygulamasının farelerde testis doku MDA düzeyini etkilemediği ifade edilmiştir (140). Bu durumun çalışmamızda kullanılan MTX dozundan (20 mg/kg) düşük dozda MTX (10mg/kg) kullanımına bağlı olarak olduğu düşünülmektedir.

Testiste antioksidan savunma sistemi spermin serbest oksijen radikallerine karşı korunmasında önemlidir (146). Süperoksit dismutaz (SOD) erkek üreme organlarını serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyan önemli antioksidan enzimlerden biridir (147). Metotreksatın hücrenin antioksidan enzim üretimini azaltarak germ hücrelerine zarar verdiği böylece serbest oksijen radikallerin zararlı etkilerini ortaya çıkardığı bilinmektedir (131, 148). Metotreksat'ın testis dokusunda GPx ve SOD seviyesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (14). Ayrıca katalaz (CAT) aktivitesinin de yine MTX uygulamalarından etkilendiği vurgulanmıştır (139). Çalışmamızda testis dokusu SOD ve CAT enzim aktivitelerinin MTX ve SLM

uygulamalarına bağılı olarak nasıl değiştiği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde (kontrol grubuna göre) hem MTX (1.Gün) hemde MTX (1.Gün) + SLM gruplarında SOD enzim aktivitesinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür($p<0.05$). Fakat MTX (1.Gün) grubundaki SOD enzim aktivitesindeki düşüş SLM ile birlikte kullanılan gruba (MTX (1. Gün)+ SLM) göre daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Katalaz enzim aktivitesinin ise MTX uygulanan hem MTX (1.Gün) hem de MTX (7.Gün) gruplarında azaldığı, MTX'in SLM ile birlikte kullanıldığı gruplarda [MTX (1.Gün) + SLM ve MTX (7.Gün)+SLM] ise CAT enzim düzeyinin anlamlı olarak arttığı kaydedilmiştir($p<0.05$). Çalışmamıza benzer sonuçlar diğer çalışmalarda da bildirilmiştir (14, 19, 139, 145). Yine bir antioksidan olan resveratrolun kısa süreli MTX uygulaması (10 gün) ile testis üzerine koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada SOD enzim miktarının resveratrol'a bağılı artarken CAT enziminin miktarı değişmediği bildirilmektedir. Çalışmamızda da CAT artarken SOD'un değişmemesi bu iki farklı antioksidanın (resveratrol/SLM) farklı mekanizmalar üzerinden etki ettiği şeklinde yorumlanmıştır (14). Çalışmamızın verilerinin birbirleriyle uyumlu olacak şekilde testis doku oksidan değerlerinde yedi günlük MTX etkisine bağılı olarak anlamlı bir artış olduğu (TOS, MDA ve OSI) ve SLM kullanımının ise testis doku hem oksidan değerlerini azaltarak, hem de antioksidan değerleride artırarak (TAS, CAT ve SOD) koruyucu olduğunun bir kanıtı olarak kabul edilmektedir.

Pro-Caspase-3 Protein Seviyesi ve lokalizasyonu

Hücrede apoptozisten sorumlu Kaspaz-3 aktivitesi hücre içindeki diğer kaspazlar tarafından (8,9 gibi) uyarılır. Hücre içinde 32-kDa molekül ağırlığında bir pro-enzim olarak sentezlenen Kaspaz-3 uyarımlar sonucunda 12 ve 17 kDa iki üniteye ayrılır ve bu iki ünite tekrar birleşerek aktif kaspaz-3 dönüşür (149-151). Sunulan bu tez çalışmasında Pro-Caspase-3 proteininin seviyesi western blot ve immunohistokimya yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre (kontrol grubu ile kıyaslandığında) MTX (1.Gün) grubunda Pro-Caspase-3 protein miktarının anlamlı olarak azaldığı, MTX (1.Gün) + SLM grubunda ise anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir($p<0.05$). Diğer gruplarda ise Pro-Caspase-3 protein düzeyi benzer bulunmuştur. Çalışmamıza benzer şekilde önemli bir testis toksikasyon ajanı olan

Di(2-ethylhexyl) Phthalate'nin testiste doza bağılı Pro-Caspase-3 aktivitesini azalttığı buna karşın aktif olan kaspaz3 miktarını artırdığı ifade edilmiştir (RYu, Whang, 2007). Diğer bir çalışmada hücre sel oksidatif stresin bir diğer göstergesi olan glutatyon disülfid'in (GSSG) Pro-Caspase-3 protein sentezini azalttığı ve bu durumun aktif kaspaz3'ün oluşumundan sorumlu olduğu hem in vivo hem de in vitro olarak gösterilmiştir (152). Tüm bu veriler ışığında SLM etkisi ile artan pro-kaspaz3'ün testislerde MTX'in oluşturduğu hasara karşı aktif kaspaz3 azalmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan çalışmamızda antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunun MTX (1.Gün) ile kıyaslandığında MTX (1.Gün)+SLM grubunda artması bu bulguyu destekleyen diğer bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca testis dokusundaki Pro-Caspase-3'ün tüm hücre tiplerinde (sertoli, leydig ve germ hücreleri) eksprese olması uygulanan kimyasallara karşı (MTX veya SLM) tüm testis dokusunda apoptotik bir uyarıya neden olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

Steroidogenezis, Apoptozis ve Antioksidanlar ile ilgili Genlerin mRNA Düzeyleri

Testosteron testis interstisyel dokuda bulunan leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein testis doku leydig hücrelerinde testosteron biyosentezinin sınırlayıcı bir basamağı olan kolesterolün mitokondri iç membranına taşınmasını düzenleyen bir proteindir (153, 154). Çalışmamızda MTX ve SLM'nin leydig hücrelerindeki StAR gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün)+SLM grubunda MTX uygulamasından sonraki 7 günde anlamlı olarak StAR gen ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). İlginç olan ise 1 günlük MTX veya SLM uygulamasının StAR gen ekspresyonunu önemli ölçüde (kontrol grubuna göre) arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Yukarıda (testosterone konsantrasyon tartışmasında) ifade edildiği gibi MTX (1.Gün) ve MTX (1.Gün)+SLM gruplarında StAR gen ekspresyonu ile birlikte serum testosteron düzeyindeki azalma bu bulguların birbirini desteklediğini ve uyumlu olduklarını göstermektedir. StAR gen ekspresyonundaki azalma dikkate alındığında testislerde MTX uygulamasının 7 günlük etkisi ile leydig hücrelerinde önemli hasar oluşturduğu söylenebilir. MTX ile birlikte SLM uygulanan grupta (MTX (1.Gün)+SLM) StAR gen ekspresyonundaki azalmanın SLM uygulamasıyla değişmediğinin gözlenmesi SLM'in leydig hücreleri üzerine 7 günlük süre içinde

önemli bir koruyucu etkisinin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Saad ve ark. (2018) MTX uygulamasının sıçan testis dokusundaki StAR gen ekspresyonunu azalttığını ifade etmektedir. Yine sıçanlarda MTX kullanımına bağlı olarak testiküler StAR protein ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (8).

Testislerde spermatoza hücrelerinin büyümesi ve morfolojik olarak değişmesinden sorumlu hücre tipi olan Sertoli hücrelerinin sekretorik fonksiyonlarının anlaşılmasında androgen binding proteinin (ABP) önemli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (155-157). Bu nedenle çalışmamızda ABP'nin gen ekspresyon düzeyi araştırılmıştır. Elde edilen verilere bakıldığında sadece SLM uygulanan grup dışında MTX uygulanan gruplarda ABP gen ekspresyon düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Silimarin uygulaması ise ABP ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmıştır ($p<0.05$). Çalışmamıza benzer olarak SLM'nin 100 mg/kg dozunda uygulanmasının sıçan testislerindeki sertoli hücrelerinin sayısını kontrol grubuna göre arttırdığını kaydetmişlerdir (158). Bu nedenle çalışmamızda SLM uygulanan grupta ABP düzeyindeki artış sertoli hücrelerindeki artışla ilgili olduğu şeklinde düşünüldü. Histopatolojik olarak da SLM grubunun testis dokusunun normal görünmesi (Seminifer tubuller genel olarak homojen, tubul çaplarında artma veya azalma yok ve epitelde organizasyon büyük oranda korunmuş) bu iddiayı desteklemektedir.

Çalışmamızdan farklı olarak Saad ve ark. (2018) MTX uygulamasının sıçan testislerinde ABP gen ekspresyonunu değiştirdiğini bildirmiştir (9). Bulunan bu farklılığın kullanılan farklı tekniklerden (normal PZR vs real time PZR) kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sunulan çalışma ile kıyaslandığında 17 gün boyunca her gün (12,5 µg/i.p.) MTX uygulamasının sertoli hücrelerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığının gösterilmesiyle bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir (82). Testislerde sıcak stresinin çalışmamıza benzer olarak StAR gen ekspresyonunu azaltırken ABP gen ekspresyonunu değiştirmediğini ifade etmişlerdir (159).

Testiste spermatozoaların olgunlaşması sırasında apoptosiz görülmesi fizyolojik olarak kabul edilse de kemoterapotiklerin özellikle leydig, sertoli ve germ hücrelerinde apoptotik yolları uyatarak hasara neden olduğu gösterilmiştir (160-162). Apoptotik sinyal iletiminin önemli bileşenleri olan kaspazlar kendi kendilerine

aktive oldukları gibi diğer hücre içi proteinler tarafından da uyarılabilirler (163). Bcl-2 ailesi dokuda apoptozisi düzenleyen pro/antiapoptotik proteinleri içerir (164). Hücre membranındaki apoptotik sinyalin mitokondri iç membranında BAX/Bcl-2 oranını arttırdığı ifade edilmektedir (165). BAX/Bcl-2 oranının artması efektör kaspazları uyarıp kaspaz-3 üzerinden kaspaz ile aktive edilen DNaz (CAD)'ı aktive ettiği, böylelikle hücre DNA'sının parçalandığı vurgulanmaktadır (166). Yapılan çalışmalarda MTX'in da hücreyi apoptoza götüren hasarlı DNA oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (167). Çalışmamızda MTX ve SLM'nin apoptotik yolağın önemli düzenleyicileri olan BAX (pro-apoptotik) ve Bcl-2 (antiapoptotik) gene ekspresyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca hücre içinde BAX/ Bcl-2 oranın değişmesi kaspazlar tarafından uyarılan (özellikle kaspaz-3) CAD'ı aktive ederek DNA'nın parçalanmasına sebep olduğundan dolayı diğer önemli bir apoptotik belirteç olarak CAD geninin ekspresyon düzeyi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde MTX (7 günlük etkisi) uygulamasına bağlı olarak apoptotik BAX geninin ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı görülmüştür($p<0.05$). Antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunun ise sadece SLM uygulanan gruplarda arttığı tespit edilmiştir. Yine bu sonuçlarla uyumlu olarak BAX/Bcl-2 oranının sadece MTX grubunda (7 günlük etkisine bakılan) anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir($p<0.05$). Bu sonuçlara göre MTX'in testis dokusunda apoptotik yolağı gen düzeyinde uyardığı; bununla beraber SLM uygulamasının antiapoptozis yolağı uyararak MTX'in bu olumsuz etkisini önlediği söylenebilir. Yine çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak Sheikhabaei ve ark. (2016) MTX uygulanmasının seminifer tübül dejenerasyonu ve germ hücre apoptozisi ile karakterize testis hasarını tetiklediğini bu etkiyi de hem p53 uyararak hem de Bax/Bcl-2 artırarak gösterdiğini bildirmişlerdir (85). Bunlara ek olarak çalışmamızda BAX'nın gen düzeyindeki ekspresyonu MTX (7.Gün) ve MTX (7.Gün)+SLM gruplarında benzer iken Bcl-2 gen ekspresyonu MTX (7.Gün)+SLM grubunda MTX (7.Gün) grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). Bu durumum öncesinde MTX (7.Gün)+SLM grubuna 7 gün boyunca SLM uygulanmasının koruyucu etkinliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kaspaz-3 tarafından uyarılan CAD'ın gen ekspresyonu hem MTX (1.Gün) hem de MTX (1.Gün)+SLM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır($p<0.05$). Fakat MTX (1.Gün)+SLM grubundaki artışın MTX (1.Gün) grubu ile kıyaslandığında

sayısal olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde CAD gen ekspresyonunun artmış olması MTX'in sıçan testis dokusunda apoptozisi uyarmış olduğu düşünülmektedir. Ayrıca SLM uygulamasının gerek yukarıda bahsedilen Bcl-2 üzerinden antiapoptozisi uyarması ve gerekse MTX (1.Gün)+SLM grubunda MTX (1.Gün) grubuna göre daha düşük CAD artışına sebep olması, SLM'in testiste MTX kullanımının 7 günlük etkisine bağlı oluşan DNA hasarını azalttığı söylenebilir.

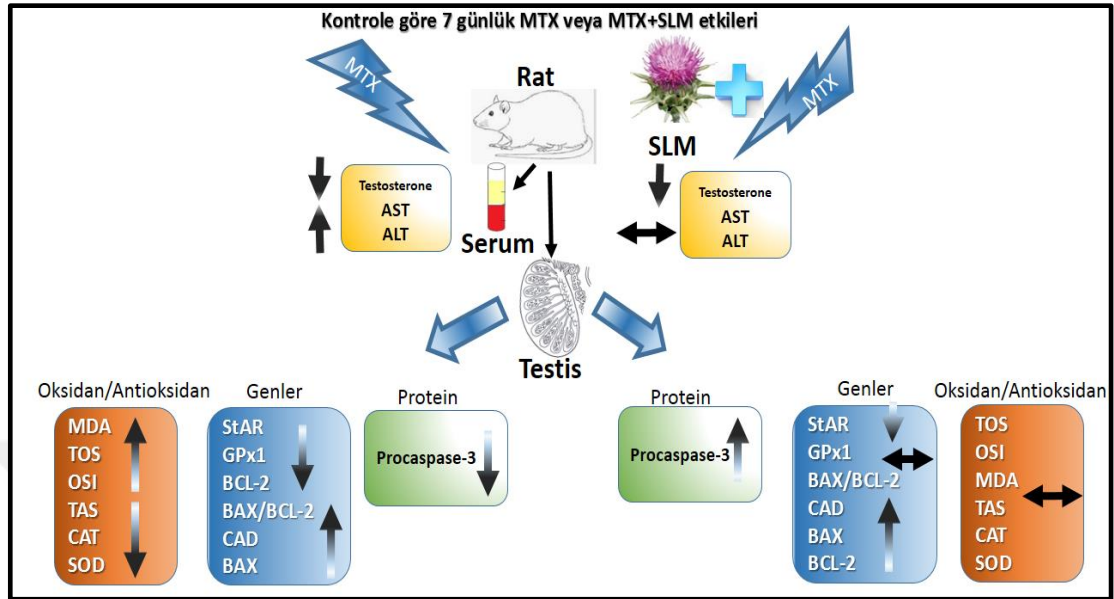
Birçok çalışmada oksidatif hasara karşı antioksidan enzimlerin aktif olarak görev yaptığı bildirilmiştir (168, 169). Fakat enzim aktivitesi ile gen ekspresyonları arasında nasıl bir ilişkinin olduğu konusunda çok az çalışma olmasından dolayı antioksidan gen/enzim aktivitesi tam anlamı ile anlaşılamamıştır. Bu nedenle bizim çalışmamızda MTX'in testis dokusunda ROS üzerinden oluşturduğu oksidatif hasar ve SLM'in bu hasarı azaltmada antioksidan mekanizmada rol alan genlerin ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. Elde edilen gen ekspresyon sonuçları incelendiğinde tüm gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında Zn-SOD gen ekspresyonunun sayısal olarak azaldığı fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Yine ilginç bir şekilde ise SLM uygulanmasının Zn-SOD gen ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı görülmüştür ($p<0.05$). Bu durum zaten kendisi antioksidan etkiye sahip olan bir maddenin vücutta fizyolojik olarak üretilen bazı antioksidanlara gerek kalmadığından bunların baskılanmasına yol açabileceği şekilde yorumlanabilir (170).

Her ne kadar Mg-SOD gen ekspresyonu sayısal olarak MTX uygulanan gruplarda azalmış, SLM birlikte MTX uygulanan gruplarda artmışsada bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Benzer şekilde CAT gen ekspresyonunun ne MTX ne de SLM grupları arasında değişmediği gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Fakat GPx-1 gen ekspresyonu düzeyinin testislerde SLM uygulamalarından olumlu etkilendiği, MTX (1.Gün) + SLM grubu MTX (1.Gün) ile kıyaslandığında GPx-1 ekspresyonunun anlamlı olarak artmış olduğu kaydedildi ($p<0.05$). Çalışmamız ile benzer şekilde nörotoksositeye karşı SLM'in kullanımının GPx-1 gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (171). Yine SLM uygulamasının karaciğerde GPx-1 gen ekspresyonunu arttırarak karaciğer toksisitesine karşı koruma sağladığının gösterilmesi

Çalışmamızdan elde edilen bulguları desteklemektedir (25). Glutasyon peroksidaz (GPx) testis dokusu ve epididimide spermilerin ve duktus deferensin korunmasında rol oynayan başlıca antioksidanlardan biri olduğu belirtilmiştir (172). Farelerin çeşitli dokularında yapılan çalışmalarda SLM'nin GPx ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (173). Diğer çalışmalarla uyumlu olan bu sonuçlarımız ile SLM'nin antioksidan etkisini GPx-1 ekspresyon düzeyini artırarak gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Yukarıda da ifade edildiği gibi testis dokusunda MTX veya SLM uygulanmasının gen aktivitesini nasıl etkilediğine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatür taramalarında Maremanda ve ark.(2017) ve Saad ve ark. (2018) tarafından MTX uygulamasının testislerde SOD ve GSH gen ekspresyonunu azalttığı ifade edilmiştir ve bu durum bizim çalışma sonuçları ile uyumludur. Sonuç olarak GPx-1 dışında çalışmamızda bakılan antioksidan genlerin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu durumda MTX ve SLM uygulamasının testis dokusu antioksidan gen ekspresyon düzeyleri antioksidan enzim aktivitesi ile kıyaslandığında daha az etkilendiği şeklinde değerlendirilmiştir.

Metotreksat ve/veya SLM uygulamasının etkileri Şekil 26’da özetlenmiştir.



Şekil 26. Kontrol grubuna göre 7 günlük MTX veya MTX+SLM etkileri; yukarı ok artış, aşağı ok azalış, çift başlı ok değişmeme olarak ifade edilmektedir.

Elde ettiğimiz tüm bu verilere göre literatür ile uyumlu olarak çalışmamızda MTX uygulanan grubumuzda (7 günlük etkisine bakılan gruplarda) hem diyarda görülmesi hemde serum ALT ve AST düzeylerinin anlamlı olarak artması MTX’in değişik organ ve dokularda toksik etki oluşturduğunu birkez daha kanıtlamıştır.

Bir günlük MTX etkisi yedi günlük etkisiyle kıyaslandığında TOS ve StAR değerlerini artırırken, CAT enzim aktivitesini azaltmasının dışında çalışmanın diğer histolojik, gen ekspresyonu, biyokimyasal, enzim aktivite gibi parametrelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca bir günlük etkisinin histopatolojik olarak önemli bir hasar (diğer sonuçlarla uyumlu olarak) oluşturmadığı gözlenmiştir.

Her ne kadar histopatolojik değişimlerin hafif şiddette olduğu tespit edilsede MTX (7 günlük etkisi) kullanımına bağlı olarak testis dokusunda oksidatif stresin arttığı (TOS, OSI, MDA değerleri artarken, TAS, SOD, CAT değerlerinin azaldığı), apoptozisin hem gen ekspresyon düzeyinde (BAX, BAX/Bcl-2, CAD artırarak) hem de protein düzeyinde (Pro-Caspase-3’ü azaltarak) uyarıldığı görüldü.

Bununla beraber SLM kullanımı ile (MTX (1.Gün)+SLM) grubunda Pro-Caspase-3'ün yanısıra çalışmamızda antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunun da artması 7 günlük etkisine bakılan grupta SLM'nin testis dokusunda TAS'ı azaltarak, OSI ve TOS'u değiştirmeyerek hem oksidatif stresten hemde CAD, BAX/Bcl-2 azaltarak apoptozdan koruduğu, bu verilere göre de SLM'nin antiapoptotik etki gösterdiği görüldü.

Elde ettiğimiz verilere göre SLM uygulamasının hem GPx-1 (tüm gruplarda) gen ekspresyon düzeyini artırması hem de enzim düzeyinde TAS, CAT ve SOD aktivitelerini artırması ile testis dokusunu antioksidan etki göstererek koruduğu görüldü.

Çalışmamızda hem testosteron konsantrasyonunun azalması hemde bu verimizle uyumlu olarak leydig hücrelerinin fonksiyonel bir belirteci olan StAR gen ekspresyonunun da azalmış olması MTX (yedi günlük etkisi) uygulamasının steroidogenezis üzerinde olumsuz etki oluşturduğu fakat SLM kullanımının elde ettiğimiz verilere göre leydig hücrelerini bu hasardan korumadığı görüldü. Yine ABP gen ekspresyonunun sadece SLM uygulanan grupta artması, bununla beraber histopatolojik olarak SLM grubunun testis dokusunun normal görünmesi ile SLM'in germ hücre ve testis dokusu üzerine olumlu etkilerinin olduğu sonucuna varıldı.

8.SONUÇ VE ÖNERİ

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, bir günlük MTX uygulaması ile testiste belirgin bir değişiklik oluşmazken, yedi günlük MTX uygulamalarının etkisinin testis ve canlı ağırlıklarında düşüşe sebep olduğu, ALT ve AST seviyelerinde artışa neden olduğu, antioksidan enzim aktivitesini azalttığı, oksidasyonu artırdığı tespit edildi. Bununla beraber leydig hücrelerinde hasara neden olduğu, apoptotik uyarım oluşturduğu, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu görüldü. Silimarin kullanımının ise MTX kullanımına bağlı olarak olumsuz yönde değişen bir çok parametreyi (yukarıda belirtilen) olumlu olarak azalttığı veya artırdığı görüldü.

Tüm bu verilere bakıldığında oksidatif stresin artması, apoptozisin uyarılması, streoidogenesi bozmasına bağlı olarak yedi günlük MTX etkisinin testis dokusunda hasar oluşturduğu, SLM kullanımının ise antiapoptotik, antioksidan etki mekanizmaları ile sıçanlarda MTX kaynaklı testiküler toksisite üzerinde koruyucu etki gösterdiği sonucuna varıldı. Silimarin'e bağlı diğer koruyucu etki mekanizmalarını anlamak için testis toksisite modellerinin kullanıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Braun J, Rau R. An update on methotrexate. *Current Opinion in Rheumatology*. 2009;21(3):216-23.
2. Neradil J, Pavlasova G, Veselska R. New mechanisms for an old drug; DHFR-and non-DHFR-mediated effects of methotrexate in cancer cells. *Klin Onkol*. 2012;25(Suppl 2):2S87-2S92.
3. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2766-74.
4. Lima A, Seabra V, Bernardes M, Azevedo R, Sousa H, Medeiros R. Role of Key TYMS Polymorphisms on Methotrexate Therapeutic Outcome in Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients. *Plos One*. 2014;9(10).
5. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D. Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. *Nepal Med Coll J*. 2007;9(4):230-3.
6. Saka S, Aouacheri O. The investigation of the oxidative stress-related parameters in high doses methotrexate-induced albino Wistar rats. *J Bioequiv Availab*. 2017;9:372-6.
7. YÜNCÜ M, BÜKÜCÜ N, Bayat N, Sencar L, TARAKÇIOĞLU M. The effect of vitamin E and L-carnitine against methotrexate-induced injury in rat testis. *Turkish journal of medical sciences*. 2015;45(3):517-25.
8. Iamsaard S, Welbat JU, Sukhorum W, Krutsri S, Arun S, Sawatpanich T. Methotrexate Changes the Testicular Tyrosine Phosphorylated Protein Expression and Seminal Vesicle Epithelia of Adult Rats. *Int J Morphol*. 2018;36(2):737-42.
9. Saad DY, Soliman MM, Mohamed AA, Youssef GB. Protective effects of sea cucumber (*Holothuriaatra*) extract on testicular dysfunction induced by immune suppressant drugs in Wistar rats. *Andrologia*. 2018;50(6).
10. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat Res-Gen Tox En*. 2008;655(1-2):59-67.
11. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid. *Mutat Res-Gen Tox En*. 2009;673(1):43-52.
12. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia*. 2009;41(2):105-10.
13. El-Sheikh AA, Morsy MA, Al-Taher AY. Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life sciences*. 2014;119(1-2):40-6.
14. Yulug E, Turedi S, Alver A, Turedi S, Kahraman C. Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats. *Sci World J*. 2013:1-6.
15. Belhan S, Comakli S, Kucukler S, Gulyuz F, Yildirim S, Yener Z. Effect of chrysin on methotrexate-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 2019;51(1):e13145.

16. Zarei L, Sadrkhanlou R, Shahrooz R, Malekinejad H, Eilkhani Zadeh B, Ahmadi A. Protective effects of vitamin E and Cornus mas fruit extract on methotrexate-induced cytotoxicity in sperms of adult mice. *Vet Res Forum*. 2014;5(1):21-7.
17. Daggulli M, Bodaki MN, Bozkurt M, Bozkurt Y, Hatipoglu NK, Penpegul N, et al. Protective Effect of Carvacrol against Methotrexate-Induced Testicular Toxicity in Rats. *J Sex Med*. 2014;11:5511-6.
18. Kiliç I. Metotreksatin neden olduğu testis hasarına karşı curcuminin koruyucu etkisinin incelenmesi. tc trakya üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü morfoloji anabilim dalı histoloji ve embriyoloji bilim dalı yüksek lisans tezi. 2015.
19. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, et al. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol*. 2008;27(7):547-52.
20. Köksal E, GÜLÇİN İ, Beyza S, Sarikaya Ö, Bursal E. In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzym Inhib Med Ch*. 2009;24(2):395-405.
21. Frascini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical drug investigation*. 2002;22(1):51-65.
22. Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M. "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2011;14(4):308.
23. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2003;136(3):205-12.
24. Li L-H, Wu L-J, Jiang Y-Y, Tashiro S-I, Onodera S, Uchiumi F, et al. Silymarin enhanced cytotoxic effect of anti-Fas agonistic antibody CH11 on A375-S2 cells. *Journal of Asian natural products research*. 2007;9(7):593-602.
25. Malekinejad H, Rezaabakhsh A, Rahmani F, Hobbenaghi R. Silymarin regulates the cytochrome P450 3A2 and glutathione peroxides in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2012;19(7):583-90.
26. Girish C, Koner BC, Jayanthi S, Rao KR, Rajesh B, Pradhan SC. Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fund Clin Pharmacol*. 2009;23(6):735-45.
27. Corum DD, Kart A. The protective role of silymarin against methotrexate-induced gastrointestinal injury. *Indian J Anim Res*. 2017;51(2):401-5.
28. Dabak DO, Kocaman N. Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Acta Physiol*. 2015;215:116-.
29. Oufi HG, Al-Shawi NN. The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *Eur J Pharmacol*. 2014;730:36-40.
30. Mescher A. Junqueira's Basic Histology text and atlas. fourteenth ed. McGraw-Hill Education; 2016; p:439-459.
31. Betts JG, DeSaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse DH, et al. *Anatomy and Physiology* 2014.
32. Saladin KS. *Human Anatomy* fifth edition by McGraw-Hill Education 2017; p:702-26.
33. Bobrysheva V KSA. *Histology, Cytology, Embryology: Textbook*. Lugansk: Knowledge, 2011; p-480-499
34. Sembulingam K SPEoMPSe, Jaypee Brothers Medical Publishers. 2012; p 455-513
35. Weinbauer GF. LC, Simoni M, and Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. In: Eberhard N, Behre HM., Nieschlag S eds. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd Edition Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010; p:11-59.
36. Jukes TH. The history of methotrexate. *Cutis*. 1978;21(3):396-8.

37. Puig L. Methotrexate: new therapeutic approaches. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(6):583-9.
38. Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res.* 2002;4(4):266-73.
39. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, et al. Polyglutamation of Methotrexate - Is Methotrexate a Prodrug. *J Clin Invest.* 1985;76(3):907-12.
40. Ozogul B, Kisaoglu A, Turan MI, Altuner D, Sener E, Cetin N, et al. The effect of mirtazapine on methotrexate-induced toxicity in rat liver. *Scienceasia.* 2013;39(4):356-62.
41. Edno L, Bressolle F, Gomeni R, Bologna C, Sany J, Combe B. Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients. *Ther Drug Monit.* 1996;18(2):128-34.
42. Seideman P, Beck O, Eksborg S, Wennberg M. The Pharmacokinetics of Methotrexate and Its 7-Hydroxy Metabolite in Patients with Rheumatoid-Arthritis. *Brit J Clin Pharmacol.* 1993;35(4):409-12.
43. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(3):168-73.
44. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate Metabolism Analysis in Blood and Liver of Rheumatoid-Arthritis Patients - Association with Hepatic Folate-Deficiency and Formation of Polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986;29(7):832-5.
45. Kremer JM, Lee JK. The Safety and Efficacy of the Use of Methotrexate in Long-Term Therapy for Rheumatoid-Arthritis. *Arthritis Rheum.* 1986;29(7):822-31.
46. Gangjee A, Dubash NP, Zeng Y, McGuire JJ. Recent advances in the chemistry and biology of folypoly-gamma-glutamate synthetase substrates and inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2002;2(3):331-55.
47. Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Update.* 2006;9(4-5):227-46.
48. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* 2008;58(11):3299-308.
49. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* 2004;50(9):2766-74.
50. Hemeida RA, Mohafez OM. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2008;20(2):141-8.
51. Kumari S SK, AK Sharma, I Kaur. Methotrexate induced hepatotoxicity and its management. *Inter J Sci Res.* 2016; 5: 1477-1481.
52. Abd-Allah OM SE-DA. The possible protective effect of ginger against intestinal damage induced by methotrexate in rats. *Med J Cairo Univ*81: 1073-1084. 2013.
53. Wessels JAM, Huizinga TWJ, Guchelaar HJ. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2008;47(3):249-55.
54. Patel N, Ghodasara D, Pandey S, Ghodasara PD, Khorajiya J, Joshi B, et al. Subacute toxicopathological studies of methotrexate in Wistar rats. *Veterinary World.* 2014;7(7).
55. Iqbal MP, Sultana F, Mehboobali N, Pervez S. Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. *Biopharm Drug Dispos.* 2001;22(4):169-78.

56. Retenauer S cD, Récher C Surdsage au méthotrexate: complications, prise en charge et prevention High-dose methotrexate: toxicity, management and prevention. *Reanimation* 18: 654-658 2009.
57. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*. 2006;11(6):694-703.
58. Schiff MH, Whelton A. Renal toxicity associated with disease-modifying antirheumatic drugs used for the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;30(3):196-208.
59. Chabner B WW, Supko J. . Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K In Williams Hematology 7th Edition Mc Graw Hill Company, United States ; 249-51 2007.
60. Olsen EA. The Pharmacology of Methotrexate. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(2):306-18.
61. Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DMK. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*. 2006;14(7):713-31.
62. Brugnoletti F, Morris EB, Laningham FH, Patay Z, Pauley JL, Pui CH, et al. Recurrent Intrathecal Methotrexate Induced Neurotoxicity in an Adolescent With Acute Lymphoblastic Leukemia: Serial Clinical and Radiologic Findings. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(2):293-5.
63. Harila-Saari AH, Vainionpaa LK, Kovala TT, Tolonen EU, Lanning BM. Nerve lesions after therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1998;82(1):200-7.
64. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and stroke. *Curr Opin Neurol*. 2001;14(1):95-102.
65. Shuper A, Stark B, Kornreich L, Cohen IJ, Aviner S, Steinmetz A, et al. Methotrexate treatment protocols and the central nervous system: Significant cure with significant neurotoxicity. *J Child Neurol*. 2000;15(9):573-80.
66. Bernini JC, Fort DW, Griener JC, Kane BJ, Chappell WB, Kamen BA. Aminophylline for Methotrexate-Induced Neurotoxicity. *Lancet*. 1995;345(8949):544-7.
67. Weiss HD, Walker MD, Wiernik PH. Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents (first of two parts). *N Engl J Med*. 1974;291(2):75-81.
68. Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Tsukadaira A, Haniuda M, Kurai M, et al. Methotrexate stimulates lung epithelial cells to release inflammatory cell chemotactic activities. *Exp Lung Res*. 2003;29(2):91-111.
69. Sato E, Camhi SL, Koyama S, Robbins RA. Methotrexate stimulates lung fibroblasts and epithelial cells to release eosinophil chemotactic activity. *J Rheumatol*. 2001;28(3):502-8.
70. Obayashi Y, Yamadori I, Fujita J, Yoshinouchi T, Ueda N, Takahara J. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 1997;112(5):1338-43.
71. Kremer JM, Alarcon GS, Weinblatt ME, Kaymakcian MV, Macaluso M, Cannon GW, et al. Clinical, laboratory, radiographic, and histopathologic features of methotrexate-associated lung injury in patients with rheumatoid arthritis - A multicenter study with literature review. *Arthritis Rheum*. 1997;40(10):1829-37.
72. Schnabel A, Richter C, Bauerfeind S, Gross WL. Bronchoalveolar lavage cell profile in methotrexate induced pneumonitis. *Thorax*. 1997;52(4):377-9.

73. Bertino JR. Clinical-Pharmacology of Methotrexate. *Med Pediatr Oncol.* 1982;10(4):401-11.
74. Gutierrez Urena S, Molina JF, Garcia CO, Cuellar ML, Espinoza LR. Pancytopenia secondary to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996;39(2):272-6.
75. Yang CP, Kuo MC, Guh JY, Chen HC. Pancytopenia after low dose methotrexate therapy in a hemodialysis patient: Case report and review of literature. *Renal Failure.* 2006;28(1):95-7.
76. Chelab KG, Majeed SK. HISTPATHOLOGICAL EFFECTS OF METHOTREXATE ON MALE AND FEMALE REPRODUCTIVE ORGANS IN WHITE MICE. *Basrah Journal of Veterinary Research.* 2009;8(1):166-74.
77. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlı A. Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril.* 2009;92(6):2028-33.
78. Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Isik I, Dilekoz E. Light and electron microscope examination of the effects of methotrexate on the endosalpinx. *Eur J Obstet Gyn R B.* 2005;120(1):96-103.
79. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(11):4425-9.
80. K.J. Selvakumar WHH, J.C. Schimenti,. Evidence for cyclophosphamide-induced gene conversion and mutation in mouse germ cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 147 343–350. 1997.
81. Battan G, Tandon R, Vasenwala SM, Faruqi NA. Effects of methotrexate on testis: an experimental study in albino rats. *Ann Int Med Dent Res.* 2015;1(3):170-4.
82. Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha CB, Srivastava AK. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Arch Andrology.* 2004;50(1):33-5.
83. Yüncü M, Zengin G, Birinci H, Bostancıer N, Polat S. Protective Effect of Proanthocyanidin against Methotrexate-Induced Testicle Damage in Rats.
84. Maremanda KP, Jena GB. Methotrexate-induced germ cell toxicity and the important role of zinc and SOD1: Investigation of molecular mechanisms. *Biochem Bioph Res Co.* 2017;483(1):596-601.
85. Fatemeh Sheikhabaei MS, Mozafar Khazaei, Ph.D.1, Arezou Rabzia, M.Sc.1, Kamran Mansouri, M.Sc.2, Ali Ghanbari, Ph.D.1*. Protective Effects of Thymoquinone against Methotrexate-Induced Germ Cell Apoptosis in Male Mice. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility* Vol 9, No 4, Jan-Mar 2016, Pages: 541-547. 2016.
86. Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(1):29-41.
87. Das S.K. MS, Vasudevan D.M. . Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin an overview. *Natural Product Radiance.* 2008;2008; 7(2).
88. *Alternative Medicine Review.* 4(4): 272 [www.waltmedrev.com]. 1999.
89. Sanjib B. Phytotherapeutic properties of milk thistle seeds: An overview. . *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research,* 2011; 1: 69-79. 2011.
90. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and silymarin - New and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem.* 2007;14(3):315-38.
91. Kren V, Marhol P, Purchartova K, Gabrielova E, Modriansky M. Biotransformation of silybin and its congeners. *Current drug metabolism.* 2013;14(10):1009-21.
92. Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer research.* 2006;26(6B):4457-98.

93. El-Shitany NA, Hegazy S, El-desoky K. Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats. *Phytomedicine*. 2010;17(2):116-25.
94. Gharagozloo M, Velardi E, Bruscoli S, Agostini M, Di Sante M, Donato V, et al. Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: Effects on NF- κ B activity and IL-2 production. *Pharmacological research*. 2010;61(5):405-9.
95. Matsuda T, Ferreri K, Todorov I, Kuroda Y, Smith CV, Kandeel F, et al. Silymarin protects pancreatic β -cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology*. 2005;146(1):175-85.
96. Nasri H. Silymarin and its properties; a nephrology viewpoint. *J Renal Endocrinol*. 2015;1(1):e09.
97. Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C, Gur C, Batil AA, Gulcin I. Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *J Food Biochem*. 2017;41(5).
98. Oufi HG, Al-Shawi NN, Hussain SA. What are the effects of silibinin on testicular tissue of mice? *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;2(11):9.
99. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016;7(2):27-31.
100. Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafanian A, Sajjadi SE, Hourfar H, et al. Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients. *Int Immunopharmacol*. 2006;6(8):1305-10.
101. Doehmer J, Tewes B, Klein KU, Gritzko K, Muschick H, Mengs U. Assessment of drug-drug interaction for silymarin. *Toxicol In Vitro*. 2008;22(3):610-7.
102. Sahinturk V, Guclu C, Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian J Androl*. 2007;9(1):117-24.
103. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-85.
104. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
105. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100(1):61-4.
106. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
107. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2001;7(4):394-403.
108. Sirotinak F, Moccio D. Pharmacokinetic basis for differences in methotrexate sensitivity of normal proliferative tissues in the mouse. *Cancer research*. 1980;40(4):1230-4.
109. Junko Nagakuboa TT, Mariko Kitajimab, Hiromitsu Takayamab, Norio Aimib, Toshiharu Horiea,* . Characteristics of transport of fluoresceinated methotrexate in rat small intestine. *Life Sciences* 69 (2001) 739–747. *Life Sciences* 69 (2001) 739–747. 2001.
110. Julie M. Clarke NCP, Balazs H. Bajka, Gordon S. Howarth, Leanna C. Read & Ross N. Butler. Use of the 13C-sucrose breath test to assess chemotherapy-induced small intestinal mucositis in the rat. [*Cancer Biology & Therapy* 5:1, 34-38, January 2006]; ©2005 Landes Bioscience. 2006.
111. Cash JM, Klippel JH. Second-line drug therapy for rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(19):1368-75.

112. Koc F, Erisgin Z, Tekelioglu Y, Takir S. The effect of beta glucan on MTX induced testicular damage in rats. *Biotech Histochem*. 2018;93(1):70-5.
113. Kılınç L. Metotreksatin neden olduğu testis hasarına karşı curcuminin koruyucu etkisinin incelenmesi: Trakya Üniversitesi; 2015.
114. Abdel-Daim MM, Khalifa HA, Abushouk AI, Dkhil MA, Al-Quraishy SA. Diosmin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Injury: A Biochemical and Histopathological Study in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2017.
115. Cakiri T, Basturk A, Polat C, Aslaner A, Durgut H, Sehirli AO, et al. Does alfa lipoic acid prevent liver from methotrexate induced oxidative injury in rats? *Acta Cir Bras*. 2015;30(4):247-54.
116. Vardi NP, H. Cetin, A. Erdogan, A. Cetin Ozturk, I. Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol*. 2010;38(4):592-7.
117. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcit F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32(6):662-71.
118. Kalemci S, Topal Y, Celik SY, Yilmaz N, Beydilli H, Kosar MI, et al. Silibinin attenuates methotrexate-induced pulmonary injury by targeting oxidative stress. *Exp Ther Med*. 2015;10(2):503-7.
119. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed P, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chem-Biol Interact*. 2017;272:80-91.
120. Ghaffari AR, Noshad H, Ostadi A, Ghojatzadeh M, Asadi P. The effects of milk thistle on hepatic fibrosis due to methotrexate in rat. *Hepat Mon*. 2011;11(6):463-+.
121. Hagag AA, Elgamsy MA, El-Asy HM, Mabrouk MM. Protective role of silymarin on hepatic and renal toxicity induced by MTX based chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2016;8(1).
122. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*. 2003;34(4):282-7.
123. Herman S, Zurgil N, Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res*. 2005;54(7):273-80.
124. Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*. 2011;1(2):116-20.
125. Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*. 2004;131(2):459-67.
126. Luo LD, Chen HL, Trush MA, Show MD, Anway MD, Zirkin BR. Aging and the Brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *J Androl*. 2006;27(2):240-7.
127. Howell SJ, Radford JA, Ryder WDJ, Shalet SM. Testicular function after cytotoxic chemotherapy: Evidence of Leydig cell insufficiency. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1493-8.
128. Sonmez MF, Cilenk KT, Karabulut D, Unalmis S, Deligonul E, Ozturk I, et al. Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomed Pharmacother*. 2016;79:44-51.
129. Badri S, Vanithakumari G, Malini T. Studies on methotrexate effects on testicular steroidogenesis in rats. *Endocr Res*. 2000;26(2):247-62.
130. Belhan S, Ozkaraca M, Kandemir FM, Gulyuz F, Yildirim S, Omur AD, et al. Effectiveness of Hesperidin on Methotrexate-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Kafkas Univ Vet Fak*. 2017;23(5):789-96.

131. Sayilmaz A, Karabulut YY, Ozgorgulu A. The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. *Turk J Urol.* 2016;42(4):235-9.
132. Anthony K, Saleh M. Free radical scavenging and antioxidant activities of silymarin components. *Antioxidants.* 2013;2(4):398-407.
133. Taysi S, Cikman O, Kaya A, Demircan B, Gumustekin K, Yilmaz A, et al. Increased oxidant stress and decreased antioxidant status in erythrocytes of rats fed with zinc-deficient diet. *Biol Trace Elem Res.* 2008;123(1-3):161-7.
134. Miller NJ, Riceevans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407-12.
135. Demirbag R, Gur M, Yilmaz R, Kunt AS, Erel O, Andac MH. Influence of oxidative stress on the development of collateral circulation in total coronary occlusions. *Int J Cardiol.* 2007;116(1):14-9.
136. Kilit C, Koçak FE, Paşalı Kilit T. Comparison of the effects of high-dose atorvastatin and high-dose rosuvastatin on oxidative stress in patients with acute myocardial infarction: A pilot study. *Archives of the Turkish Society of Cardiology.* 2017;45(3):235-43.
137. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2005;583(1):49-54.
138. Akcilar R, Akcilar A, Savran B, Ayada C, Koçak C, Koçak FE, et al. Effects of ukraine in rats with intestinal ischemia and reperfusion. *Journal of surgical research.* 2015;195(1):67-73.
139. Neslihan Pinar GÇ, Tümay Özgür, Mahir Kaplan. The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. 2018(Biomedicine & Pharmacotherapy 97 (2018) 1486–1492).
140. Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarci M, Meydan S, Öztürk OH, et al. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and industrial health.* 2010;26(7):433-8.
141. Psotová J, Zahálková J, Hrbac J, Simanek V, Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC.* 2001;145(2):81-3.
142. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Bio Med.* 2000;28(12):1685-96.
143. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid-Peroxidation, and Human-Sperm Function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183-97.
144. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):851-62.
145. Uyar A, Yaman T, Dogan A, Uslu S, Keles OF, Yener Z, et al. Is Methotrexate-Induced Testicular Damage Preventable Using Nettle Seed Extract: A Histopathological, Immunohistochemical, Biochemical and Spermatological Examination. *Fresen Environ Bull.* 2018;27(4):2320-31.
146. Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Remedial effect of DL-alpha-lipoic acid against adriamycin induced testicular lipid peroxidation. *Mol Cell Biochem.* 2004;267(1-2):209-14.
147. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl.* 2003;5(3):231-42.
148. Kremer JM. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1370-82.

149. Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfusion and apheresis science*. 2003;28(3):285-95.
150. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *British journal of haematology*. 1997;99(4):824-31.
151. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995;376(6535):37.
152. Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol*. 2000;30(5):609-27.
153. Nagata Y, Homma H, Matsumoto M, Imai K. Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by D-aspartate in rat Leydig cells. *FEBS letters*. 1999;454(3):317-20.
154. Stocco DM, Clark BJ. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical pharmacology*. 1996;51(3):197-205.
155. Hagenäs L, Ritzen E, Plöen L, Hansson V, French F, Nayfeh S. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Mol Cell Endocrinol*. 1975;2(5):339-50.
156. Hansson V, Weddington S, Naess O, Attramadal A, French F, Kotite N, et al. Testicular androgen binding protein (ABP)—a parameter of Sertoli cell secretory function. *Hormonal regulation of spermatogenesis*: Springer; 1975. p. 323-36.
157. Gonsalvus GL, Larrea F, Musto NA, Becker RR, Mather JP, Bardin CW. Androgen binding protein as a marker for Sertoli cell function. *Journal of steroid biochemistry*. 1981;15:99-106.
158. Hassanali Abedi1 HKJ, SeyedMomammad Amin Hashemi2,HojatollahKarimiJashni1 , Zahra Kargar Jahromi1 and Mohammad Pourahmadi1. The Effect of Silymarin on Spermatogenesis Process in Rats. *International Journal of Medical Research &Health Sciences*, 2016, 5, 6:146-150. 2016;ISSN No: 2319-5886.
159. Bozkaya F, Atli M, Guzeloglu A, Kayis S, Yildirim M, Kurar E, et al. Effects of long- term heat stress and dietary restriction on the expression of genes of steroidogenic pathway and small heat- shock proteins in rat testicular tissue. *Andrologia*. 2017;49(6):e12668.
160. Dive C, Hickman J. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *British journal of cancer*. 1991;64(1):192.
161. Boersma AW, Nooter K, Burger H, Kortland CJ, Stoter G. Bax upregulation is an early event in cisplatin-induced apoptosis in human testicular germ-cell tumor cell line NT2, as quantitated by flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1997;27(3):275-82.
162. Chresta CM, Masters JR, Hickman JA. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax: Bcl-2 ratio. *Cancer research*. 1996;56(8):1834-41.
163. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(10):388-93.
164. Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Csh Perspect Biol*. 2013;5(2).
165. Chen Y-X, Lv W-G, Chen H-Z, Ye F, Xie X. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009;143(2):107-11.
166. Jong-min kim srG, alexander c. P. Weil, and barry r. Zirkin. Caspase-3 and Caspase-Activated Deoxyribonuclease Are Associated with Testicular Germ Cell Apoptosis Resulting from Reduced Intratesticular Testosterone. 0013-7227/01/\$0300/0 *Endocrinology* 142(9):3809–3816 Printed in USA Copyright © 2001 by The Endocrine Society. 2001.

167. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Digest Dis Sci*. 2008;53(4):1071-7.
168. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012;5(1):9.
169. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*. 1998;75(2):199-212.
170. Surai P. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*. 2015;4(1):204-47.
171. Li L, Sun HY, Liu W, Zhao HY, Shao ML. Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells. *Food Chem Toxicol*. 2017;102:93-101.
172. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;250(1-2):70-9.
173. Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of Silymarin on the Increase of the Glutathione Content in Different Tissues of the Rat. *Planta Med*. 1989(5):420-2.





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ÖZGEÇMİŞ

Adı	Zehra	Soyadı	ATLI
Doğum Yeri	Niğde	Doğum Tarihi	01.06.1986
Uyruğu	T.C.	Tel	
E-posta	yeni5187@hotmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Dicle Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji	
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011
Lisans	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Niğde Atatürk Lisesi	2005

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Arş. Gör.	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011-Halen

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
72.5								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70.74		
(Diğer) Puanı			

10.EKLER

10.1. ETİK KURUL KARARI

T.C.DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DÜHADEK)

ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	TOPLANTI SAYISI
25.01.2018	2	1

KARAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Başkanı **Prof. Dr. Meral ERDİNÇ**' yürütücüsü olduğu Arş. Gör. Zehra ATLI, Doç.Dr. Rahşan YILMAZ, Prof. Dr. Nurettin AYDİLEK, Doç. Dr. Hasan AKKOÇ, Doç. Dr. İlker KELE, Doç. Dr. Osman ATLI'nın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, **Metotreksat İle Sıçan Testislerinde Oluşturulan Oksidatif Hasar Üzerine Silimarinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı 2017/20 protokol numaralı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan	Erkek	56	8-9 Hafta/200 g

Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup araştırmanın oy birliği ile etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Beran YOKUŞ
(BAŞKAN)

Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI

(ÜYE)
Doç. Dr. Selçuk TUNİK
(ÜYE)

Doç. Dr. Hasan AKKOÇ

(ÜYE)
Yrd. Doç. Dr. Ulaş ALABALIK

(ÜYE)
Yrd. Doç. Dr. Feray ALTAN

(ÜYE)
Yrd. Doç. Dr. Akın KOÇHAN

(ÜYE)

Prof. Dr. Filiz ACUN KAYA

(ÜYE)
Öğr. Mehmet Yavuz KAHRAMAN

(ÜYE)
Doç. Dr. Ramazan DEMİREL

(ÜYE)
Doç. Dr. Mehmet Hüseyin ALKAN

(ÜYE)
Av. Abdullah YAVUZ

(ÜYE)
Veteriner Hekim İlyas ALAK

İletişim: DÜBTAM binası, Zemin Kat, DÜSAM laboratuvarları (İlahiyat Fak. Karşısı) 21280 Sur /DİYARBAKIR
E-posta: dusam@dicle.edu.tr Sekreteryaya: 0 412 248 8431 (3956) Vet.Hekim: 0 412 2488001-16 hat (4423)

10.2. ORJİNALLİK RAPORU

METOTREKSAT İLE SIÇAN TESTİSLERİNDE OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNE SİLİMARİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI			
ORJİNALLİK RAPORU			
%9	BENZERLİK ENDEKSİ	%6	İNTERNET KAYNAKLARI
%3	YAYINLAR	%7	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1	
2	Submitted to Dicle University Öğrenci Ödevi	%1	
3	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1	
4	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1	
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1	
6	Submitted to Izmir Katip Aalebi Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1	
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1	
8	www.researchgate.net		